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

Fator FOXO e sinalização nutricional na reprodução de *Blattella germanica*.

JULIANA ALMEIDA COBO

ORIENTADORA: Dra. Ana Maria Bonetti / UFU

CO-ORIENTADOR: Dr. José Luís Maestro/ CSIC-BARCELONA

UBERLÂNDIA – MG
2008

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

Fator FOXO e sinalização nutricional na reprodução de *Blattella germanica*.

JULIANA DE ALMEIDA COBO

ORIENTADORA: Dra. Ana Maria Bonetti / UFU

CO-ORIENTADOR: Dr. José Luís Maestro/ CSIC-BARCELONA

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA – MG
2008

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

Fator FOXO e sinalização nutricional na reprodução de *Blattella germanica*.

JULIANA ALMEIDA COBO

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dra. Ana Maria Bonetti (Orientadora)

Examinadores: Dr. Carlos Ueira Vieira
Dra. Cristina Soares Souza
Dra. Sandra Morelli
Dra. Zila Luz Paulino Simoes

Data da defesa: 31-03-2008

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

_____

Dra. Ana Maria Bonetti

Aos meus Pais William e Maria

Por me oferecerem tudo que sempre

quis da maneira que eu precisava e não

que queria, obrigado por me ensinar, me educar

e por estar presentes em todos os tijolinhos da minha vida,

porque em cada conquista minha, foi para dar um sorriso a vocês.

Não há nada de nobre em sermos superiores ao próximo. A verdadeira nobreza consiste em sermos superiores ao que éramos antes.

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo o que ele faz por mim e pela minha família.

Aos meus pais, A Vivi, ao Junior e a Gabriela e a minha Vó Vera vocês são as pessoas que mais amo na vida. Muito obrigado por me proporcionarem tudo para garantir minha felicidade e formação.

Aos meus avós (Antonio, Silvério e Maria) que não podem estar presente neste momento tão importante, mas vocês moram no meu coração.

À meu marido Rodrigo, que me apoiou, me auxiliou, e foi meu grande companheiro nos momentos mais difíceis nesta caminhada. Te amo.

A Thais, minha cunhada, pela atenção, carinho e toda ajuda, sem vc com certeza não conseguiria terminar a tese, muito obrigada.

Aos meus sogros Eny e Dalton por sofrerem comigo e serem um apoio fundamental para completar essa etapa na minha vida. Obrigada!!!

Aos grandes e sinceros amigos que me ajudaram muito na realização deste trabalho, em especial, , Carlos Ueira e Roni,

Aos amigos do Laboratório de Genética (Rafael, Luciana Londe, Carol, Flávia, Tininha e Cynara) e de Genética Molecular (Todos - já que são muitos) pelo convívio e apoio.

À Dra. Ana Maria Bonetti, por ter aceitado me orientar, pelo carinho, atenção, conselhos, correções do trabalho e pelo seu conhecimento.

Al Dr. Jose Luis Maestro, por todo cariño, y atencion, por todo conocimento que mi há proporcionado, a ti mas que há nadie agradezco mi tesis.

A todos mis amigos del laboratório de biologia molecular de Barcelona, Ferran, Oscar, Claudia, Dani, Laura, Paula, Viviana, Santiago, Marisol, e Marc por toda ayuda prestada. Gracias muchas gracias..

Al Dr. Davi Marti por las risas y el serio de la ciência.

Al Dr. Xavier Bellés por ter- me aceptado en su laboratório y me ensinar a respectar y amar aun mas a la ciencia.

A Dra. Dolors Piulachs por ser mi primeira voz en el laboratório, por siempre contestarme tan pronto en todo que necesitaba, gracias..

A mis amigas LLuisa Vilaplana y Nuria Pascual, por seren mis hermanas mayores, mis companeras del laboratório y amigas no lo se como agradecer todo que han hecho por mi..

A mi amiga Natty, por todas las sonrisas, por todo el carino, por todo que me ha ensinado, por la paciência te echo de menos.. te amo amiga.

À Dra. Zilá Simões, por ter me ensinado pacientemente algumas etapas do trabalho e pela amizade formada. Muito Obrigado.

À Marlene, pelo carinho e apoio em tudo. Sua benção.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Genética e Bioquímica, por disponibilizarem o laboratório no qual a pesquisa foi desenvolvida.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado, me ajudando a alcançar mais este objetivo (meu pessoal de Uberaba). Meu muito obrigado!

ÍNDICE

	Pág
Lista de Abreviaturas	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Figuras	vi
Apresentação	01
Capítulo 1: CONSIDERAÇOES GERAIS SOBRE O FATOR DE TRANSCRIÇAO FOXO E A SINALIZAÇAO NUTRICIONAL NA REPRODUÇAO PARA O ORGANISMO *Blattella germanica*.	04
1.1 OS INSETOS COMO MODELO PARA ESTUDOS DOS SINAIS NUTRICIONAIS	05
1.2 VIAS METABOLICAS IMPLICADAS NA SINALIZAÇAO NUTRICIONAL	11
1.3 FOXO	14
1.4. OBJETIVOS	18
1.5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	19
Capítulo 2: CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO cDNA DE FOXO, CICLOS DE EXPRESSÃO E EXPRESSAO COM ANIMAIS ALIMENTADOS E NAO ALIMENTADOS	24
2.1 RESUMO	25
2.2. INTRODUÇAO	26
2.3. MATERIAIS E METODOS	28
2.4. RESULTADOS E DISCUSSAO	31
2.4.1 CLONAGEM E CARACTERIZAÇãO DO cDNA DE FOXO	31
2.4.2 CICLOS DE EXPRESSAO	38
2.4.2.1 CORPORA ALLATA	38
2.4.2.2 CORPO GORDUROSO	40
2.4.2.3. OVARIO	42
2.4.3 ANIMAIS ALIMENTADOS E NAO ALIMENTADOS COM 3 DIAS DE ADULTO.	44
2.4.4 ALIMENTADAS, NÃO ALIMENTADAS E NÃO ALIMENTADAS	49

EXPOSTAS A 6 HORAS DE ALIMENTOS A 5 DIAS DE ADULTA	
2.5. CONCLUSOES	52
2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	54
CAPITULO 3: ESTUDO DA INTERFERENCIA DO FATOR DE TRANSCRIÇAO FOXO EM *B. germanica*.	57
3. RNA DE INTERFERENCIA *IN VIVO*	58
3.1 RESUMO	58
3.2 INTRODUÇAO	59
3.3 MATERIAIS E METODOS	60
3.4 RESULTADOS E DISCUSSAO	62
3.4.1 INTERFERENCIA FOXO ANALISADAS AO QUINTO DIA DE ADULTO.	62
3.4.2 INTERFERENCIA PARA FOXO EM ANIMAIS ALIMENTADOS E NAO ALIMENTADOS ANALISADOS AO QUINTO DIA DE ADULTO	66
3.5 CONCLUSOES	72
3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	73
4. ANEXO: MATERIAL E METODOS	I

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ml	Mililitro
µL	Microlitros
M	Molar
Mm	Milimolar
Ng	Nanogramas
µg	Microgramas
g	Grama
gl	Grau de Liberdade
α	Nível de Significância (confiança)
U	Unidade
λ	Absorbância
UV	Ultra-Violeta
nm	Nanômetro
h	Hora
min	Minuto
seg	Segundos
rpm	Rotações por minuto
pmol	Picomol
pH	Potencial Hidrogeniônico
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
V	Volts
DO	Densidade ótica
pb	Par de Base
PCR	Reação em cadeia de polimerase (*Polimerase chain n)*
OV	Ovario
CA	Corpora Allata
CG	Corpo Gorduroso

TOR	*target of rapamycin*
IR	receptor de insulina
Vg	Vitelogenina
SIN	hidroximetilglutamil-CoA sintasa
RED	hidroximetilglutamil-CoA-reductasa
PV	Proteínas Vitelogenicas
HJ	hormônio juvenil

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 **Página**

Tabela 3.1:	Nucleotídeos utilizados para amplificar o duplo RNA.	59
Tabela 3.2:	Nucleotídeos utilizados para amplificar a região utilizada para verificar a eficácia da técnica de RNAi	60

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1, 2 e 3 **Página**

Fig. 1.1:	Fig. 1.1: Esquema da interação de Síntese HJ pelo corpora allata (CA), e de vitelogenina (Vg) pelo corpo gorduroso (C.G)	08
Fig. 1.2:	Relação entre alimentação e desenvolvimento do ovário na B. germânica **A**. Longitude basal do oocito em fêmeas alimentadas (circulo preto) e fêmeas não alimentadas (circulo branco) durante os primeiros oito dias da vida de adulto. (Osório *et al*., 1998). B Longitude basal do oocito em fêmeas adultas alimentadas, não alimentadas e não alimentadas tratadas com 10 μg em duas doses de HJ. (Piulachs, 1988).	10
Fig. 1.3:	Esquema com alguns dos transcritos da Via de Receptor de Insulina. (Puig and Tjian 2003)	12
Fig. 1.4:	Modelo de regulação da atividade do fator de transcrição FOXO. (Segundo Greer and Brunet, 2005).	15
Fig. 1.5:	Esquema da regulação de FOXO para IR	16
Fig. 2.1:	Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos obtidas para FOXO no organismo modelo *B. germânica*, **A.** temos a seqüência completa de nucleotídeos inicio em vermelho temos a	29

primeira metionina e ao final em verde temos o STOP codon. **B**. temos a seqüência da proteína para FOXO de *B. germânica.*

Fig. 2.2 **A** Comparação das seqüências de aminoácidos pelo programa Clustal X. Em verde podemos ver os aminoácidos em comum entre um organismo e outro. **B** Esquema com porcentagens de similaridade comprando os nucleotídeos entre os organismos. 33

Fig. 2.3 Arvore filogenética comparando a seqüência da *B. germânica* com outros organismos. A arvore filogenética foi construída usando o método de maximim-likehood. A longitude das ramas é proporcional a diferença da seqüência. A barra representa 0.1 substituições por lugar. 36

Fig. 2.4 Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR SIN e o controle AC (Actinas) no tecido Corpora Allata. Para ter como referencia adicionamos o perfil de produção de HJ (segundo Maestro *et al* 1994). 38

Fig. 2.5 Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR e o controle AC (Actinas) no tecido CG. Como referencia acrescentamos os níveis de vitelogenina hemolinfatica durante o primeiro ciclo gonadotrofico. Martin *et al*., 1995 40

Fig. 2.6	Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR e o controle AC (Actinas) no tecido Ovário. Como referencia acrescentamos o perfil da longitude basal do oocito, como medida do desenvolvimento do ovário, segundo Bellés *et al*., 1987.	43
Fig. 2.7	Gráfico demonstrando a diferença entre a longitude basal do oocito (LOB) de animais alimentados (AL+) e animais não alimentados (AL-) de 3 dias de adulto. Medida em milímetros dos oocitos. Diferença significativa estatisticamente (*test-t*, p< 0.0001). Resultados com media +/- SEM	45
Fig 2.8	Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, VIT e o controle AC (Actinas) para fêmeas adultas de 3 dias de *B. germânica* sem alimento (AL-) e alimentados (AL+) no tecido corpo gorduroso	46
Fig. 2.9	Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, e o controle AC (Actinas) para animais sem alimento (AL-) e alimentados (AL+) no tecido Ovário	47
Fig. 2.10	Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, VIT e o controle AC (Actinas) para animais sem alimento (AL-) e alimentados (AL+) e não alimentadas e depois alimentadas por 6 h (AL- 6h) no tecido CG.	49

Fig. 2.11	Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, e o controle AC (Actinas) para animais sem alimento (AL-) e alimentados (AL+) e mantido sem alimento e depois alimentados no tecido Ovário	50
Fig. 3.1	Modelo de inserção da amostra de duplo RNA corresponde a idade do animal, ao primeiro dia de ninfa 6 e novamente ao primeiro dia de adulto	60
Fig. 3.2	Longitude basal do oocito (LOB) em fêmeas adultas de 5 dias de B. germânica tratados com DsRNA control (DsCON) e tratados côn DsRNA para FOXO (DsFOXO) (*test-t*, p< 0.0001). 1 DsCON e 2 DsFOXO. Resultados expressados como media +/- SEM.	62
Fig. 3.3	Níveis de mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, Vg e actinas no CG em fêmeas adultas de 5 dias	63
Fig. 3.4	Níveis de mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, Vg e actinas no OV em fêmeas adultas de 5 dias	64
Fig. 3.5	Valores de LOB em fêmeas adultas de 5 dias de B. germânica alimentadas (AL+) ou não alimentadas (AL-) e tratadas com dsRNA para FOXO (DsFOXO) ou com dsRNA controle (DsCON). Resultados expressados como media +/- SEM. 1-DsCON AL-, 2-DsFOXO AL-, 3-DsCON AL+, 4-DsFOXO AL+	66
Fig 3.6:	Níveis mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, Vg	68

e actinas no CG de fêmeas adultas de B. germânica de 5 dias DsCON e DsFOXO e alimentados e não alimentados.

Fig 3.7 Níveis mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, e actinas no OV de fêmeas adultas de B. germânica de 5 dias DsCON e DsFOXO e alimentados e não alimentados 69

APRESENTAÇÃO

A *Blattella germanica* se caracteriza por ser um inseto com um aspecto repugnante para o ser humano, e como importante disseminadora de organismos patogênicos, como: bactérias (salmonelas), vírus e protozoários, responsáveis por doenças como cólera, difteria, diarréia, toxoplasmose, herpes, gastroenterocolites, lepra, pneumonia, intoxicação alimentar, infecções respiratórias. Habitualmente associadas a más condições de higiene, este inseto pode estar presente nos mais diversos ambientes, infestando os mais diferentes pontos. A maioria vive em regiões tropicais, porém podem ser encontrados nos mais diversos lugares do mundo (pólo norte e pólo sul), devido a sua grande capacidade de adaptação, prova deste fato e que alguns fósseis mostram que as baratas existem a mais de 300 milhões de anos. São citadas mais de 3500 espécies de baratas, sendo que somente 1% do total de espécies é descritas como praga urbana. Devido a sua importância no cenário mundial, e sua existência em quase todos os lugares do mundo nosso trabalho foi desenvolvido para possibilitar um maior conhecimento da estrutura fisiológica e genética da *Blattella germanica.*

O presente trabalho foi desenvolvido em três capítulos, sendo que o primeiro relata os aspectos gerais dos fatores FOXO, “target of rapamycin” (TOR), “receptor de insulina” (IR), S6K, “vitelogenina” (Vg), “hidroximetilglutamil-CoA sintasa (SIN) e “hidroximetilglutamil-CoA-reductasa (RED), e aspectos gerais da fisiologia e estrutura do animal estudado. O segundo capítulo mostra os resultados obtidos, por meio da seqüência realizada, clonando e caracterizarando os homólogos do Fator de transcrição FOXO, em *B. germanica*, com a finalidade de descrever sua função. Neste capitulo tambem medimos os níveis de expressão de FOXO e outros fatores relacionados com as vias de sinalização nutricional, em tecidos implicados na função reprodutiva de fêmeas de *B. Germânica* (corpora allata, corpo gorduroso, e ovário). Estudamos os níveis de expressão desses fatores em indivíduos expostos a alimento e não expostos, com a finalidade de verificar os processos de regulação que ocorre, nessas situações, no primeiro ciclo gonodotrófico da fêmea adulta da *B. germanica* via técnicas de RT-PCR e southern blot, assim como realizamos uma analise com animais ao terceiro

dia de adulto em suas condições normais e na falta de alimento, esse mesmo experimento foi realizado com animais ao quinto dia de adulto com animais alimentados, não alimentados, e não alimentados por 5 dias de adulto e expostos a comida por seis horas. O material biológico utilizado foram adultos de *B. germanica* de 0 a 7 dias. O terceiro capitulo mostra os resultados obtidos pela técnica de RNAi interferência utilizando uma fita dupla de RNA do transcrito FOXO, para o seu silenciamento e assim mediante a técnica de interferência do RNA (RNAi), estudar a função da proteína FOXO em relação aos processos reprodutivos, analisando os fenótipos provocados pela interferência, podendo analisar não somente a sua função no organismo estudado como também verificar se existe alguma outra ligação entre a sua transcrição e a dos outros fatores estudados target of rapamycin (TOR), receptor de insulina (IR), S6K, vitelogenina (Vg), ao quinto dia de adulto da fêmea adulta da *B. germanica.*

CAPITULO 1:

CONSIDERAÇOES GERAIS SOBRE O FATOR DE TRANSCRIÇAO FOXO E A SINALIZAÇAO NUTRICIONAL NA REPRODUÇAO PARA O ORGANISMO *Blattella germanica*.

1.1 OS INSETOS COMO MODELO PARA ESTUDOS DOS SINAIS NUTRICIONAIS

A *Blattella germanica* foi inicialmente descrita por Linnaeus, (1767) a partir de especies coletadas na Dinamarca como Blatta germanica e posteriormente o gênero foi mudado por Caudell em 1903. (Cornwell 1968).

Essas baratas possuem um tamanho pequeno (1,5 a 3,0 cm de comprimento), coloração castanho-amarelada com duas faixas longitudinais mais escuras no pronoto, com machos e fêmeas inteiramente alados. Seu ciclo de vida pode ser completado em 100 dias de vida sob condições favoráveis de desenvolvimento. As fêmeas são ovíparas e carregam a ooteca (resultante do alargamento do 7° esternito abdominal) até quase o momento da eclosão das ninfas produzindo de 4 a 8 ootecas durante sua vida. Dentro de cada ooteca existem de 24 a 28 embriões que se desenvolvem em aproximadamente 28 dias. A ooteca é delgada, com a base e parte superior paralelas, de coloração marrom clara e medindo cerca de 8mm de comprimento, com denteaçoes distintas contornando cada um dos ovos (Bennett *et al*., 1996).

A fêmea pode produzir sua primeira ooteca aos 10 ou 11 dias de idade do estagio adulto reduzindo consideravelmente sua alimentação alguns dias antes da eclosão das ninfas. Uma nova ooteca é formada em duas semanas após a eclosão das ninfas (Bennett *et al*., 1996)

As baratas são onívoras e segundo Brenner (1995), as peças bucais mastigadoras permitiram uma adaptação mais rápida á evolução das fontes de alimentos. A alimentação e seleção do alimento envolve quimioreceptores a qual estão localizados nas antenas e partes das peças bucais. As baratas preferem dietas ricas em carboidratos a dietas ricas em gorduras e proteínas (Cornwell, 1968) e o canibalismo pode ocorrer quando a população é exposta a deficiências nutricionais.

Segundo o tipo de metamorfose que apresentam, os insetos podem ser divididos em três grupos. Os insetos que não passam por metamorfose é por isso se denominam ametabolos. As formas imaturas desses insetos são

morfológicamente idênticas a sua forma adulta, a única exceção de que não possuem genitália funcional. Outro grupo representado pelos insetos que passa por uma metamorfose incompleta, os hemimetabolos, cujas formas imaturas, denominadas ninfas, apresentam morfologia muito similar a da sua forma adulta. As ninfas não possuem genitália funcional, e suas asas somente se transforma em asas funcionais durante a transição para a forma adulta. Por ultimo, os insetos com metamorfose completa, os holometabolos, que apresentam os quatro estágios de desenvolvimento morfológico diferenciados: embrião, larva, pupa e adulto. A peculiaridade desses animais é que larvas e adultos ocupam nichos ecológicos diferentes e, assim não competem pelos mesmos recursos alimentícios, o que permite a estes animais colonizar novos habitat e diversificar rapidamente. Seu êxito e tal que o número de espécies de insetos holometabolos é maior que o resto do que as demais espécies de animais, plantas e fungos juntos.

De acordo com as estratégias reprodutivas, os insetos podem ser divididos em autogênicos, conseguem iniciar ou ter seu primeiro ciclo reprodutivo sem a necessidade de comer, utilizando somente suas reservas e anautogênicos, que necessitam se de alimentar para ter seu primeiro ciclo reprodutivo. Estes termos foram primeiro em 1929 por Rouboud, logo depois muitas espécies de mosquitos foram caracterizadas baseadas nesse tipo de estratégia reprodutiva (Vinagradrova, 1965; Rioux *et al*., 1975).

Junkum *et al*., (2003), realizaram estudos com *Aedes togoi*, que possuem os dois modelos de reprodução, autógeno e anautogeno, analisando várias características como as taxas de reprodução, de oviposiçao, de desenvolvimento do embrião, a facilidade com que o embrião rompe o ovo, as dimensões do ovo, as dimensões das asas tanto de machos como de fêmeas, a longevidade entre machos e fêmeas e a quantidade de ovos depositados para verificar diferenças entre um modelo e outro de reprodução. Os resultados mostraram que a diferença mais significativa entre as subcolonias esta na quantidade de ovos depositados, que é mais baixa em autógenos que em anautogenos o que representa uma desvantagem deste tipo de reprodução.

Comparações matemáticas entre estes dois modelos de reprodução demonstraram suas vantagens e desvantagens. Tsuji *et al*., 1990,

analisaram, matematicamente os tipos de reprodução e verificaram que os autógenos tem mais vantagens do que os anautogenos, com relação ao tempo de busca de um hospedeiro, quantidade de ovos da primeira oviposiçao autógena que é maior do que na oviposiçao anautogena e quanto a taxa de sobrevivência, que nos anautogenos é baixa. Com base nesses resultados não se pode generalizar o melhor modelo de reprodução e sim dizer que, dependendo de variáveis, um modelo pode ser mais eficaz do que o outro.

Um fator importante no estimulo para desenvolvimento, são os determinantes genéticos, são importantes estímulos para o desenvolvimento em determinadas espécies de mosquitos. Analisando alguns experimentos *cross breeding*, entre cepas de autógenos e anautogenos de *Culex pipiens*, verifica-se que em esses mosquitos possuem múltiplos genes que são responsáveis por conferir uma tendência autogênica ou anautogênica, apesar desses genes ainda não se encontrarem totalmente identificados (Spielman, 1957).

Um importante processo fisiológico na reprodução dos insetos é a vitelogênese, com síntese em larga escala e secreção de proteínas vitelogenicas (PV) no corpo gorduroso e seu acumulo nos oocitos em crescimento. Os principais genes de PV ativados durante a vitelogênese são: vitelogenina (Vg), Carboxipeptidase vitelogenica (Vcp), Catepsina B vitelogenica (Vcb) e Lipoforina (Lp). A Vg é a proteina que mais se expressa e se acumula nos oocitos, servindo como uma reserva nutricional para o desenvolvimento dos embriões (Raikhel *et al*., 2002).

O hormônio juvenil (HJ) é uma molécula de natureza sesquiterpenoide, e determina o fenótipo das correspondentes mudas nos insetos. As mudas são determinadas por hormônios do tipo esteroíde, mas em presença de HJ, a muda dá lugar a novas formas imaturas, sendo que em sua ausência inicia-se a metamorfose em insetos holometabolos ou na muda imaginal dos hemimetabolos (Riddiford, 1993, 1994, 1996). O HJ é sintetizado em uma glândula chamada corpora allata (CA). Esta glândula esta situada na porção retro cerebral, unida ao cérebro por nervos.

Em fêmeas adultas da maioria dos insetos, o HJ é o maior controlador da reprodução e regula, entre outros, o processo de expressão da Vg no

corpo gorduroso e a incorporação de Vg nos oocitos em crescimento (Wyatt and Davey, 1996; Engelmann, 1983; Bellés, 2004). (Fig.1.1)

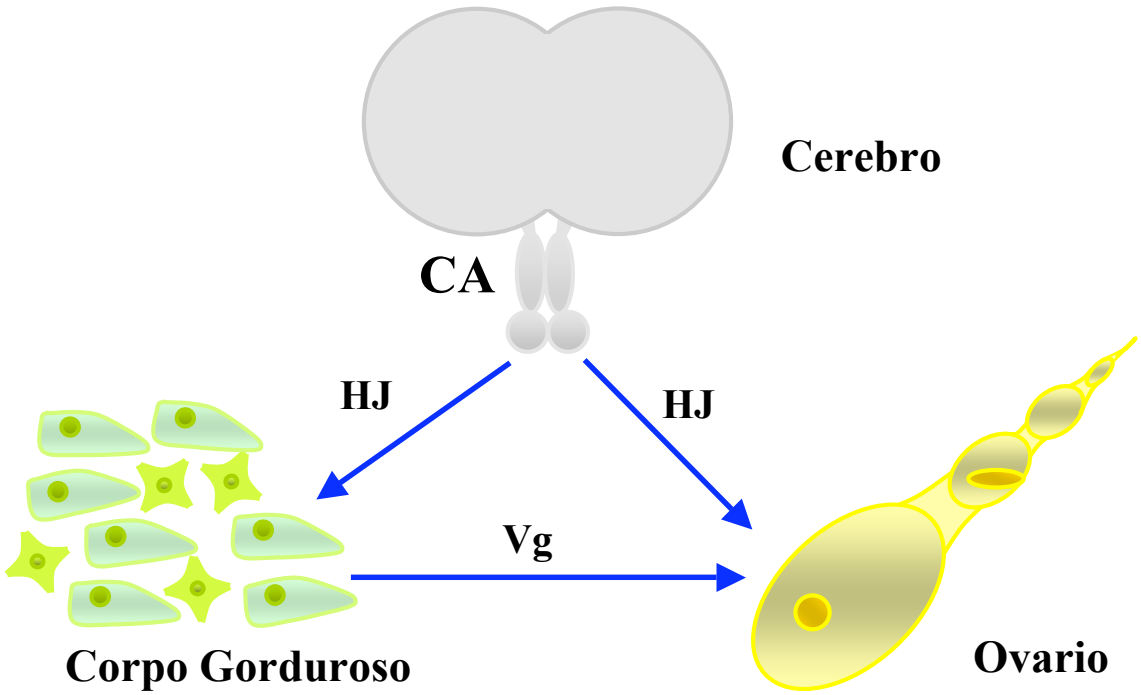


Fig. 1.1: Esquema da interação de Síntese HJ pelo corpora allata (CA), e de vitelogenina (Vg) pelo corpo gorduroso (C.G).

Baratas (Dictyoptera) são um clássico modelo de estudo de vitelogênese, dependente de HJ. Com a extração de CA não há síntese de HJ, e consequentemente bloqueia a produção de Vg, e o crescimento dos oocitos e ooteca. Essas fêmeas quando tratadas com HJ, reverte-se o processo e recupera-se o crescimento dos oocitos (Weaver and Edwards, 1990, Piulachs, 1988).

Na barata *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blatellidae), depois da muda imaginal, os CA das fêmeas começam sintetizar o HJIII, característico

das baratas e da maioria dos insetos (Maestro *et al*., 1994, Camps *et al*.,1987). O HJIII ativa a produção de Vg no CG, a qual é liberada na hemolinfa e incorporada aos oocitos. Alem disso, o HJ induz o processo de patencia nos oocitos, com abertura de espaços entre as células foliculares, que permite a incorporação de Vg e outras proteínas vitelogenicas aos oocitos para seu crescimento.

Ao finalizar o ciclo gonadotrofico que dura entre 7 e 8 dias a síntese de HJ baixa e cessa a produção de Vg, e os oocitos são depositados em uma ooteca, a qual é transportada durante o desenvolvimento dos embriões, de aproximadamente 15 dias. Durante todo esse tempo de transporte da ooteca os CAs, permanecem inativos. Logo depois da eclosão das ninfas recomeça o processo reprodutivo com uma nova síntese de HJ, produção de Vg e crescimento de um novo ciclo de oocitos.

Experimentos realizados com a *B. germanica* confirmam que é um inseto anautogenico, ou seja se não comem não se desenvolvem os oocitos (Osório, 1998) (Fig.1.2A). Experimentos realizados com *B. germanica* confirmam que quando esta espécie não se alimenta, porem recebe tratamento com HJ, os oocitos desenvolvem normalmente (Piulachs, 1988) o que demonstra a ligação da alimentação com a produção de HJ (Fig. 1.2B) . Por esses resultados fazem da *B. germanica* um bom modelo para se estudar a relação entre sinais nutricionais e reprodução.

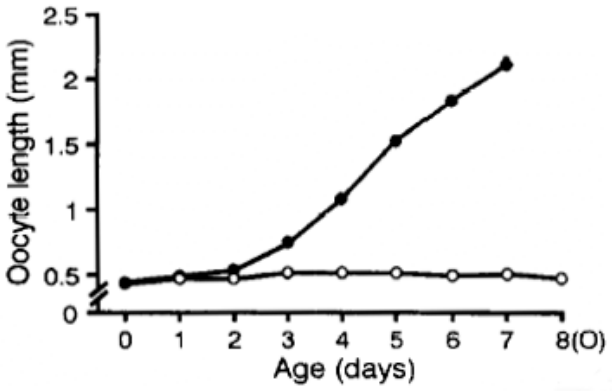
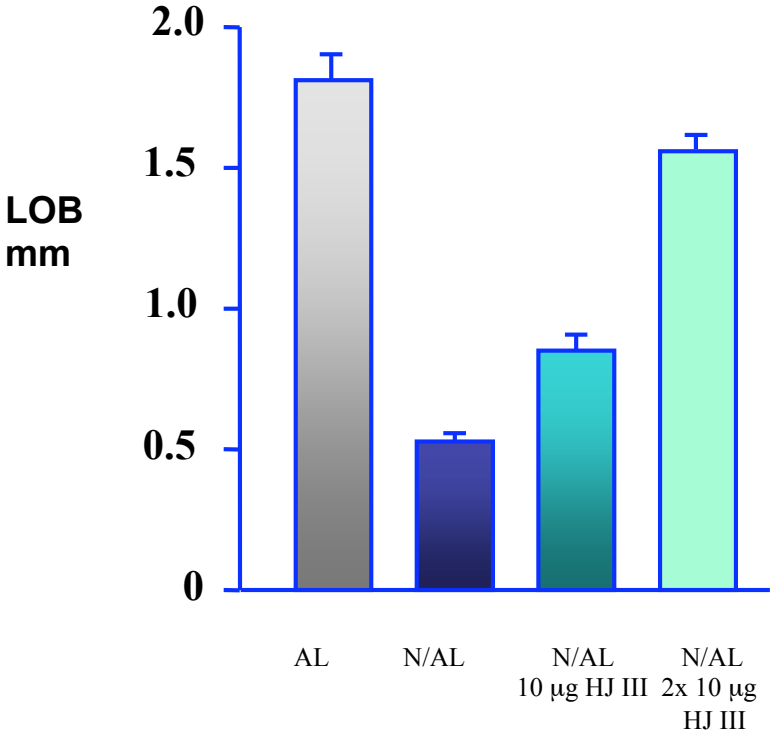


Fig. A



AL: Alimentados N/AL: Nao Alimentados.
N/AL 10 µg HJ III: Nao alimentados com introdução de HJ.
N/AL 2 x 10 µg HJ III: Nao alimentados com introdução de HJ.

Fig.B

Fig.1.2: Relação entre alimentação e desenvolvimento do ovário na B. germânica **A**. Longitude basal do oocito em fêmeas alimentadas (circulo preto) e fêmeas não alimentadas (circulo branco) durante os primeiros oito dias da vida de adulto. (Osório *et al*., 1998). B Longitude basal do oocito em

fêmeas adultas alimentadas, não alimentadas e não alimentadas tratadas com 10 μg em duas doses de HJ. (Piulachs, 1988).

1.2 VIAS METABOLICAS IMPLICADAS NA SINALIZAÇAO NUTRICIONAL

Durante o desenvolvimento de organismos multicelulares, o crescimento é regulado pelo controle do número e tamanho celular para que se obtenha apropriadas dimensões, de acordo com cada organismo. Muitos estudos indicam que o crescimento e a proliferação são coordenados por processos distintos. O crescimento do organismo é controlado pela coordenação entre a progressão do ciclo celular e sobrevivência, que é modulado por quantidades de nutrientes, fatores de crescimento e temperatura. A função reguladora primaria do crescimento em mamíferos é mediada por hormônios de crescimento produzidos pela glândula ptuitaria. Estes hormônios induzem a expressão de fatores de crescimento insulin-like 1 e 2 em tecidos, (IGF1 e IGF2) ligam e ativam IGF receptor (IGFR1). A eliminação da função de IGF1 ou IGF2 ou o seu correspondente receptor resulta em atraso do crescimento e, também, redução do tamanho corporal.

Em *Drosophila* o receptor de insulina (IR) regula o crescimento celular e a proliferação via (fosfoinositol-3-Kinase) (dPI3K/dAkt). Perda da função ou mutações em genes que codificam InR, chico (IRS em *Drosophila*), dp110PI3K ou o SH2 adaptador dp60 e PKB causam um fenótipo muito similar entre eles, para o crescimento. (Brogiolo *et al*., 2001; Verdu *et al*.,1999; Weinkove *et al*., 1999).

A ativação gênica e reprodução tem sido bastante estudados nos insetos e os resultados indicam que estes processos passam pela ativação da via do IR e, também, pela ativação da via do gene "*target of rapamycin*" (*TOR*). Ambas as vias estão correlacionadas e sabe-se que realizam uma ponte entre o estado larval, a ativação metabólica e o crescimento das células (Brogiolo *et al* 2001, Ikeya. *et al* 2002, Zhang *et al*., 2000).

De acordo com Teleman *et al*., (2005); em estudos com *Drosophila,* observou que a quinase TOR é ativada em presença de suficientes nutrientes, fosforilando S6K, dirigindo a síntese protéica e facilitando o

crescimento. Em adição, a Akt, também chamada PKB, media a fosforilaçao de uma efetiva chave transcricional do sinal de Insulina, FOXO, que se mantem inativo por restrição no citoplasma. Em contraste, em condições de falta de nutrientes, a não fosforilaçao de FOXO o transporta para o núcleo realizando sua transcrição que incluem a alta regulação de 4E-BP, com controles de mobilização de lipídios.

A figura 1.3, um esquema com alguns transcritos implicados na tradução do sinal nutricional e suas prováveis funções e ligações entre os mesmos.

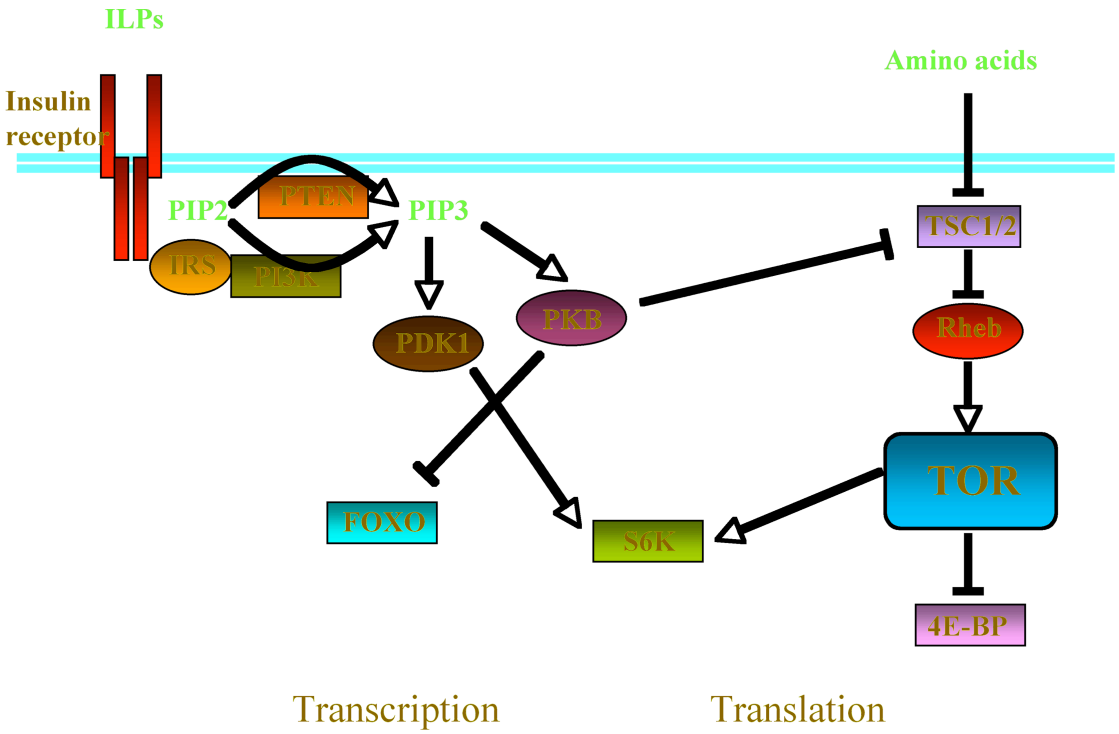


Fig. 1.3: Esquema com alguns dos transcritos da Via de Receptor de Insulina. (Puig and Tjian 2003).

A TOR é um fator que as células utilizam para sensibilidade nutricional, uma proteína quinasa que media diversos efeitos sobre o metabolismo celular incluindo síntese protéica, importe de aminoácidos, biogênese ribossômica e autofagia (Raught., 2001; Schmelzle and Hall., 2000).

A proteína TOR é altamente conservada e sua região C-terminal mostra significante conservação entre espécies relativamente distantes como *Sarcharomyces cervisiae* e *Aedes aegypti*. TOR também está caracterizado no papel como nutriente sensor nos animais primitivos monocelulares como leveduras, assim como em insetos e vertebrados, e também integra sinais de receptor de insulina e insulina-like fator de crescimento como sinal nutricional (Hansen *et al*., 2004).

S6K é fosforilado e ativado por TOR mas também requer fosforilação por PI3K e outras quinasas para total atividade. Em *Drosophila,* S6K tem sido descrito como um importante regulador positivo do tamanho celular e corporal. Mostrou-se letal quando inativado na fase embrionia, e na fase adulta a inativação de S6K produziu tamanho corporal reduzido e um decréscimo no tamanho e numero de células, assim como em fêmeas estéreis (Montagne, *et al*., 1999). Em células de *Drosophila*, se expressa uma simples proteína S6K (dS6K), entretanto, células de mamíferos expressam duas formas dessa quinase, S6K1 e S6K2 (também conhecidas como S6Kα e S6Kβ, respectivamente)(Ruvinsky and Meyuhas, 2006)

1.3 FOXO

As proteínas FOXO pertencem a um subgrupo da família dos fatores de transcrição Forkhead, características por possuírem o domínio “forkhead box” que em humanos contem mais de 100 membros classificados de FOXA ate FOXR, com base na similaridades das seqüências. Essas proteínas possuem diversas funções, como por exemplo, FOXE3 e necessário para o desenvolvimento dos olhos e a FOXP2 tem um papel na aquisição da linguagem. Membros da classe “O” tem como característica fazer parte da regulação da via Insulina/PI3K/AKT.

A família FOXO foi inicialmente identificada em humanos por tres membros dessa família, FOXO1/FKHR, FOXO3/FKHRL1 E FOXO4/AFX, ligados a translocações cromossomais em tumores (Parry *et al*., 1994; Borkhardt *et al*., 1997; Anderson *et al*., 1998). Estes dados podem sugerir que fatores de transcrição FOXO tem um papel importante no crescimento e desenvolvimento de tumores. Os Invertebrados possuem somente uma proteína da família FOXO denominado Daf 16, identificado em *C.elegans*, e dFOXO em *Drosophila*.

O fator de transcrição FOXO é um dos principais substratos da proteína quinasa Akt em resposta à estimulação celular por fatores de crescimento ou insulina. Em presença de insulina e fatores de crescimento, a proteína FOXO é fosforilada, mantendo-se inativa no citoplasma, e em ausência de fatores de crescimento, a FOXO é desfosforilada e transportada ao núcleo onde regula uma serie de genes alvos assim como, também promove o atraso do ciclo celular, resistência ao stress, ou apoptose. Em resposta ao stress, a proteína FOXO permanece localizada no núcleo permitindo uma resposta adaptativa à estimulação por stress, Fig. 1.4 (Greer and Brunet, 2005).

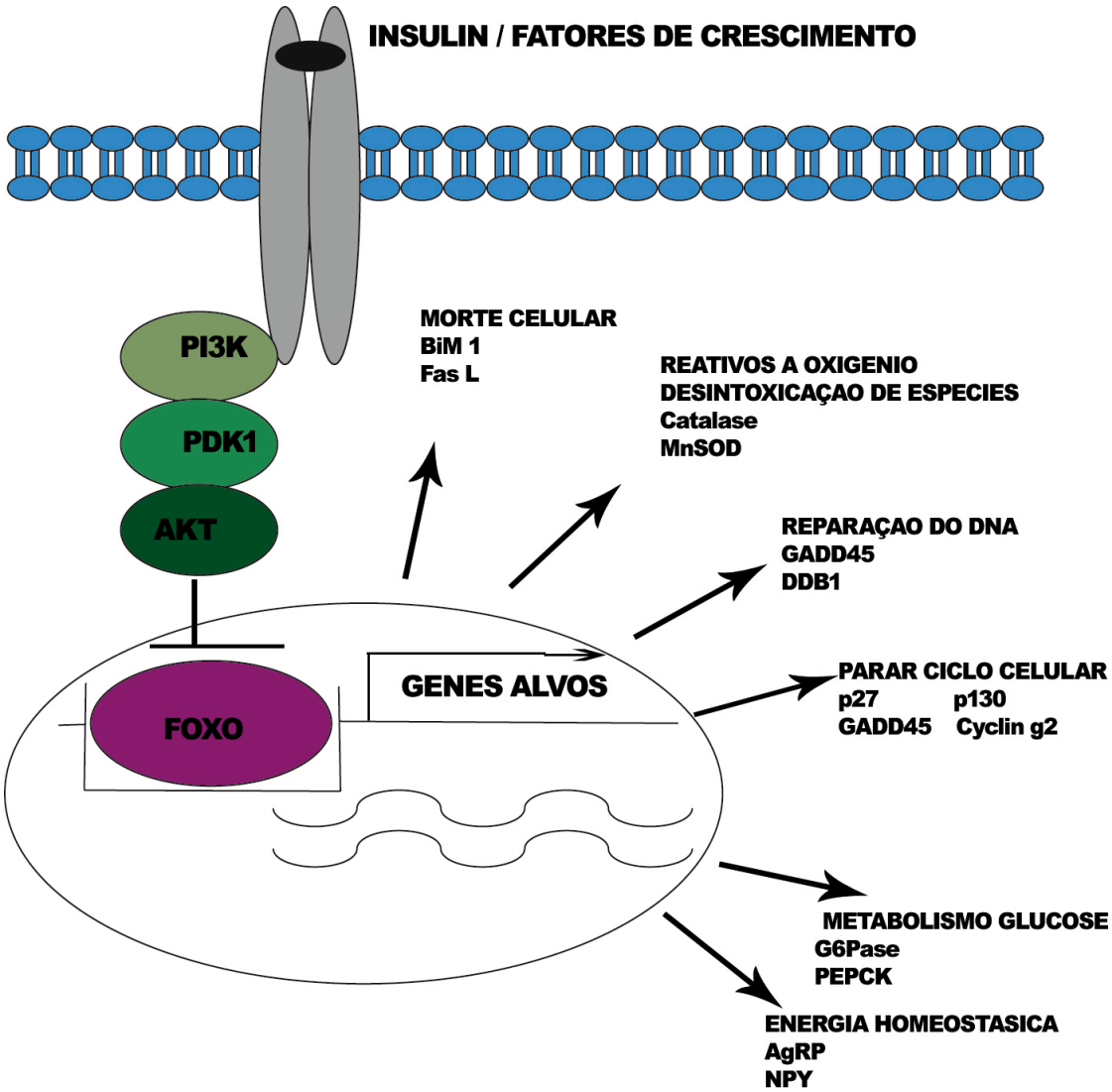


Fig. 1.4: Modelo de regulação da atividade do fator de transcrição FOXO. (Segundo Greer and Brunet, 2005).

Fatores FOXO podem iniciar apoptose pela ativação da transcrição de FasL, o ligante para a via de morte celular Faz dependente e por ativação do pré apoptotico Bcl-2 membro da família Bim. Os fatores FOXO podem promover a parada do ciclo celular, inibindo p27Kip1 para induzir G1, ou parando GADD45 para induzir G2. Também estão envolvidos, também, na resistência ao stress via auto-regulação da catalase e MnSOD. Outra de suas funções seria a reparação do DNA danificado por alta regulação de genes como GADD45 e DDB1.

Tanto em *Drosophila* ou em mamíferos, o receptor de Insulina (IR) regula sua própria síntese por um mecanismo de feedback, pela ação do

fator dFOXO/FOXO1. Em *Drosophila,* dFOXO é responsável pela ativação da transcrição de IR, e em condições nutricionais pode modular este efeito. Em *Drosophila,* uma analise demonstrou que, ocorre regulação do mRNA de IR no tipo selvagem mais não em dFOXO deficientes. Interessantemente, a insulina é capaz de reverter este efeito. Por tanto dFOXO/ FOXO 1 atua como um sensor de insulina para ativar seu sinal permitindo uma rápida resposta para o hormônio depois da alimentação pela acumulação de IR produzido durante o período de não alimentação. A via de insulina está conservada na evolução entre os metazoos, constituindo-se em exemplo de uma chave de mecanismos regulatorios envolvidos em processos que permitem a esses organismos se adaptarem a mudanças bruscas com relação a disponibilidade de nutrientes (Puig and Tjian, 2005).

dFOXO/FOXO1 regula o Receptor de Insulina

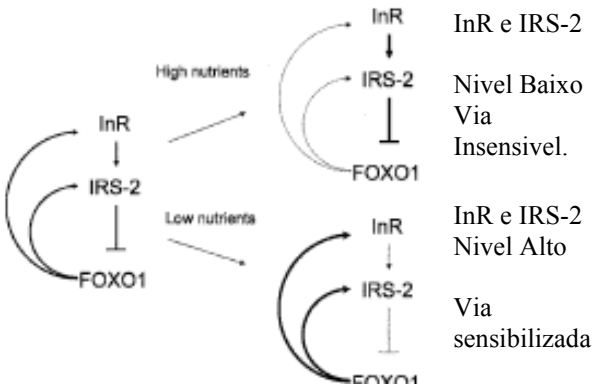


Fig. 1.5: Esquema da regulação de FOXO para IR.

A figura 1.5, apresenta um esquema do mecanismo proposto para a regulação e sensibilização da via de sinalização IR através de um mecanismo feedback, que envolve regulação de IR e IRS-2 a sensibilização por nutrientes com uma alta velocidade de resposta. Quando há nutrientes na via de IR, abaixa a atividade de FOXO 1 e os níveis de IR e IRS-2 diminuem, com o sinal vindo através do IR. Quando as condições de nutrientes mudam, FOXO1 e ativado e sensibiliza a via por ativação da transcrição de IR e IRS2.

É sugerido, também que os fatores FOX podem estar envolvidos na regulação da reprodução do mosquito. *In vitro* FOXA expressa em *Drosophila* pode-se ligar ao promotor do gene de Vg e, também, junto com outros reguladores transcricionais, pode coordenar a expressão especifica de genes YPP no corpo gorduroso dos mosquitos (Kokoza *et al*., 2001)

1.4. OBJETIVOS

Os objetivos propostos para esse trabalho, são:

- Clonar e caracterizar os homólogos do Fator de transcrição FOXO, em *B. germanica*, com a finalidade de descrever sua função.

- Medir os níveis de expressão de FOXO e outros fatores relacionados com as vias de sinalização nutricional, em tecidos implicados na função reprodutiva de fêmeas de *B. Germânica* (corpora allata, corpo gorduroso, e ovário).

- Estudar os níveis de expressão desses fatores em indivíduos expostos a alimento e não expostos, com a finalidade de verificar os processos de regulação que ocorre, nessas situações. Estudar modelos com indivíduos mantidos sem alimento e realimentados, para implementar o estudo da função fisiológica de FOXO.

- Mediante técnicas de interferência do RNA (RNAi), estudar a função da proteína FOXO em relação aos processos reprodutivos, analisando os fenótipos provocados pela interferência.

1.5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Anderson, K.E., Coadwell, J., Stephens, L.R. and Hawkins, P.T. (1998). *Curr. Biol*. **8**, pp 684-691.

Bellés X. (2004). Vitellogenesis directed by juvenile hormone. In: Raikhel A, editor Reproductive biology of invertebrates. Progress in vitellogenesis, XII, part B: pp 157–197. Science Publisher, Inc.

Bennet, G.W.;Owens, J.M.;Coorrigan, R.M (1996). Guia cientifica de Truman para operaciones de control de plagas. 4.ed. Trad. De Trad. De R. Ituarte. Cleveland: Advanstar Comunications. 510p.

Borkhardt, A., Repp, R., Hass, O.A., Leis, T., Harbott, J., Kreuder, J., Hammermann, J., Henn, T and Lampert, F. (1997). *Oncogene*, **14**, pp 195-202.

Brenner, R.J. Economics and medical importance of German cockroahes. (1995) In: Rust, M.K.; Owens, J.M.; Reierson, D.A. Understanding and controlling the German cockroach. Cambridge: Oxford University Press. pp. 77-92.

Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., and Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol*. **11**: pp 213-221.

Camps F, Casas J, Sánchez FJ, Messeguer A. (1987). Identification of juvenile hormone III in the hemolymph of Blattella germanica adult females by gas chromatography–mass spectrometry. Archives of Insect Biochemistry and Physiology **6**: pp 181-189.

Cornwell, P.B. (1968). The cockroach: a laboratory insect and an industrial pest. London: The Rentokil Library. v.**1,** pp 391p.

Engelmann, F. (1983). Vitellogenesis controled by juvenile hormone. In Endocrinology of insects, Alan R. Liss., pp 259-270.

Greer, E., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogenes* **24**, pp 7410-7425.

Hansen, I.A., Attardo, G. M., Park, J.H., Peng, Q., Raikhel, A.S., (2004). Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. Proc. *Natl. Acad.Sci*. USA **101**, pp 10626-10631.

Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., and Hafen, E. (2002). Nutrient-dependet expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in Drosophila. *Curr. Biol*. **12**: pp 1293.

Junkum, A., Choochote, W., Jitpakdi, A., Leemingsawat, S., Komalamisra N., Jariyapara, N., Boonyatakorn, C. (2003). Comparative studies on the biology and filarial susceptibility of selected blood-feeding and autogenous Aedes togoi sub-colonies. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*.

Kokoza, V., A. Ahmed, E.A. Wimmer & A.S. Raikhel. (2001)**.** Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the *piggyBac* transposable element vector pBac[3xP3-EGFP afm].Insect Biochem. Mol. Biol. **31** 1137-1143.

Maestro, J. L., Danes M.D., Piulachs M. D., Cassier P. and Belles X. (1994). Juvenile hormone inhibition in corpora allata from ovariectomized Blattella germanica. *Physiological Entomology* **19**, pp 342-348.

Montagne, J., Stewart, M., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S., and Thomas, G. (1999). Drosophila S6 Kinase: A regulator of cell size. *Science* **285**, pp 2126-2129.

Osorio, S., Piulachs, M.D., Bellés, X. (1998). Feeding and Activation of Corpora Allata in the Cockroach Blattella germanica (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). J. insect Physiol. pp 31-38.

Parry, P., Wei, Y. , and Evans, G. (1994). *Genes Chromosomes Cancer*, **11**: pp 79-84.

Piulachs M.D. (1988). Accion gonadotrofica de la hormona juvenile en hembras de Blattella germanica alactectomizadas o sometidas a ayuno prolongado. *Miscel.lania Zoologica (Barcelona)* **12**, pp 121-124.

Puig, O. and Tjian, R. (2005). Transcriptional feedback control of insulin recepor by dFOXO/FOXO1. *Genes & dev.* **19**: pp 2435-2446.

Raikhel, A.S., Kokoza, V.A., Zhu, J., Martin, D., Wang, S.F., li, C., Sun, G., Ahmed, A., Dittmer, N., Attardo, G., (2002). Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. Insect Biochem. *Mol. Biol*. **32**, pp 1275-1286.

Raught, B., Gingras, A. C. and Sonenberg, N. (2001). The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **98**: pp 7037-7044.

Riddiford, L.M. (1993). The development of Drosophila melanogaster. Hormones and Drosophila Development. pp 899-939.

Riddiford, L.M., (1994). Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect Physiol.* **24**, pp. 213–274.

Riddiford, L.M., (1996). Juvenile hormone: the status of the “status quo” action. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **32**, pp. 271–286.

Rioux, J.A., Crost, H., Pech-Perieres, J., Guilvad, E., Belmonte, A., (1975). L’autogenese chez le moustique commun *Culex pipiens*. *Ann Parasit. Hum*. Comp. **50**, pp 134-140.

Ruvinsky, I. and Meyuhas O. (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Biochem. Sciences*.

Schmelzle, T. and Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**: 253-262.

Spielman, A., (1957). The inheritance of autogeny in the Culex pipiens complex of mosquitoes. Am. J. *Hyg*. **65**, 404-425.

Teleman, A.A., Chen, Y.W., and Cohen, S.M. (2005). 4E-BP function as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes & dev*. **19**: 1844-1848.

Tsuji, K., (1990). Reproductive division of labour related to age in the Japanese queenless ant,*Pristomyrmex pungens.Anim. Behav.* ***39*** :843–849

Verdu, J., Buratovich, M.A., Wilder, E.L., and Birnbaum, M.J. (1999). Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in *Drosophila* by Akt/PKB. *Nat. Cell Biol*. **1:** 500-506.

Vinogradova, E.B., (1965). Autogenous development of ovaries in blood-sucking mosquitoes. *Zoologische Zhurnal* **44**, 210-219.

Zhang, P., Zhang, X., Iwama, A., Yu, C., Smith, K.A., Mueller, B.U., Narravula, S., Torbett, B.E., Orkin, S.H., Tenen, D.G., (2000). PU. 1

inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. Blood **96**, 2641-2648.

Weaver and Edwards, (1990). R.J. Weaver and J.P. Edwards, The role of the corpora allata and associated nerves in the regulation of ovarian cycles in the oviparous cockroach *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* **36**, pp. 51–59.

Weinkove, D., Neufeld, T.P., Twardzik, T., Waterfield, M.D., Leevers, S.J., 1999. Regulation of imaginal disc cell size, cell number and organ size by Drosophila class I(A) phosphoinositide 3-Kinase and its adaptor. *Curr Biol* **9**: 1019-1029.

Wyatt, G.R. and Davey, K.G., 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Adv. Insect Physiol.* **26**, pp. 1–155

CAPITULO 2:

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO cDNA DE FOXO, CICLOS DE EXPRESSÃO E EXPRESSAO COM ANIMAIS ALIMENTADOS E NAO ALIMENTADOS

2.1 RESUMO

A barata *Blattella germanica* é um clássico modelo de estudo de vitelogeneses dependente HJ os experimentos realizados com este inseto confirmam que é um inseto anautogenico, sendo que se este não come não se desenvolve seus oocitos Esse animal possui um período de 8 dias como adulto no qual ocorrem transformações reprodutivas, como crescimento dos oocitos e maturação dos mesmo assim como mudanças na alimentação na *B. germânica.* Tanto a expressão gênica como a reprodução vem sendo bastante estudados nos insetos e os resultados indicam que estes processos passam pela ativação da via do IR e, também, pela ativação da via do gene "*target of rapamycin*" (*TOR*). Ambas as vias estão correlacionadas e sabe se que realizam uma ponte entre o estado larval a ativação metabólica e o crescimento das células. O fator de transcrição FOXO e um dos principais substratos da proteína quinasa Akt em resposta a estimulação celular por fatores de crescimento ou insulina. Com a clonagem de FOXO em *B. germânica*, com o objetivo obter a seqüência completa e de estudar sua regulação por transcrição, realizamos ciclos de expressão de mRNAs para diferentes tecidos e diferentes fatores da via de insulina FOXO, "target of rapamycin" (TOR), "receptor de insulina" (IR), S6K, " vitelogenina" (Vg), "hidroximetilglutamil-CoA sintasa (SIN) e "hidroximetilglutamil-CoA-reductasa (RED) em três tecidos diferentes, corpora allata (CA), ovário (OV) e corpo gorduroso (CG), via técnica de RT-PCR e Southern Blot para quantificar a expressão, sendo que os transcritos demonstraram, diferentes padrões de expressão para os diferentes tecidos, assim também analisamos o fator alimentação para diferentes dias de adulto comprovando uma diferente expressão dos transcritos entre animais alimentados e não alimentados.

Palavras-chave: *Blattella germanica*, FOXO, TOR, IR, S6K, Vg, SIN, RED RT-PCR, Southern Blot, regulação por transcrição.

2.2. INTRODUÇAO

O Fator de Transcrição FOXO foi primeiramente descrito em *C. elegans* como Daf-16, uma mutação que pode reprimir ou aumentar o nivel de lipídeos e a longevidade, causado pela perda de Daf-2 (ortologo de IR em *C. elegans*) (Lin *et al*., 1997; Ogg *et al*., 1997). Em humanos são descritas três isoformas para FOXO: FOXO I (FKHR), FOXO 3a (FKHRLI) e FOXO4 (AFX) que controlam a homeostases da glicose em ambos tecidos peritonais e células β do pâncreas (Accili and Arden, 2004). Em *Drosophila* o gene dFOXO consiste de 10 exons, e uma proteína de 600 aa, com 27% de similaridade com a proteína FOXO 3a, e 82% idêntica em seus aminoácidos. Alem disso dFOXO codifica uma proteína que contem sites conservados fosforilados PKB (Alessi *et al* 1996). O sitio destes três sites consensos PKB relativos à domínios forkhead esta conservado entre a proteína FOXO de mamíferos, DAF-16, e dFOXO de *Drosophila* (Junger *et al*., 2003).

Os CAs são glândulas situadas na posição retro cerebral e unidas por conexões nervosas ao cérebro, ao sistema nervoso central e ao sistema nervoso gástrico. A presença de HJIII, (forma de HJ das baratas e da maioria dos insetos), durante a mudança de fases determina que a mudança produza uma nova ninfa, entretanto ausência de HJ e de uma nova ninfa essa, se transforma em adulto. Em fêmeas adultas o HJ ativa a produção de Vg no CG e sua absorção nos oocitos para seu crescimento

A função do CG é armazenar e metabolizar proteínas durante a maioria dos ciclos vitais. As proteínas vitelogenicas, sao processadas e secretadas, pelo CG, na hemolinfa onde são absorvidas para o desenvolvimento dos oocitos, mediado via receptor de endocitoses (Raikhel, 1992).

O OV é o órgão responsável pela reprodução e maturação dos oocitos. O HJ induz o processo de patencia nos oocitos, no qual se abrem espaços entre as células foliculares que permite a incorporação de Vg e outras proteínas vitelogenicas aos oocitos em crescimento.

De acordo com Teleman *et al*., 2005, em estudos com *Drosophila* a quinase TOR é ativada em presença de suficientes nutrientes, fosforila S6K,

dirigindo a síntese protéica e facilitando o crescimento. Em adição a AKt media a fosforilaçao de uma efetiva chave transcricional do sinal de Insulina, FOXO, que se mantem inativo, por restrição, e fosforilado no citoplasma. Em condições de restrição nutricional, FOXO é desfosforilado e é transportado ao núcleo onde ativa a transcrição de diferentes fatores.

Junger *et al*., (2003), propuseram que, em resposta ao estres celular, como a privação de nutrientes, a proteina dFOXO de *Drosophila* está ativada e inibindo crescimento através da ação em genes alvos como 4E-BP. Gershman *et al*., (2006) sugerem que dFOXO pode estar ativado em fêmeas de *Drosophila* privadas de alimento e pode estar relativamente inativado em fêmeas adultas alimentadas. Verificaram que genes alvo de dFOXO correspondem a 28% do total de genes nutrientes - dependentes, implicando dFOXO como o maior fator na regulação transcricional em resposta a nutrientes. Quando o animal se encontra em situações de restrição de nutrientes, dFOXO se encontra ativo e diminui a transcrição de peptídeos insulin-like, e a oogeneses fica totalmente reprimida em todas as fêmeas. Quando as fêmeas são alimentadas, nas 12 horas primeiras horas ocorrem uma resposta rápida produzindo a secreção de insulina e a vitelogênese é ativada. Essa análise descreve uma resposta transcricional de redes metabólicas e fisiológicas entre as primeiras 12 horas.

Em fêmeas adultas de *B. germanica* não se verifica o crescimento dos oocitos quando o animal não recebe alimento e, também, foi demonstrado que esse alimento deve ter uma concentração mínima de proteína (Osorio *et al* 1998, Schal *et al*., 1993).

2.3. MATERIAIS E METODOS

A clonagem do homologo FOXO em *B. germanica* foi realizada pela técnica RT-PCR seguido por 5' e 3' RACE. Em primeiro lugar foram desenhados primers degenerados com base em seqüências conservadas descritas de *D. melanogaster, A. aegypti, M. sexta* e *A. mellifera.* Com a RT-PCR a partir de cDNA de células UM-BGE-1 conseguimos o primeiro clone de 240 pb, esta seqüência então foi analisada por alinhamento com outras seqüências via Blast, confirmando que se tratava de um fragmento de FOXO. A partir de esta técnica de RT-PCR, mais as técnicas 5' e 3', foram seqüenciados vários trechos ate se obter a cauda poli A. As extrações de RNA com o Kit de Sigma GenElute Mammalian Total RNA seguindo as instruções do fabricante sendo que a clonagem dos homólogos de FOXO em *B. germanica* foi realizada com PCRs, e complementadas com 5' e 3' RACE, (*Rapid Amplification of cDNA End*), seguindo instruções do 5' RACE, Version 2.0 (Invitrogen), e seguindo as instruções do 3' RACE f, Version 2.0 (Invitrogen), todas as PCRs foram realizadas com a enzima Accutaq (Sigma), segundo normas do fabricante, a partir de 2µg de RNA total obtido de células UM-BGE-1 de *B. germânica*, a eletroforese se realizou em gel de agarose 1% (p/v), preparados com tampão TBE 0,5X (Sambrook *et al*., 1989). Todas os fragmentos de DNA conseguidos por PCR foram ligados em pSTBlue-I seguindo as instruções do pAcceptor Vector Kit (Novagen). As transformações do DNA plasmidico foram realizadas com células competentes Novablue de *E.coli* (Novagen), seguindo o procedimento descrito por Sambrook (1989).

A purificação do DNA plasmidico se realizou seguindo as instruções de Gen Elute Plasmid Miniprep KIT (SIGMA) a partir de cultivos líquidos incubados overnight a 37°C com agitação constante (250 r.p.m).

O sequenciamento do DNA se realizou com o método de terminação da cadeia de dideoxinucleotideos. Os diferentes clones foram seqüenciados em ambos os sentidos utilizando os oligonucleotideos T7 e SP6 (presentes no vetor de clonagem), assim como outros internos específicos, com o sistema ABI de sequenciamento automática por fluorescência. Estas

seqüências se realizaram no Servicio de sequencimento de DNA do Instituto de Biologia Molecular de Barcelona do CSIC de Barcelona.

As seqüências de proteínas foram alinhadas usando ClustI X (Thompsom *et al*., 1997). As regiões divergentes ou deficientes alinhadas foram eliminadas usando Gblocks 0.9 1b (Castresana, 2000).

Depois de obter e confirmar a seqüência para FOXO passamos para a caracterização da expressão de mRNAs para os transcritos FOXO, TOR, IR, S6K, Vg, SIN e RED em três tecidos diferentes, corpora allata (CA), ovário (OV) e corpo gorduroso (CG) no primeiro ciclo gonodotrofico da fêmea adulta da *B. germanica*. As seqüências de S6K, TOR, SIN, RED, Vg e IR em *B. germanica*, foram clonadas no laboratório do CSIC, Barcelona, e cedidas pelo Prof. Jose Luis Maestro, para isso foram utilizados fêmeas de *B. germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae), Depois de extraídos os tecidos foram realizados as extrações dos ácidos ribonucléicos e sua quantificação.

Para determinar as quantidades relativas mRNAs se realizou a técnica de RT-PCR semiquantitativa. Previamente a retro transcrição o RNA foi tratado com DNasa para eliminar qualquer traço de DNA genomico. A eletroforese foi realizada seguindo instruções de Sambrook *et al*., 1989. Logo depois foram realizados os experimentos com a técnica Southern blot seguindo instruções do fabricante Amersham Pharmacia.

Foram desenhados modelos de estudos com fêmeas *B. germanica,* no qual foram retirados os alimentos, uma ração canina, comida utilizada como alimento diário no insetario, lugar aonde e mantida a colônia de *B. germânica,* no ultimo dia de larva da *B. germanica* sendo que estes animais foram mantidos sem alimento ate o terceiro dia de adulto, tendo somente água. Ao completar 3 dias de adulto, foram realizadas as dissecçoes dos tecidos do corpo gorduroso e ovário, estes tecidos foram congelados em freezer -80 C, e posteriormente foram realizadas extrações de RNA, e analises das expressões destes transcritos via técnicas de RT-PCR e Sourthern Blot. Apos o primeiro experimento com animais alimentados foram desenhados outros experimentos com, fêmeas de *B. germanica,* no qual os animais foram divididos em três grupos: 2 compartimentos contendo 4 animais em cada compartimento foram retirados os alimentos, no ultimo dia de larva sendo que estes animais foram mantidos sem alimento ate o quinto

dia de adulto, com somente água. O terceiro compartimento que pertence a este experimento possuía a mesma quantidade de animais sob as mesmas condições, mas com nutrientes como controles. Ao completar 5 dias de adulto, foram realizadas as dessecações dos tecidos do corpo gorduroso e ovário, pela manha dos botes de animais alimentados e não alimentados estes tecidos foram congelados em freezer -80 C, e posteriormente foram realizadas extrações de RNA, e analises das expressões destes transcritos via técnicas de RT-PCR e Sourthern Blot. Ao terceiro compartimento foram colocados alimentos e mantidos desta maneira por 6 horas, ao final desse período foram realizadas as dessecações e analises descrita acima, para os outros animais.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSAO

2.4.1 CLONAGEM E CARACTERIZAÇãO DO cDNA DE FOXO

Abaixo temos a seqüência para FOXO em *B. germanica*, com a pauta de leitura escolhida.

"TGAAGTGAGTGCGTGCTAGACTTATGTGTTATTTCTCTTCTACGAAAATTAGCACCTGTTC
ACCCTAGAGGGGGCGTGTTCGTAGTTGACATTGACAGTTTTATAAC**ATG**ATGGAACCAACGC
TCGCTGAACTGGACTCTGGGTTCGAGCCTCAGCAACGTGCCAGGTCGAACACGTGGCCCTTG
CCAAGACCTGATAATTTCGTTGATATAAAAGAGGAACCGGGGATAAAATGTCCCGGAGGGGT
GGTTCTCCCTTGCGGGGGTGTGATGGGCCCGGAAGGCACCCTGGCGGGCGGTCTCCAGCTGC
CCACGGCCACCAAGAAGAACTCAAGTCGCCGCAACGCGTGGGGCAACTTGTCCTATGCAGAT
CTCATCACGCAGGCCATCACCTCCGCTCCTGAGAAGAGGCTCACGCTCTCGCAGATCTACGA
ATGGATGGTCCAGAACGTGCCCTACTTTAAGGACAAGGGGGACAGCAACAGCTCGGCCGGAT
GGAAGAACTCCATCAGACACAACCTGTCGTTACACAACCGCTTCATGCGCGTCCAAAATGAA
GGCACAGGAAAATCATCCTGGTGGATGATTAACCCGGACGCCAAACCCGGAAAAAGCGCTCG
ACGCAGAGCGACTTCAATGGAGACTTCGAAATTTGAAAAACGTCGTGGAAGAGTCAAGAAGA
AGGTGGATGCCTTGAGGAACGGCTTACAAGCCGCCACTGACGCTACACCGAGCCCTAGCTCC
TCAATTTCGGAAGGACTGGACCTGTTCCCGGATTCGCCTCTTCACAACACTAGCTTCCAATT
GAGTCCAGATTTCCGGCCAAGGGCATCGTCTAATGCGTCCTCTTGCGGCCGGCTCTCACCTA
TTCCGGCCGTCCTGGGGGAACCCGATTGGGGGTCACCTTCACCATACACTGGAGGCTATGGA
CCAGAGCAGCTGGCTGGCAACCTGGCCGAGGGGATGAAGCTTCAAGGTGGAGAGTTCCTACA
GACTTACGGAGGCAGCAACGGGGGGCAGCAGCAGGCACAGCCCCCGCCACCCCCGTACCAGC
CGACTTACGACTTCAGTGGCGGCTCCCGCCTGGGCCAGCACGACCTGAGTACGCTCCACGCA
GCGTCCCCTTACGGCCTCTCGCAGTGCCACCTGCACAGGATGCAGCCGTGTTCGTGCCACTT
ACAGCAACAGCAGCACTCGCCCGCGGGGATGTCCCCTTCGTATCCACAGTCCGAGCCGTCCC
CAGACCCCATGAGCGGGCAGCAGCAGAACCCACCGGCGCCCCAGTTCATGCCGCCCCGTGCC
TTGCGCCCTCCGCCTCCAGGGGGCAGTAACCACAGCGAGAGCCCACCGGACACCCCAACGCC
CTCCACGATGATGGGCCAGCTCATGGGCGCCCTAAACAACAGCACACTCCTGGACGATCTTA
ACCTCAACATCGAGACTCTCCACGGGGGCTTTGATTGCAATGTGGACGAGGTCATCAAGCAC
GAGTTGAGCATGGACGGGAGCCTGGACTTCAACTTCTCCCAGCACAACCATCACCATAACCA
TCACCACCAAGCGACTTCGGGAGCGGGGAGCGTCCCTCAGAACCAAGAACTGCAACAGGGCG
TAGTCCCCCAGCAAGCGACGAGTTCTTACTCCACTACTGTGTCCACGGGGCCATCTTGGGTC

CACTAACAAACATAGAAGAAGATGTTTATCAAAATATGTTGGTGACTGCATTGTGTATTGAA
GTTGTACAATAGAAAGAGAGGGAAAAAAAAAAAAAAAA”

A

MMEPTLAELDSGFEPQQRARSNTWPLPRPDNFVDIKEEPGIKCPGGVVLPCG
GVMGPEGTLAGGLQLPTATKKNSSRRNAWGNLSYADLITQAITSAPEKRLTLSQIYE
WMVQNVPYFKDKGDSNSSAGWKNSIRHNLSLHNRFMRVQNEGTGKSSWWMINPDAKP
GKSARRRATSMETSKFEKRRGRVKKKVDALRNGLQAATDATPSPSSSISEGLDLFPD
SPLHNTSFQLSPDFRPRASSNASSCGRLSPIPAVLGEPDWGSPSPYTGGYGPEQLAG
NLAEGMKLQGGEFLQTYGGSNGGQQQAQPPPPPYQPTYDFSGGSRLGQHDLSTLHAA
SPYGLSQCHLHRMQPCSCHLQQQQHSPAGMSPSYPQSEPSPDPMSGQQQNPPAPQFM
PPRALRPPPPGGSNHSESPPDTPTPSTMMGQLMGALNNSTLLDDLNLNIETLHGGFD
CNVDEVIKHELSMDGSLDFNFSQHNHHHNHHHQATSGAGSVPQNQELQQGVVPQQAT
SSYSTTVSTGPSWVH.

B

Fig. 2.1: Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos obtidas para FOXO no organismo modelo *B. germânica*, **A.** temos a seqüência completa de nucleotídeos inicio em vermelho temos a primeira metionina e ao final em verde temos o STOP codon. **B**. temos a seqüência da proteína para FOXO de *B. germânica.*

O cDNA de FOXO da *B. germânica* constava de 1773 nucleotídeos e sua proteína 536 aminoácidos.

Com a ajuda do programa Clustal X, foi possível calcular as similaridades da seqüência de nucleotídeos entre *B. germanica* e os organismos *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, *Nasonia vitripennis*, *Tribolium castaneum*, *Homo sapiens*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis*, FOXO4 e FOXO1. Assim como as porcentagens dessas similaridades.

Abaixo vemos a figura com as seqüências de FOXO para *B. germanica* comparada com as outras seqüências de todos os outros organismos, assim também como as porcentagens das similaridades.

```
            1                                                  50
     Aedes  .MDSFGSPWP ASPRGGLEGL SNDGVPMDAL AELR..DGAF EP.QTRARSN
Drosophila  MMDGYAQEWP RLTH...... TDNGLAMDQL GGDLPLDVGF EP.QTRARSN
 Blattella  .......... .......... .....MMEPT LA..ELDSGF EP.QQRARSN
   Nasonia  .MD....... .........F AESSAMMDSM GGGYDLDSGF EP.QTRARSN
 Tribolium  .......... .......... ....MNLNIM EPLAELDG.F EP.QTRARSN
      Homo  .......... .......MAE AP.ASPAPLS PLEVELDPEF EP.QSRPRSC
    Gallus  .......... .MTPLDPYQE VPRGSGAPRS DGEQRAGIRA PLGASRRRRD
   Xenopus  .......... .......MAE ALPPRSPP.. .DDVDIDPDF GP.QSRPRSC
     FOXO4  .......... ........MD PGNENSATEA AAIIDLDPDF EP.QSRPRSC
     FOXO1  .......... .......MAE AP........ .QVVEIDPDF EP.LPRPRSC

            51                                                100
     Aedes  TWPLPRPENF VEPEAE.... .......... .......... ..........
Drosophila  TWPCPRPENF VEPTDE.... .......... .......... ..........
 Blattella  TWPLPRPDNF VDIKEEP... .......... .......... ..........
   Nasonia  TWPCPRPDSF PDGTG..... .......... .......... ..........
 Tribolium  TWPLPRPENY VEPNE..... .......... .......... ..........
      Homo  TWPLQRPELQ ASPAK..... PSGETAADSM IPEEEDDEDD EDGGGRAGSA
    Gallus  SSASPRDERR TARGREGTRR PPRPGTARTQ PERPHGVKKH KQTHTRTAER
   Xenopus  TWPLQRLDSQ GSPGK..... PNSGAGEAAD TSSMIPEEED DDYEGAASTA
     FOXO4  TWPLPRPEIA NQPSE..... .......... PPEVEPDLGE KVHTEGRSEP
     FOXO1  TWPLPRPEFS QSNSATSSPA PSGSAAANPD AAAGLPSASA AAVSADFMSN

            101                                               150
     Aedes  .......... .......... .........S ESNKCSNQQL ASAGVSANQP
Drosophila  .......... .......... .........L DSTKASNQQL APG..DSQQA
 Blattella  .......... .......... ...GIKCPGG VVLPCG.GVM GPEG.TLAGG
   Nasonia  .......... .......... ...GAVGPGG APKEPGCGES GSTP.PQQPS
 Tribolium  .......... .......... .......... EGNKCG...L PAAP.APTVA
      Homo  MAIGGGGGSG TLGS..GLLL EDSARVLAPG GQDPGSGPAT AAGGLSGGTQ
    Gallus  TPAPRSGAPP DLIAFFALHE EGSEAPLAVG GAAPAGGKAA AAGGPEEAAR
   Xenopus  TVLGTAGD.. .......... KGTLVLLSGG ESGQLAVLAS PVGG.VETLQ
     FOXO4  ILLP...... .......... .......... .....SRLPE PAGGPQPGIL
     FOXO1  LSLLEESEDF PQAPG..... SVAAAVAAAA AAAATGGLCG DFQGPEAGCL

            151                                               200
     Aedes  QSASS..... .......... .......... ........AT KKNSSRRNAW
Drosophila  IQNAN..... .......... .......... ........AA KKNSSRRNAW
 Blattella  LQLPT..... .......... .......... ........AT KKNSSRRNAW
   Nasonia  SLLP...... .......... .......... .........V KKNSSRRNAW
 Tribolium  AIVP...... .......... .......... .........A KKNSSRRNAW
      Homo  ALLQ.....P QQPLPPP..Q PGAAGGSGQ. ........PR KCSS.RRNAW
    Gallus  PPVPLPGGGP EGPGPAPGGA AAAAGGGGLS GGGPAAAAPR KCSS.RRNAW
   Xenopus  VSLG...... ...GEGAGGA VSGAGGQQQ. ........QR KCSS.RRNAW
     FOXO4  GAVTG..... .......... .......... ........PR KGGS.RRNAW
     FOXO1  HPAPPQPPPP GPLSQHPPVP PAAAGPLAGQ ........PR KSSSSRRNAW

            201                                               250
     Aedes  GNLSYADLIT QAISSAGDNR LTLSQIYEWM VQNVPYFKDK GDSNSSAGWK
Drosophila  GNLSYADLIT HAIGSATDKR LTLSQIYEWM VQNVPYFKDK GDSNSSAGWK
 Blattella  GNLSYADLIT QAITSAPEKR LTLSQIYEWM VQNVPYFKDK GDSNSSAGWK
   Nasonia  GNLSYADLIT QAITSAPDKR LTLSQIYEWM VQNVPYFKDK GDSNSSAGWK
 Tribolium  GNLSYADLIT QAITSSPDKR LTLSQIYEWM VQNVPYFKDK GDSNSSAGWK
      Homo  GNLSYADLIT RAIESSPDKR LTLSQIYEWM VRCVPYFKDK GDSNSSAGWK
    Gallus  GNLSYADLIT RAIESSPEKR LTLSQIYDWM VRCVPYFKDK GDNNSSAGWK
   Xenopus  GNMSYADLIT RAIESTQDKR LTLSQIYDWM VRSVPYFKDK GDSNSSAGWK
     FOXO4  GNQSYAELIS QAIESAPEKR LTLAQIYEWM VRTVPYFKDK GDSNSSAGWK
     FOXO1  GNLSYADLIT KAIESSAEKR LTLSQIYEWM VKSVPYFKDK GDSNSSAGWK

            251                                               300
```

```
     Aedes  NSIRHNLSLH NRFMRVQNEG TGKSSWWMLN P.DAKPGKSV RRRAASMETS
Drosophila  NSIRHNLSLH NRFMRVQNEG TGKSSWWMLN P.EAKPGKSV RRRAASMETS
 Blattella  NSIRHNLSLH NRFMRVQNEG TGKSSWWMIN P.DAKPGKSA RRRATSMETS
   Nasonia  NSIRHNLSLH NRFMRVQNEG TGKSSWWMIN P.DAKPGKSA RRRATSMETS
 Tribolium  NSIRHNLSLH NRFMRVQNEG TGKSSWWMIN P.DAKPGKSV RRRAASMETS
      Homo  NSIRHNLSLH SRFMRVQNEG TGKSSWWIIN PDGGKSGKAP RRRAVSMDNS
    Gallus  NSIRHNLSLH SRFIRVQNEG TGKSSWWMIN PDGGKVGKAP RRRAVSMDNS
   Xenopus  NSIRHNLSLH SRFIRVQNEG SGKSSWWMIN PEGGKGGKAP RRRAVSMDNS
     FOXO4  NSIRHNLSLH SKFIKVHNEA TGKSSWWMLN PEGGKSGKAP RRRAASMDSS
     FOXO1  NSIRHNLSLH SKFIRVQNEG TGKSSWWMLN PEGGKSGKSP RRRAASMDNN

            301                                                350
     Aedes  .KYEKRRGRV RKRVEAIRQQ AALGLATTSL NDATPSPSSS VSENLDSFPE
Drosophila  .RYEKRRGRA KKRVEALRQA GVVG.....L NDATPSPSSS VSEGLDHFPE
 Blattella  .KFEKRRGRV KKKVDALRNG LQAAT..... .DATPSPSSS ISEGLDLFPD
   Nasonia  .KFEKRRGRV KKKVEALRNG SLQA...... .DATPSPSSS VSEGLDLFPD
 Tribolium  .KFEKRRGRV KKKVDLMRNG ..ALP..... .DTTPSPSSS VSESLDLFPE
      Homo  NKYTKSRGRA AKKKAALQTA P..ESADD.. .........S PS.QLSKWPG
    Gallus  NKYTKSRGRA AKKKAALQTA Q..EASED.. .........S PS.QLSKWPG
   Xenopus  NKYTKSRGRA AKKKASLQAS S..DATDD.. .........S PS.QLSKWPG
     FOXO4  SKLLRGRSKA PKKKPSVLPA PPEGATPT.. .........S PVGHFAKWSG
     FOXO1  SKFAKSRSRA AKKKASLQSG Q..EGAGD.. .........S PGSQFSKWPA

            351                                                400
     Aedes  SPLHSG..NF QLSPDFRQRA SSNASSCG.R LSPIQSIVGI ENTWTYPPDL
Drosophila  SPLHSGG.GF QLSPDFRQRA SSNASSCG.R LSPIR.AQDL EPDWGFP...
 Blattella  SPLH.NT.SF QLSPDFRPRA SSNASSCG.R LSPIPAVLG. EPDWGSPS..
   Nasonia  SPLHPAS.SF QLSPDFRPRA SSNASSCG.R LSPIPAVLS. EPEWTPN...
 Tribolium  SPIHSGT.GF QLSPDFRPRA SSNTSSCG.R LSPIPAVVGV EPDWSSPG..
      Homo  SPTSRSSDEL DAWTDFRSRT NSNASTVSGR LSPIMASTEL DEVQDDDAPL
    Gallus  SPTSRSSDEL DAWTDFRSRT NSNASTISGR LSPILASTEL DDVQDDDAPL
   Xenopus  SPTSRSSDKL DTWTDFRSRT NSNASTISGR LSPIPATTEL DDVQDDDSPL
     FOXO4  SPCSRNREEA DMWTTFRPRS SSNASSVSTR LSPLRPESE. ..VLAEEIPA
     FOXO1  SPGSHSNDDF DNWSTFRPRT SSNASTISGR LSPIMTEQDD LGEGDVHSMV

            401                                                450
     Aedes  AELADNPDAG QTVETELNAQ GQAQLDQLAG SLADDLTLHQ TDFFKGFSQN
Drosophila  ......VDYQ NTTMTQAHAQ ...ALEELTG TMADELTLCN .QQQQGFSAA
 Blattella  ........PY TGG....... ..YGPEQLAG NLAEGMKLQG GEFLQTYGGS
   Nasonia  .........Y AST....... ..YSPEHRLQ N..KNLELFG .DLTQPQQQQ
 Tribolium  ........QF NSANYSPEMP GNYSPDQLAG NLEQGMKLQP ....DAYMGY
      Homo  SPMLYSSSAS LSPSVSKPCT VELPRLTDMA GTMNLNDGLT ENLMDDLLDN
    Gallus  SPMLYSSPSS LSPSVNKPCT VELPRLTDMA GTMNLNDGLT DNLMDDLLDN
   Xenopus  SPMLYNSPGS LSPSISKPCT VEMPRITDMA ETMNLNDGLP ENLMDDLLDD
     FOXO4  S..VSSYAGG VPP....... .......... ...TLNEGL. .....ELLDG
     FOXO1  YPPSAAKMAS TLPSLS.... ....EISNPE NMENLLDNLN .....LLSSP

            451                                                500
     Aedes  TS..MHNQPP PP...YQPPQ .......... ..PYSLHATV AQPFGFPQQQ
Drosophila  SG..LPSQPP PPP..YQPPQ HQQAQQQQQQ QSPYALNGPA SG.YNTLQPQ
 Blattella  NGGQQQAQPP PPP..YQPTY DFSGGSRLGQ HDLSTLHAAS PY......GL
   Nasonia  PQQQQAQQSG PPPSYFEAQY QRNNALRSTT TPYGLPPTPQ SS......SQ
 Tribolium  INGQTPQQPP PP...YTAPY EQFPGRRE.. ..INSIHATS PY......GL
      Homo  ITLPPSQPSP TGGLMQRSSS FPYTTKGSGL GSPTSSFNST VFGPSSLNSL
    Gallus  ITLPSSQQSP TGGMMQRSSS FPYGSKGSGL GSPSSSFNNA VFGPSSLNSL
   Xenopus  ISLTSSQQSS PGVLMQRSSS FTYGTKGSGI GSPSNNFNNT GSFNFPLTSL
     FOXO4  LNLTSSHS.. ...LLSRSGL SGFSLQHPGV TGPLHTYS.. ....SSLFSP
     FOXO1  TSLTVSTQSS PGTMMQQTPC YSFAPPNTSL NSPSPNYQKY TYGQSSMSPL

            501                                                550
     Aedes  NQCPIHRLQQ CTCMLQNNTR ESMSPASGTG .MSPSYPHSE PSPD......
Drosophila  SQCLLHRSLN CSCMHN..AR DGLSPNSVTT TMSPAYPNSE PSSD......
 Blattella  SQCHLHRMQP CSCH...LQQ QQHSP....A GMSPSYPQSE PSPDPMSGQQ
   Nasonia  QRCPLHRLQP CAC.....TQ MQNLS....L NMSPTYQQPE PSPSLTSQQQ
 Tribolium  SQCPIHRMIS CSCIQVPCKV ESMSP....A GMSPSYPHSE PSPD......
      Homo  RQSPMQTIQE NKPATFSSMS HY..GNQTLQ DLLTSDSLS. HSDVMMTQSD
    Gallus  RQSPMQTIQE NKQATFSSIS HY..NNQTLQ DLLASDALS. HSDVMMTQSD
   Xenopus  RQSPMQTIQE NKQATFSSMN HY..SNQSLQ DLLNTDTLS. HSDVLMTQSD
```

```
     FOXO4  AEGPLSAG.. ..EGCFSSS. ......QALE ALLTSDTPPP PADVLMTQVD
     FOXO1  PQMPIQTLQD N.KSSYGGMS QYNCAPGLLK ELLTSDSPP. .HNDIMTPVD

            551                                                600
     Aedes  .......... .........Y AMLVGARVIQ RTPS...ASP PLTPSTVCNM
Drosophila  .......... .........S LNTYSNVVLD G........P ADTAALMVQQ
 Blattella  .......... .........Q NPPAPQFMPP R........A LRPPPPGGSN
   Nasonia  SIQQYLLQQQ QQQQQADQSQ TQAQPQTLPQ QQQQQQQQQT QQTPQQQTTQ
 Tribolium  .......... .......... .PLNSQYLIN R.......ST MPRPPSSSPP
      Homo  P......... .........L MSQASTAVSA QNSRRNVMLR NDPMMSFAAQ
    Gallus  P......... .........L MSQASTAVSA QNSRRNIMLR NDPMMSFAAQ
   Xenopus  P......... .........L MSQASTAVTA QNSRRNIILR NDPMMSFAAQ
     FOXO4  P......... .........I LSQAPTLLLL GGLPSSSKLA TG..VGLCPK
     FOXO1  P......... .........G VAQPNSRVLG QN....VMMG PNSVMSTYGS

            601                                                650
     Aedes  VT.....ATP QSDNSPQTLM GQFMEALNNQ TN.IDDLNIN LESFPGG.LE
Drosophila  QQ.....QQQ QQQQLSASLE GQCLEVLNNE AQPIDEF..N LENFPVGNLE
 Blattella  HS.....ESP PDTPTPSTMM GQLMGALNNS TL.LDDLNLN IETLHGG.FD
   Nasonia  QSQVSSGNSP PDSPIPSTMM GQLMGALNNT AL.LDDLNIN IETLHG..FD
 Tribolium  LT......PQ PSQGTPSTMM GQLMGALNNS TV.LDDLNIN VESFQGG.FD
      Homo  PNQGS.LVNQ NLLHHQHQTQ G.ALGGSRAL SNSVSNMGLS E.SSSLGSAK
    Gallus  SSQGG.LVNQ SLPHHQHQSH SSPLSGSRAL SNSISNIGLN D.SNSLG.SK
   Xenopus  PNQGGNLVNQ NSLHQQ.QSL NSFQGGSRAL SNNLSNTGLN D.SSILESTK
     FOXO4  PLEAP..... .......... .....GPSSL VPTLSMIAP. ..........
     FOXO1  QASHNKMMNP SSHTHPGHAQ QTSAVNGRPL PHTVSTMPHT SGMNRLTQVK

            651                                                700
     Aedes  CNVDEVIKHE LSMEGSLDFN FPMSNHSTYT PTNSS..... ..........
Drosophila  CNVEELLQQE MSYGGLLDIN IPLATVNTNL VNSSSGPLSI SNISNLSNIS
 Blattella  CNVDEVIKHE LSMDGSLDFN FSQHNHHHNH .......... ..........
   Nasonia  CDIDEVIKHE LLINGTLDIN FQNPNVLPNI GLPNIPVTDS TGIVD.....
 Tribolium  CNVEELIKHE LSMEGSLDFN FAN....... .......... ..........
      Homo  HQQQSPVSQS MQTLSDS.LS GSSLYSTSAN LPVMG..... ..........
    Gallus  HQQ.SPVNQS MQTLSDP.LS GSSLYSSSMN LPVMG..... ..........
   Xenopus  HQQQSSVSHS MQTISDT.LS G.SLYSSGVT LPTLG..... ..........
     FOXO4  .....PPVMA SAPIPKA.LG TPVLTPP... TEAAS..... ..........
     FOXO1  TPVQVPLPHP MQMSALGGYS SVSSCNGYGR MGLLH..... ..........

            701                                                750
     Aedes  .......... .......... .......... .......... ........NS
Drosophila  SNSGSSLSLN QLQAQLQQQQ QQQQAQQQQQ AQQQQQQHQQ HQQQLLLNNN
 Blattella  .......... .......... .......... .......... .....HHQAT
   Nasonia  .......... .......... .......... ...QLVDTTT AAVSAHHQAT
 Tribolium  .......... .......... .......... .......... .......QQQ
      Homo  .......... .......... .......... .......HEK FPSDLDLDMF
    Gallus  .......... .......... .......... .......HEK FPSDLDLDIF
   Xenopus  .......... .......... .......... .......HEK FPTDLDLDIF
     FOXO4  .......... .......... .......... .......QDR MPQDLDLDMY
     FOXO1  .......... .......... .......... .......QEK LPSDLDG.MF

            751                                                800
     Aedes  LDSTISAIAA TPNQATAPHN HGQYTARTSV T......... ..........
Drosophila  NNSSSSLELA TQTATTNLNA RVQYSQPSVV TS........ ..........
 Blattella  SGAGSVPQNQ ELQQGVVPQQ ATSSYSTTVS T......... ..........
   Nasonia  AQAAAAAAVS NVASSNAASA AAVYASTNAA TPA....... .........A
 Tribolium  SVVPQSETIS GITS..TQAS APPPYSTTAT T......... ..........
      Homo  NGSLECDMES IIRSELMDAD GLDFNFDSLI STQNVVGLNV GNFTGAKQAS
    Gallus  NGSLECDMES IIRSELMDAD GLDFNFDSLI SAQNVVSLNV GNFTGAKQAS
   Xenopus  NGSLECDMET IIRNDLMDAD GLDFNFDTLI SAQNVS.LSV GSFTGAKQTS
     FOXO4  MENLECDMDN IISDLMDEGE GLDFNFEPDP .......... ..........
     FOXO1  IERLDCDMES IIRNDLMDGD TLDFNFDNVL PNQ....... .SFPHSVKTT

            801     807
     Aedes  PPSWVH.
Drosophila  PPSWVH.
 Blattella  GPSWVH.
   Nasonia  SPSWVH.
```

```
Tribolium  .PSWVH.
     Homo  SQSWVPG
   Gallus  SQSWVPG
  Xenopus  SQSWVPG
    FOXO4  .......
    FOXO1  THSWVSG
```

A

	AEDES	DROS	BLATT.	NASONIA	TRIBOLIUM	HOMO	GALLUS	XENOPS	FOXO4	FOXO1
AEDES	100%									
DROS.	48%	100%								
BLATTELLA	46%	40%	100%							
NASONIA	39%	37%	53%	100%						
TRIBOLIUM	50%	40%	59%	45%	100%					
HOMO	22%	21%	22%	22%	23%	100%				
GALLUS	19%	20%	21%	19%	20%	72%	100%			
XENOPS	21%	20%	22%	23%	23%	69%	63%	100%		
FOXO4	20%	20%	21%	20%	22%	33%	29%	33%	100%	
FOXO1	22%	20%	23%	21%	23%	41%	37%	39%	30%	100%

B

Fig. 2.2 **A** Comparação das seqüências de aminoácidos pelo programa Clustal X. Em verde podemos ver os aminoácidos em comum entre um organismo e outro. **B** Esquema com porcentagens de similaridade comprando os nucleotídeos entre os organismos.

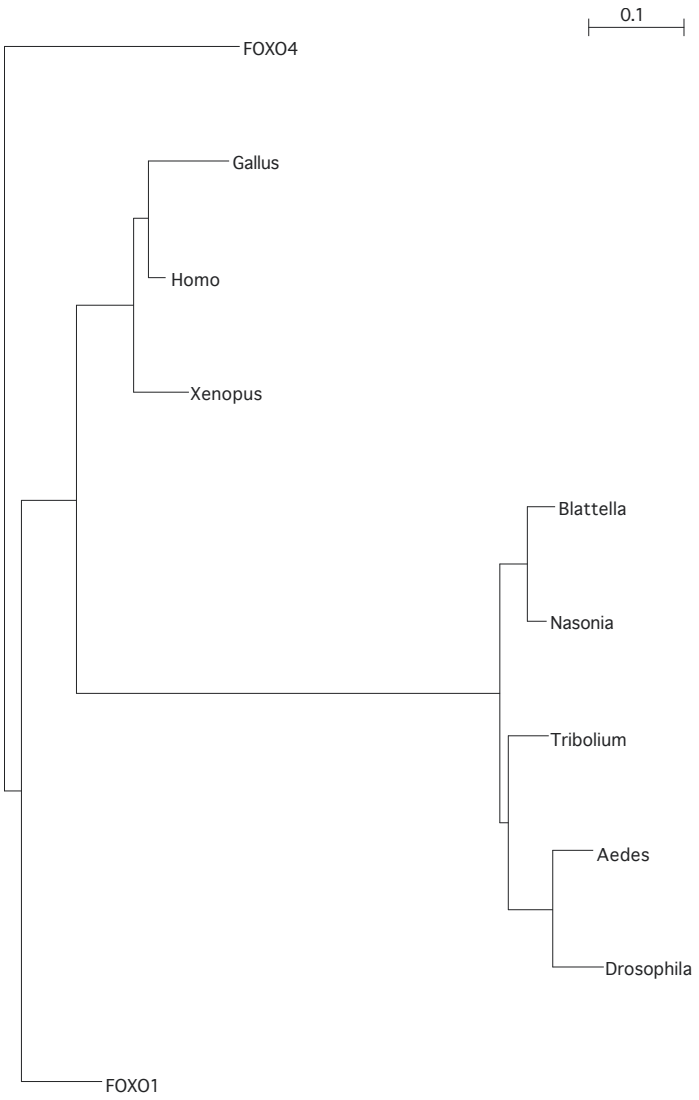


Fig. 2.3 Arvore filogenética comparando a seqüência da *B. germânica* com outros organismos. A arvore filogenética foi construída usando o método de maximim-likehood. A longitude das ramas é proporcional a diferença da seqüência. A barra representa 0.1 substituições por lugar.

Apesar de que toda a seqüência foi realizada com cDNA de células UM-BGE 1, foram realizados também sequenciamentos nos tecidos de OV, e CG, sempre obtendo as mesmas seqüências para todos os tecidos. De todas as seqüências realizadas nunca foi notado nenhuma discrepância no anelamento das bases, deixando clara a não existência de isoformas de FOXO em *B. germânica*

A analise filogenética da seqüência obtida nos indica que esta seqüência corresponde a uma proteína da família FOXO

A obtenção da seqüência de FOXO de *B. germanica* nos permitira realizar estudos da expressão, assim também como permitira estudar a função de FOXO realizando experimentos de interferência de RNA (RNAi).

2.4.2 CICLOS DE EXPRESSAO

2.4.2.1 CORPORA ALLATA

Analisamos os padrões de expressão de FOXO, TOR, IR, S6K, e SIN e RED por RT-PCR/Southern Blot em adultos de a 0 a 7 dias, marcando sua idade a partir do primeiro dia de mudança para adulto, utilizando a comprimento basal do oocito (LOB) como medida da idade fisiológica.

Quando analisamos os resultados obtidos na *B. germanica,* observamos o mesmo padrão, sendo constante a expressão em todos os transcritos, da fig. 01, os níveis de expressão não apresentam variações significativas para os transcritos (TOR, S6K, IR, e FOXO) sem aumento ou diminuição, na fase adulta de *B. germanica,* sugerindo uma regulação pós-transcricional, destes transcritos para este tecido. Foram utilizadas como controle as actinas.

Ao contrario SIN e RED possuem um perfil muito similar ao perfil de produção de HJ. Na Fig. 2.4 vemos o perfil de produção do HJ nos CAs durante o primeiro ciclo gonadotrofico (Maestro *et al,* 1994), para poder comparar os níveis de expressão dos diferentes transcritos com o nível de atividade da glândula.

As enzimas “hidroximetilglutamil-CoA sintasa (SIN) e “hidroximetilglutamil-CoA redutasa (RED) são duas enzimas consecutivas na via de biosintese do HJ em insetos, alem de estar implicados na síntese de ubiquinona e na glicolizaçao de proteínas, Couillaud, F. 1991, Martin, D. *et al* 1998. Alem disso estas duas enzimas são consideradas chaves na via de síntese do HJ, no primeiro ciclo gonodotrofico da *B. germanica*, a expressão destas enzimas

seguem o perfil da produção de HJ, o que reforça a idéia destas enzimas serem chaves na regulação dessa via.

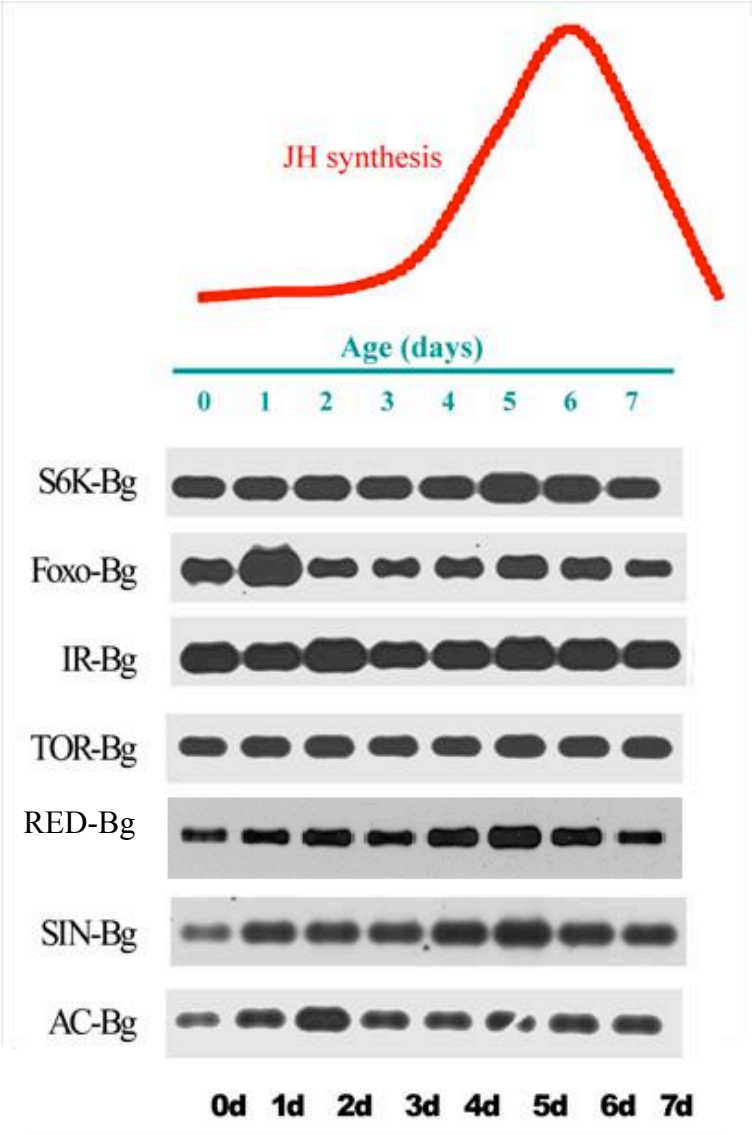


Fig. 2.4: Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR SIN e o controle AC (Actinas) no tecido Corpora Allata. Para ter como referencia adicionamos o perfil de produção de HJ (segundo Maestro *et al* 1994).

2.4.2.2 CORPO GORDUROSO

Quando analisamos os resultados obtidos na *B. germânica,* observamos o mesmo padrão, sendo constante a expressão em alguns dos transcritos analisados, os níveis de transcrição como se pode demonstrar pela Fig. 2.5, sendo os níveis de expressão similares ao da actina utilizada como controle para os transcritos (TOR, IR, e FOXO) sugerindo uma regulação pos-transcripcional para estes fatores em questão neste tecido assim como no CA .

O transcrito S6K, demonstra um decréscimo significativo a partir do segundo dia de adulto, uma explicação seria uma maior sensibilidade à presença ou ausência de alimentos já que a *B. germânica*, nos seus dois primeiros dias de adulto não possuem o aparelho bucal totalmente formando, impossibilitando uma alimentação completa, deixando o animal em completa (0 dias) e parcial (1 dia) sem comida (Osorio *et al*., 1998). Esta não alimentação por impossibilidades físicas estaria sendo notada na transcrição do fator S6K, para o tecido do CG.

Para este tecido também foi analisado a expressão do fator Vg, Como demonstra o gráfico da figura a expressão de Vg, é baixa ou quase nula ao principio do ciclo de adulto, 0 e 1 dia de adultos e vai aumentando com um pico de síntese entres os dias 5 e 6.

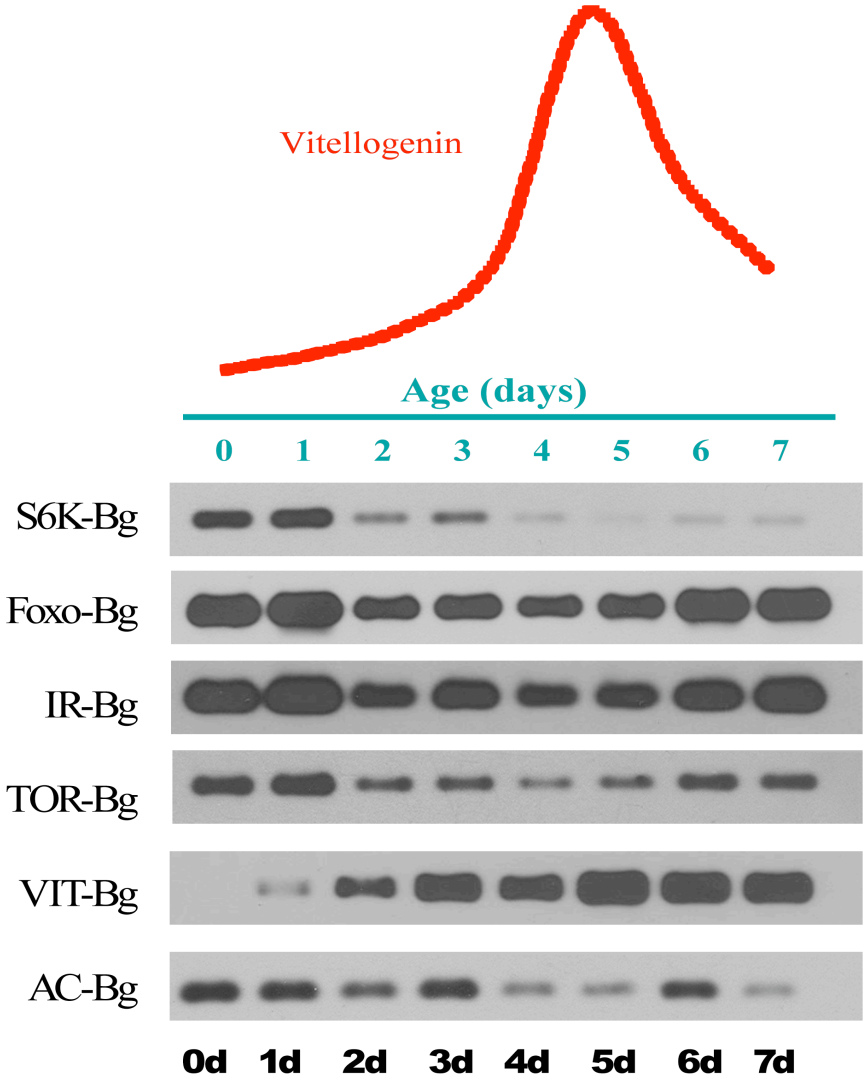


Fig. 2.5: Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR e o controle AC (Actinas) no tecido CG. Como referencia acrescentamos os níveis de vitelogenina hemolinfatica durante o primeiro ciclo gonadotrofico. Martin *et al*., 1995

2.4.2.3. OVARIO

Quando analisamos os resultados obtidos na *B. germânica,* para o tecido do OV, observamos o mesmo padrão encontrado anteriormente para os tecidos CA e CG, sendo constante a expressão em alguns dos transcritos, o nível de transcrição como se pode demonstrar pela fig. 2.6, não observamos diferenças significativas com respeito às actinas, que foram utilizadas como controles, para os transcritos TOR e IR sem aumento ou diminuição, na fase adulta de *B. germânica,* sugerindo uma regulação pós-transcripcional para estes dois fatores em questão.

Tanto transcrito S6K, como o fator de transcrição FOXO foram observados um decréscimo significativo a partir do segundo dia de adulto, uma explicação para este ocorrido, como descrito anteriormente seria uma maior sensibilidade à presença ou ausência de alimentos já que a *B. germânica*, nos seus dois primeiros dias de adulto não possuem o aparelho bucal totalmente formando, o que impossibilita o animal de ser alimentar de uma forma normal, e uma ligação direta destes fatores na reprodução e alimentação com esta espécie *B. germânica*, já que em muitas outras espécies a disponibilidade de alimentos e essencial para a oogenesis (Wheeler, 1996). Esta evidencia é especialmente clara nas baratas. Em alguns estudos, tem sido demonstrado que a abstinência de alimento reprime o crescimento de oocitos em *B. germanica* e *Leucophaea maderae* (Roth and Stay, 1962; Engelmann and Rau, 1965).

Em *Drosophila* S6K tem sido implicado como um importante regulador positivo do tamanho celular e corporal. Em estudos mostrou-se letal quando inativado na fase embrionica, e na fase adulta a inativação de S6K produzia tamanho corporal reduzido e um decréscimo no tamanho e numero de células, assim também como fêmeas estéreis (Montagne, *et al*., 1999). O transcrito S6K é fosforilado e ativado por TOR mais também requer fosforilação por PI3K e outras quinasas para total atividade.

De acordo com Junger *et al*., 2003, em resposta ao stress celular, como a privação de nutrientes, em *Drosophila* a proteína dFOXO esta ativado e inibe o crescimento através da ação de genes alvos como 4E-BP, o que explicaria o aumento aos primeiros dias de sua transcrição, quando

ainda não comeram e uma diminuição da expressão ao longo do ciclo e a exposição a comida.

Os fatores de transcrições FOXO são um dos principais substratos da proteína quinasa Akt em resposta a estimulação celular por fatores de crescimento ou insulina, quando esta em presença de insulina e fatores de crescimento, a proteína FOXO e transportada do núcleo para o citoplasma, sendo que em ausência de fatores de crescimento FOXO e retido no núcleo e auto-regula uma serie de genes alvos, assim como também promove o arrastamento do ciclo celular, resistência ao stress, ou apoptose. (Greer and Brunet, 2005). Isto não e percebido por analise de transcrição no CG, mais sim no ovário para *B. germânica*.

De alguma maneira se pode medir esse decréscimo no tecido do OV, para FOXO diferenciando nesse ponto esse tecido dos outros dois estudados.

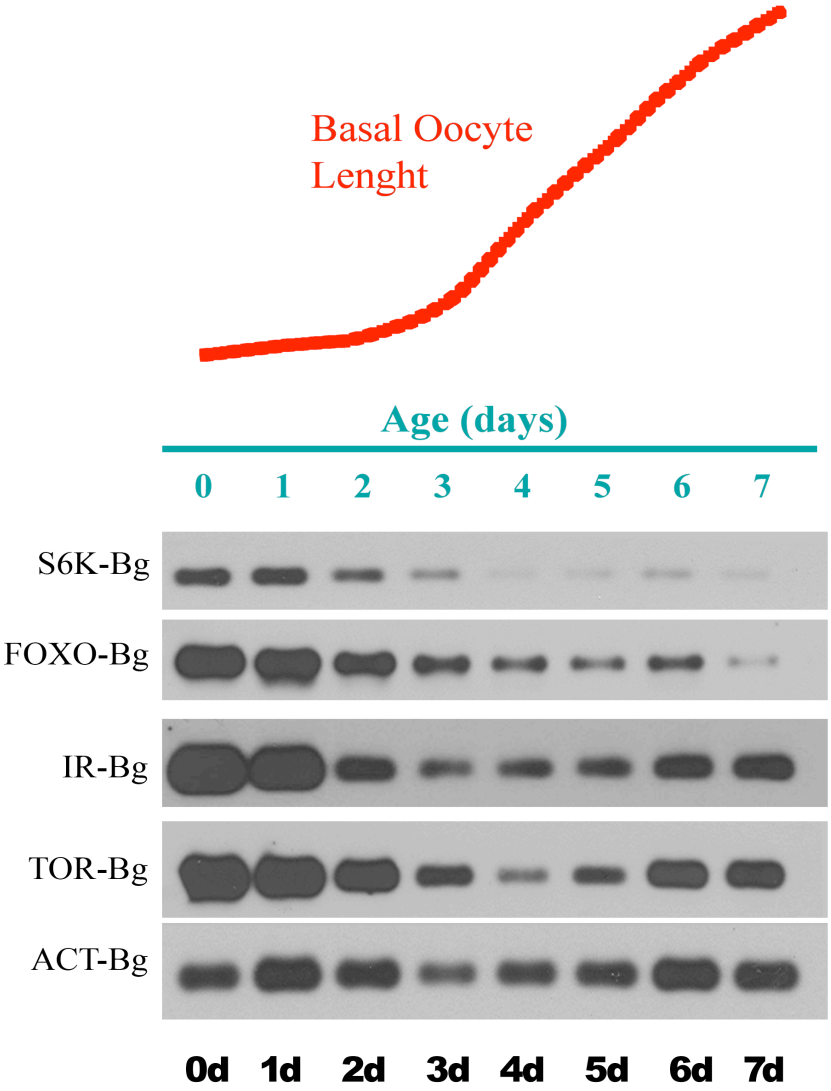


Fig. 2.6: Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR e o controle AC (Actinas) no tecido Ovário. Como referencia acrescentamos o perfil da longitude basal do oocito, como medida do desenvolvimento do ovário, segundo Bellés *et al*., 1987.

2.4.3 ANIMAIS ALIMENTADOS E NAO ALIMENTADOS COM 3 DIAS DE ADULTO.

Realizamos um primeiro experimento com dois grupos de animais, os animais não alimentados (AL-), no qual foram retirados os alimento (fonte de nutrientes), no ultimo dia de larva da *B. germanica* ate o terceiro dia de adulto tendo somente água, e o outro grupo de animais que foram alimentados

(AL+), segundo condições descritas em materiais e métodos. Os botes contendo os animais que foram analisados eram verificados todos os dias pela manha e pela tarde para certificar de que estavam todos bem e vivos. Ao completarem 3 dias de adulto, foram dissecados e analisados a expressão dos transcritos nos tecidos CG e OV, assim também como medida a LOB de todos os animais.

Todos os animais sobreviveram ate o terceiro dia de adulto, não sendo letal, a ausência de comida por esse período.

A quantificação do RNA total do CG, não mostrou diferença significa comparando animais alimentados e não alimentados, assim como a quantificação do RNA total do OV também não demonstraram diferença significativa entre animais alimentados e não alimentados.

Analisamos os padrões de expressão de FOXO, TOR, IR, S6K, e Vg por RT-PCR/Southern Blot em adultos de 3 dias, marcando sua idade a partir do primeiro dia de mudança de ninfa 6 para adulto, sendo que de um mesmo animal foram retirados o CG, e o OV.

Ao realizar a dissecçao a primeira diferença notada foi na morfologia dos oocitos quando comparados um grupo com o outro (AL+ e AL-) e a diferença no crescimento dos oocitos, confirmando dados descritos em Osorio *et al*., 1997, onde foi demonstrado que normalmente fêmeas com uma dieta nutricional normal produzem a primeira ooteca por volta do oitavo dia de adulto. O que em fêmeas mantidas sem alimentação morrem por volta do décimo dia, sem ocorrer desenvolvimento nos oocitos.

Dessa maneira comprovamos que os oocitos de adulto com 3 dias AL-, não desenvolveram, mantendo-se um tamanho similar de oocitos em dia zero de adulto. Os animais que foram alimentados desenvolveram normalmente, obtendo sua medida normal de LOB (Fig. 2.7).

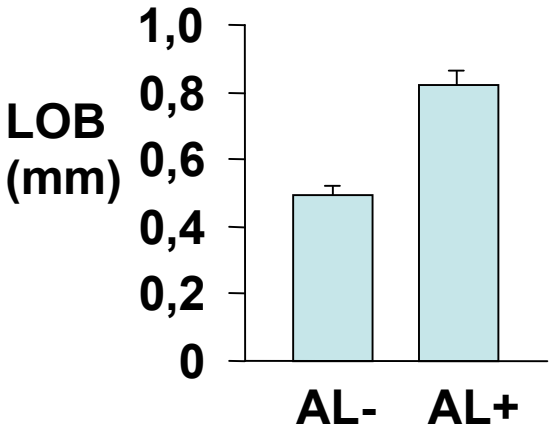


Fig. 2.7: Gráfico demonstrando a diferença entre a longitude basal do oocito (LOB) de animais alimentados (AL+) e animais não alimentados (AL-) de 3 dias de adulto. Medida em milímetros dos oocitos. Diferença significativa estatisticamente (*test-t*, $p < 0.0001$). Resultados com media +/- SEM.

Os resultados demonstraram que no CG os transcritos FOXO, TOR, IR, S6K, se expressam muito mais nos animais mantidos sem alimentos que nos alimentados, este resultado nos demonstra uma ligação entre a expressão dos transcritos analisados e a alimentação para este tecido aos 3 dias de adulto (Fig. 2.8).

Podemos ver também que a vitelogenina não se expressa em animais não alimentados mostrando a ligação entre a oogenesis e a alimentação, como já sugerida por Osorio *et al*., 1997.

Este resultado confirma alguns resultados como os descritos em Marr *et al*., 2007, no qual se explica que em quantidades baixas ou ausência de nutrientes ou de insulina dFOXO e desfosforilado e ativado, ativando também outros componentes da via de insulina como o d4E-BP, diminuindo o crescimento celular e a proliferação.

Luong *et al*., 2006, ao estudar TOR em *Drosophila*, demonstrou que a ativação de FOXO produzida com a inibição da via de insulina, e bloqueada em indivíduos que se reduz a atividade de TOR, demonstrando uma relação direta entre dTOR e dFOXO.

Em estudos da via do receptor de insulina em *Drosophila* Puig and Tjian, 2005, propuseram um mecanismo pelo qual dFOXO regula a sensibilidade da sinalização da via do receptor de insulina. Esses autores comprovaram que dFOXO é o responsável da ativação transcricional do IR, que a privação de alimento upregula mRNA de IR em moscas controles, mais não em moscas deficientes em dFOXO. desta maneira o efeito de FOXO em condições de falta de alimento permitira uma resposta mais rápida no momento da realimentação (Puig and Tjian, 2005). No CG de fêmeas de *B. germanica* tivemos um resultado parecido, já que observamos altos níveis de expressão do IR, em fêmeas AL- e também altos níveis de mRNAs para FOXO, TOR e S6K. Os altos níveis do fator de transcrição FOXO podiam produzir um aumento da expressão dos outros fatores (IR, TOR e S6K) que se acumulariam para produzir uma resposta rápida no momento da realimentação.

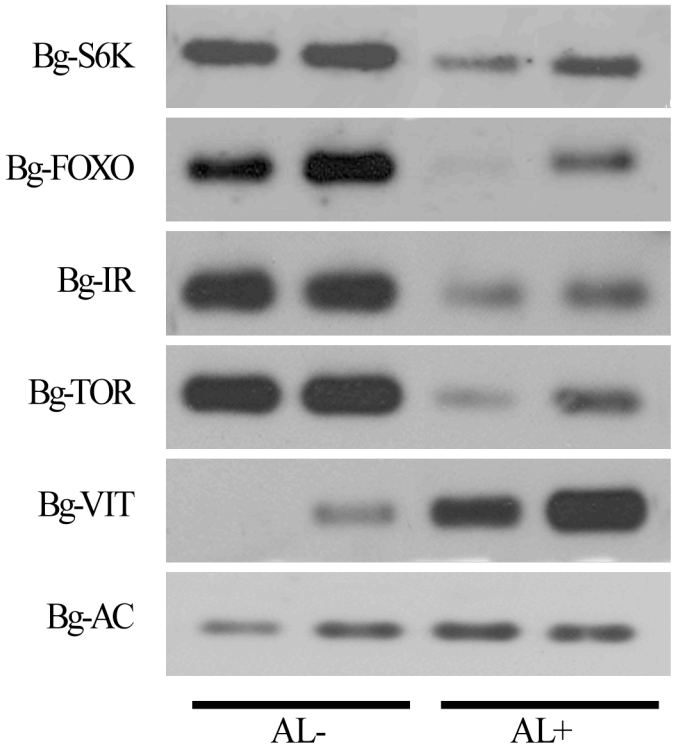


Fig 2.8: Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, VIT e o controle AC (Actinas) para fêmeas adultas de 3 dias de *B. germânica* sem alimento (AL-) e alimentados (AL) no tecido corpo gorduroso

Em, Vihervaara and Puig, (2008) demonstraram que FOXO em Drosophila e necessário para expressão de Lip4, quando as moscas estão sem alimento por 4 dias RNAm de Lip4 são alto-regulados e essa resposta depende da presença de FOXO. Esses resultados comprovam mais uma vez a relação entre a expressão de FOXO e a ausência ou presença de alimentos.

Se analisaram também os níveis de expressão dos distintos mRNAs no ovário de fêmeas adultas de três dias com alimento e sem alimento. Na analise da expressão no ovário, apesar das diferenças na LOB, não se observou diferenças significativas nos níveis de expressão dos transcritos estudados (Fig. 2.9).

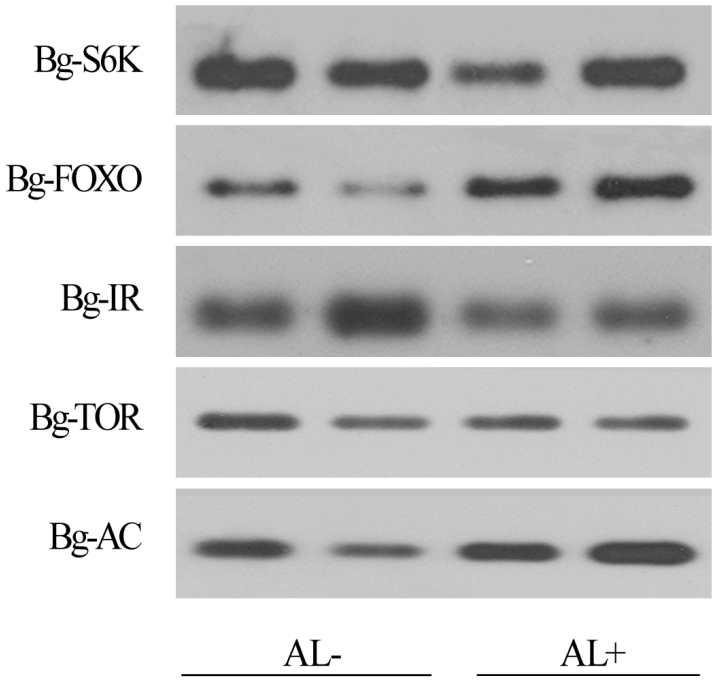


Fig. 2.9: Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, e o controle AC (Actinas) para animais sem alimento (AL-) e alimentados (AL+) no tecido Ovário

2.4.4 ALIMENTADAS, NÃO ALIMENTADAS E NÃO ALIMENTADAS EXPOSTAS A 6 HORAS DE ALIMENTOS A 5 DIAS DE ADULTA.

Anteriormente concluímos que no tecido do CG, para animais com 3 dias de adulto os transcritos analisados estavam mais expressos em animais não expostos à comida, e que no ovário não havia nenhuma alteração entre os grupos estudados. Nesse experimento decidimos verificar em três grupos distintos com adultos de 5 dias, um grupo com animais mantidos sem alimentação, um segundo grupos com animais com alimentação e um terceiro grupo com animais sem alimentação e exposto por seis horas alimentação, para analisar os efeitos produzidos nas primeiras horas depois da alimentação.

Os animais foram distribuídos em 3 compartimentos, compartimento 1: animais alimentados (AL+), compartimento 2: animais não alimentados (AL-) e compartimento 3: animais não alimentados e depois alimentados por 6 horas (AL- 6h), ao final de cinco dias foram realizadas as extrações dos tecidos de CG e OV para analise molecular.

Primeiro medimos os níveis dos diferentes mRNAs no CG de fêmeas adultas submetidas a diferentes tratamentos. Os resultados mostram que, a diferença que encontramos em animais alimentados de 3 dias, não se repetiu para animais de 5 dias a nível de expressão. Isto se pode explicar ao 5 dia de adulto sem alimento o animal já não pode se manter com elevado níveis de transcrição por falta de recursos, e portanto se baixa os níveis de expressão que encontramos ao 3 dia de adulto no tratamento anterior. No entanto as fêmeas de 5 dias não alimentadas estariam sensibilizadas a receber alimento, já que com somente 6 horas de alimentação são capazes de aumentar rapidamente o nível de alguns transcritos, especialmente FOXO e TOR.

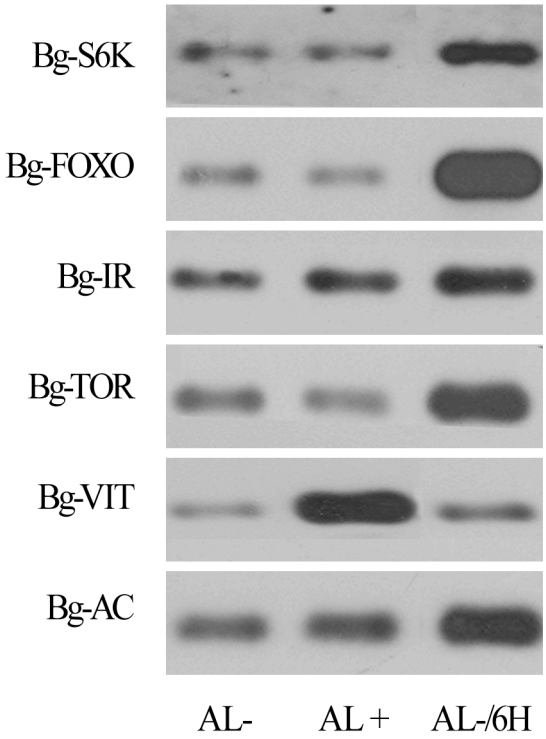


Fig. 2.10: Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, VIT e o controle AC (Actinas) para animais sem alimento (AL-) e alimentados (AL+) e não alimentadas e depois alimentadas por 6 h (AL- 6h) no tecido CG.

Quando analisamos os níveis de expressão dos diferentes transcritos no OV de fêmeas submetidas aos distintos tratamentos não observamos diferenças significativas para nenhum dos transcritos em nenhum dos tratamentos.

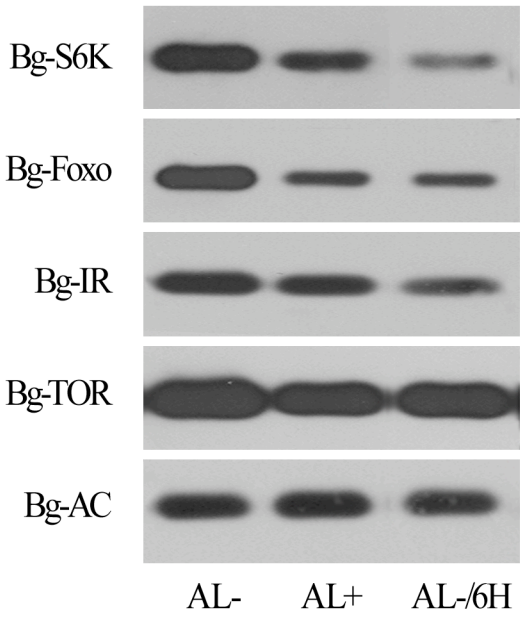


Fig. 2.11: Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, e o controle AC (Actinas) para animais sem alimento (AL-) e alimentados (AL+) e mantido sem alimento e depois alimentados no tecido Ovário

2.5. CONCLUSOES

• Realizamos a clonagem do cDNA completo do fator de transcrição FOXO em *B. germânica*. A analise filogenético confirma que o cDNA clonado pertence a uma proteína desta família.

• A obtenção da seqüência nucleotidica de FOXO nos permitira realizar estudos de expressão e a função de FOXO mediante a utilização de técnicas de RNAi.

• Os transcritos estudados (FOXO, TOR, IR, S6K, Vg, SIN E RED) possuem diferentes padrões de expressão para os diferentes tecidos estudados.

• Para o CA, não foram verificados diferenças na transcrição de mRNAs para transcritos FOXO, TOR, IR, S6K, pelo contrario, os transcritos SIN e RED mostraram um perfil paralelo com a produção de HJ o que sugere que estas enzimas podem atuar na regulação da via.

• Para o CG, foi verificado um decréscimo significativo da transcrição de S6K, a partir do segundo dia de adulto sendo contraria a formação de VG, para os outros transcrito não se verificou, nenhuma acréscimo ou baixa na transcrição, não demonstrando diferença significativa comparado com o controle actinas.

• Para o Ovário alem do S6K, FOXO também demonstrou uma sensibilização e uma baixa de transcrição a partir do segundo dia de adulto.

• Para o tecido do corpo gorduroso, os animais que foram mantidos sem alimento por um período de três dias, demonstraram uma maior expressão de mRNA os transcritos (TOR, IR, S6K e FOXO). Esto podia

produzir uma sensibilização do CG para poder responder rapidamente no momento de realimentaçao.

• O padrão de expressão de Vg se comportou de maneira inversa aos dos outros transcrito, sendo pouco, ou quase nada expressa em animais não alimentados, com três dias de adulto.

• Para o tecido do ovário, não foi encontrada diferença na expressão dos transcritos analisados para os animais alimentados e não alimentados pelo período de três dias.

• Para o tecido do CG, para 5 dias de adulto não alimentados não se observaram diferenças nos níveis de transcrição entre fêmeas alimentadas e não alimentadas, sugerindo que o efeito do aumento dos níveis de transcrição que vimos aos 3 dias de adulto não pode ser mantido durante cinco dias sem alimento, por falta de recursos nutricionais.

• Entretanto as fêmeas mantidas por cinco dias sem alimento parecem muito sensibilizadas a realimentação, já que no CG respondem rapidamente a presença de alimento com um aumento dos níveis de expressão em particular de FOXO e TOR.

• Para o tecido do ovário, não foi encontrada diferença na expressão dos transcritos analisados para os animais de 5 dias de adulto, alimentados, não alimentados, e realimentados por 6 horas.

2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Accili, D., and Arden, K.C. (2004). Foxos at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, **117**, 421-426.

Alessi, D.R., Caudwell, F. B., Andjelkovic, M. Hemmings, B. A., Cohen, p. (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein Kinase B; comparison with MAPKAP Kinase-I and p70 56 kinase. FEBS left **399**: 333-338.

Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Molecular Biology and Evolution **17,** 540-552.

Engelmann, F. and Thorpe A. (1965) A correlation between feeding and the sexual cycle in *Leucophacea maderae* (Blattaria). Journal of Insect Physiology **11**, 53-64.

Greer, E., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogenes* **24**, pp 7410-7425.

Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. (1992) *Comput Appl Biosci* **8**, 275-282

Junger, M.A., Rinteltn, F., Stocker, H., Radimerski, T., Wasser-man, J.D., Greenberg, M.E., and Hafen, E. (2003). Drosophila FOXO is not size control but mediates growth inhibition associated with reduced insulin signaling. J. Biol.

Lin, K., Dorman, J.B., Rodan, A., and Kenyon, C. (1997). Daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can functionto double the life-span of caernorhabditis elegans. *Science* **278**: 1319-1322.

Luong, N., Davies, C.R., Wessells, R.J., Graham, S.M., King, M.T., Veech, R., Bodmer, R. and Oldham, S.M. (2006). Activated FOXO-mediated insulin

resistence is blocked by reduction of TOR activity. *Cell Metabolism* **4**, 133-142.

Maestro, J. L., Danes M.D., Piulachs M. D., Cassier P. and Belles X. (1994). Juvenile hormone inhibition in corpora allata from ovariectomized Blattella germanica. *Physiological Entomology* **19**, pp 342-348.

Marr, M. T., 2nd, D'Alessio, J. A., Puig, O., Tjian, R. (2007)"IRES-mediated functional coupling of transcription and translation amplifies insulin receptor feedback." Genes Dev **21**. 2: 175-83.

D. Martín, M.D. Piulachs and X. Bellés, Patterns of hemolymph vitellogenin and ovarian vitellin in the German cockroach, and the role of juvenile hormone, *Physiol. Entomol.* **20** (1995), pp. 59–65.

Martín, D., Piulachs, M. D., Comas, D., and Belles, X. (1998) *Arch Insect Biochem Physiol* **38**, 137-146.

Montagne, J., Stewart, M., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S., and Thomas, G. (1999). Drosophila S6 Kinase: A regulator of cell size. *Science* **285**, pp 2126-2129.

Nakae, J., Biggs, W.H., 3rd, kitamura, T., Cavenee, W. K., Wright, C.V., Arden, K.C., and Accili, D. 2002. Regulation of insulin action and pancreatic β-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo 1. *Nat. Genet*. **32**, 245-253.

Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissen-baum, H.A., and Ruvkun, G. (1997). The fork head transcription factor DAF-16 transduces insuli-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* **389**: 994-999.

Osorio, S., Piulachs, M.D., Bellés, X. Feeding and Activation of Corpora Allata in the Cockroach Blattella germanica (L.) (Dictyoptera, Blattellidae)(1997). *J. insect Physiol*. 31-38.

Piulachs M.D. (1988). Accion gonadotrofica de la hormona juvenile en hembras de Blattella germanica alactectomizadas o sometidas a ayuno prolongado. *Miscel.lania Zoologica (Barcelona)* **12,** 121-124.

Puig, O. and Tijan, R. 2005. Transcriptional feedback control of insulin recepor by dFOXO/FOXO1. *Genes & dev.* **19** 2435-2446.

Raikhel, A.S., Kokoza, V.A., Zhu, J., Martin, D., Wang, S.F., li, C., Sun, G., Ahmed, A., Dittmer, N., Attardo, G., (2002). Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. Insect Biochem. *Mol. Biol*. **32**, pp 1275-1286.

ROTH L. M. and STAY B. (1962) Oocyte development in *B. germanica* and *B. vaga. Ann. ent. Soc. Am.* **55**, 633-642.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis (eds.). 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schal, C., Chiang, A.-S., Burns, E. L., Gadot, M., and Cooper, R. A. (1993) *J Insect Physiol* **39**, 303-313

Teleman, A.A., Chen, Y.W., and Cohen, S.M. (2005). 4E-BP function as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes & dev*. **19**, 1844-1848.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins,D.G. (1997) *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882

Vihervaara T. and Puig O. (2008). dFOXO Regulates Transcription of a Drosophila Acid Lipase. *J.Mol.Biol*. **376,** 1215-1223.

CAPITULO 3:

ESTUDO DA INTERFERENCIA DO FATOR DE TRANSCRIÇAO FOXO EM *B. germanica*.

3. RNA DE INTERFERENCIA *IN VIVO*

3.1 RESUMO

Neste capitulo descrevemos um estudo funcional do fator de transcrição FOXO, utilizando a técnica RNAi *in vivo*. Este trabalho tenta estudar o papel de FOXO durante a fase de ninfa, e sua transição a fase adulta da *B. germanica* inseto modelo, visto que neste momento de mudança de fases se produzem mudanças morfológicas e fisiológicas importantes. Outro motivo para realizar o estudo seria que quando a *B. germânica* entra na fase adulta se determina a mudança do programa genético e se inicia uma serie de processos que são exclusivos desta fase. Com o tratamento de fêmeas de *B. germânica* com dsRNA *in vivo* para FOXO (DsFOXO) foi possível verificar uma redução dos níveis de mRNAs para FOXO tanto no CG como no OV, o que sugere um efeito sistêmico para o tratamento. O tratamento de DsFOXO, com a condição de presença ou ausência de alimento foi possível observar que, tanto no CG como no OV, a ausência de alimento produziu um aumento de mRNA para FOXO, incluindo no caso de interferir a expressão de FOXO utilizando dsRNA.

Palavras-chave: *Blattella germanica*, FOXO, TOR, IR, S6K, Vg, RT-PCR, Southern Blot, RNAi *in vivo.*

3.2 INTRODUÇAO

Uma idéia aproximada da determinação da função das proteínas em organismos que não se podem modificar geneticamente de forma estável, como no caso da *B. germânica* consiste no silenciamento transitório dos transcritos que as codificam. Este procedimento se baseia no tratamento com uma fita dupla de RNA (dsRNA) idêntica a um fragmento do mensageiro que se predente silenciar, o qual, quando penetra nas células se processa em fragmentos de 21-23 nucleotídeos que desencadeiam a degradação do mensageiro endógeno da diana (Plasterk, 2002,Schutze, 2004).

Recentemente, têm sido realizados vários experimentos, de interferência com FOXO, com objetivo de poder explicar a função de sua proteína em vários organismos. Ratos de cobaias interferidos para FOXO 1 morrem depois do décimo dia de vida por defeitos de agiogenesis (Furuyama *et al*., 2004; Hosaka *et al*., 2004). Alem disso o mutante heterozigoto para FOXO 1 possuem o fenótipo de diabético igual ao mutante para receptor de Insulina (Nakae *et al*., 2002), que nos permite uma importante conclusão, que FOXO 1 é um substrato fisiológico da via de insulina e está relacionado com os efeitos da insulina ou metabolismo de glicose nessas cobaias.

3.3 MATERIAIS E METODOS

O primeiro passo foi realizar a clonagem da região de FOXO que se utilizaram para a síntese de dsRNA.

Tabela 3.1: Nucleotídeos utilizados para amplificar o duplo RNA.

MOLECULA	NOME PRIMER	SEQUENCIA PRIMER	TAM. FRAG.
FOXO	Foxo R 5	GAAGTCGTAAGTCGGCTGGTACG	520 pb
FOXO	Foxo F 7	CGTCCAAAATGAAGGCACAGGAAA	

Para a síntese dos correspondentes dsRNAs tem que partir de um fragmento linear de DNA que contem, em um extremo o promotor T7, ou SP6, e um extremo 5' no outro extremo. Foi realizada uma digestão overnight com 30-40 µg do plasmidio com Bam HI e Sal I.

Depois de realizada a digestão dos fragmentos os mesmo foram precipitados com fenol-cloroformio/isoamilico (25:24:1). O precipitado foi resuspendido em 11 µl de H_2O DPEC.

Como controle nos experimentos de RNAi as fêmeas foram tratadas com dsRNA sem homologia em *B. germanica* conseguido a partir de uma seqüência não codificante do plasmidio pSTblue-1 (DsCONT).

A concentração do dsRNA foi determinada por leitura da densidade óptica em um biofotometro (Eppendorf). O dsRNA foi diluído em solução salina ringer filtrado com filtro millex de 0,22 µm, ate obter a concentração desejada para injetar 1µl em fêmeas de quinta fase ninfa, sexta fase ou primeiro dia de adulta. O dsRNA foi injetado diretamente na cavidade abdominal do inseto, utilizando uma seringa HAMILTON.

Logo depois de realizada a interferência, foram realizados experimentos moleculares para detectar a redução do mRNAs de FOXO. As PCRs foram realizadas com um primer dentro e fora da região utilizada para produzir a fita dupla de RNA.

Seqüência dos primers:

Tabela 3.2: Nucleotídeos utilizados para amplificar a região utilizada para verificar a eficácia da técnica de RNAi

MOLECULA	NOME PRIMER	SEQUENCIA PRIMER	TAM. FRAG.
FOXO	Foxo R 7	AGTCTGTAGGAACTCTCCACCTT	480 pb
FOXO	Foxo F 6	CTGTCGTTACACAACCGCTTCAT	

.

A concentração do dsRNA foi determinada por leitura da densidade óptica em um biofotometro (Eppendorf). O dsRNA foi diluído em ringer filtrado com filtro millex de 0,22µm, ate obter a concentração desejada para injetar 1µl em fêmeas de quinta fase ninfa, sexta fase ou primeiro dia de adulta. O dsRNA foi injetado diretamente na cavidade abdominal do inseto, utilizando uma seringa HAMILTON.

O realizamos um experimento com interferência no primeiro dia de ninfa 6 e depois no primeiro dia de adulto, e os animais foram analisados ao quinto dia de adulto, para as técnicas RT-PCR .

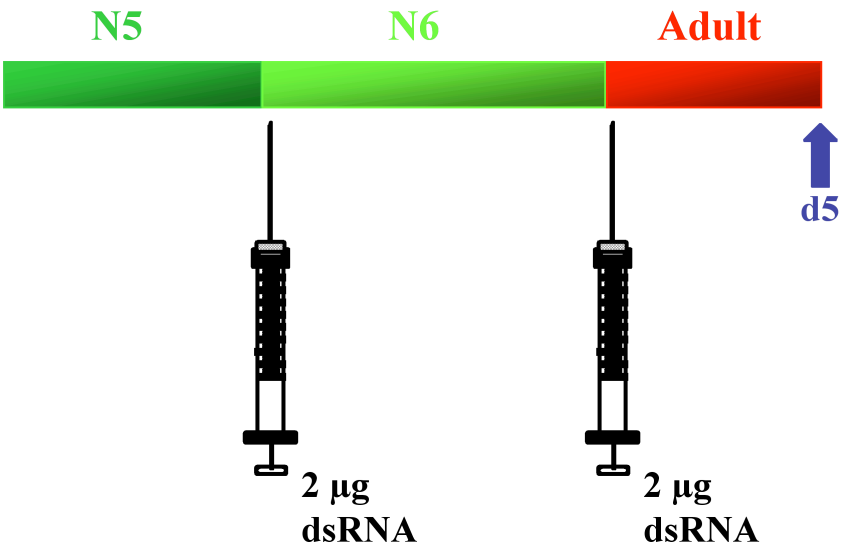


Fig. 3.1: Modelo de inserção da amostra de duplo RNA corresponde a idade do animal, ao primeiro dia de ninfa 6 e novamente ao primeiro dia de adulto

3.4 RESULTADOS E DISCUSSAO

3.4.1 INTERFERENCIA FOXO ANALISADAS AO QUINTO DIA DE ADULTO.

Começamos com o experimento, aplicando 2µg em 2 µl em animais no primeiro dia de ninfa 6, e logo depois ao mudarem a adulto no seu primeiro dia de adulto para serem analisados ao quinto dia de adulto, nos controles foram injetados 2µg em 2 µl de dsRNA heterologo conseguido a partir do vetor de clonagem (DsCONT). Os animais foram observados todos os dias e analisadas todas as variáveis, como comida, água, e a letalidade do tratamento.

Ao quinto dia de adulto foram realizadas as dissecçoes dos tecidos (CG e OV), e armazenados em ultra –freezer -80°C, Alem disso realizamos a medição da longitude basal do oocito..

Neste experimento foram observados um atraso medio de 1 a 2 dias na muda ninfa-adulto, comparando DsCON e DsFOXO, sendo que DsFOXO tardaram mais na mudança de fase ninfa-adulto, assim também foi notado uma letalidade de 45% em DsFOXO (3 de 7 animais), sendo duas ninfas, e um adulto, destes 4 animais sobreviventes 2 (50%) possuíam como fenótipo, asas mal formadas e problemas com os oocitos como descrito abaixo. Não houve perdas no grupo DsCONT.

Analisando a extração dos oocitos, notamos que os oocitos dos interferidos para FOXO eram deformados, com uma coloração mais escuras, heterogenios entre eles, com relação ao tamanho, não se desenvolveram como oocitos de um adulto de cinco dias, alguns possuindo tamanho igual a de 1 dia mostrando quase nenhum desenvolvimento. Todos os controles estavam normais, sem apresentar diferenças entre tamanho dos oocitos, e sem atraso no ciclo reprodutivo.

A analise de LOB esta descrita no gráfico abaixo comparando o tamanho dos oocitos interferido DsFOXO, e DsCON, demonstrando um retardo no crescimento dos mesmos nos animais interferidos.

Também foi verificado uma grande diferença na LOB comparando dentro do mesmo grupo de interferidos sendo os oocitos heterogêneos entre eles com relação ao tamanho, forma e coloração.

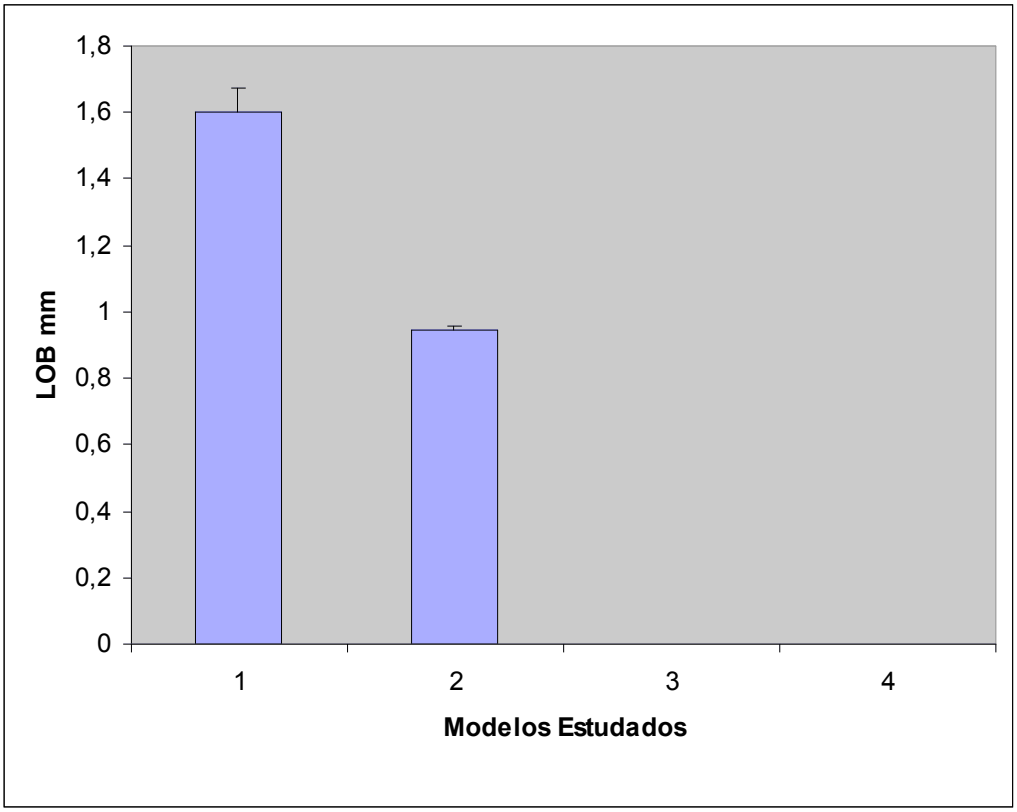


Fig. 3.2: Longitude basal do oocito (LOB) em fêmeas adultas de 5 dias de B. germânica tratados com DsRNA control (DsCON) e tratados côn DsRNA para FOXO (DsFOXO) (*test-t*, $p < 0.0001$). 1 DsCON e 2 DsFOXO. Resultados expressados como media +/- SEM.

Quando realizada a extração do RNA para analise molecular não foi demonstrada nenhuma diferença significativa entre a quantificação do RNA total comparando controles e interferidos para FOXO.

A analise dos níveis de expressão no CG por estes animais, uma diminuição significativa da expressão de FOXO para os interferidos para FOXO, com relação aos controles.

Com relação aos outros transcritos (BgIR, BgTOR, BgS6K e Vg), não houve diferença de expressão comparando os interferidos para FOXO e controles. O fato de não encontrarmos diferença nos níveis de mRNA para Vg nas fêmeas DsFOXO sugere que a diminuição no crescimento dos oocitos que se observou com o tratamento pode ser devido a um problema na oogenese no ovário e não na produção de Vg no CG.

Abaixo a fig. 3.3 com todos os transcritos analisados entre DsCONT e DsFOXO para animais de 5 dias de adulto.

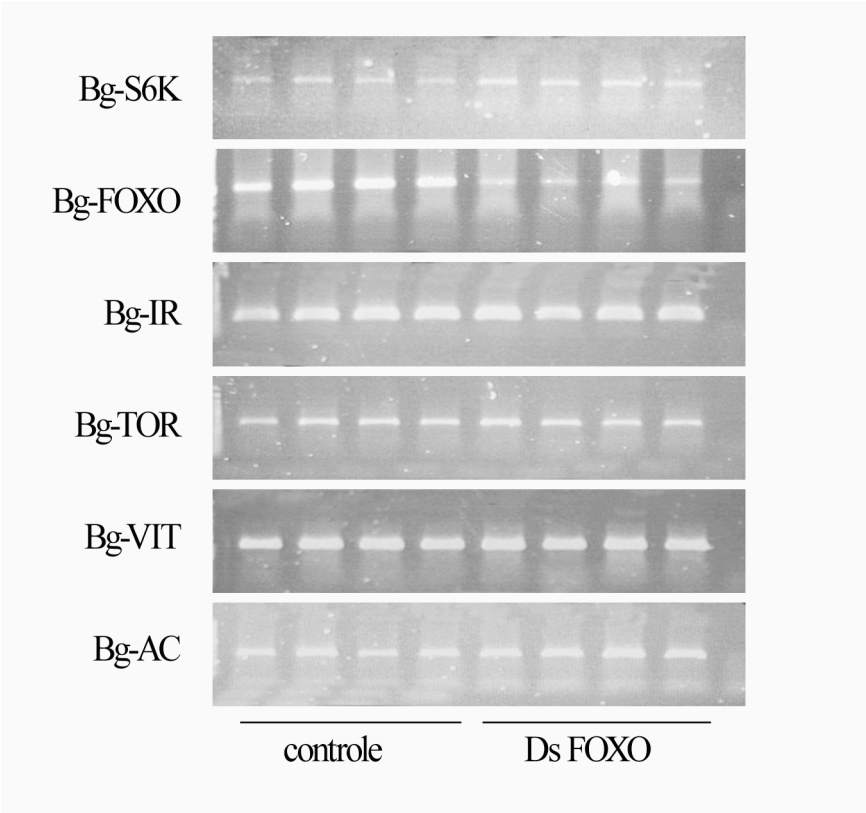


Fig. 3.3: Níveis de mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, Vg e actinas no CG em fêmeas adultas de 5 dias.

Esse resultado demonstra que animais interferidos para FOXO para o tecido do CG, não interfere a nível de transcrição na expressão dos outros transcritos analisados.

Também foram realizados analises com as técnica RT-PCR para o tecido do ovário. Para esse tecido se verificou uma diminuição do mRNA de FOXO, nenhuma mudança nos transcritos Bg S6K, BgTOR, e BgIR.

Abaixo a Fig.5.4 comparando todos os transcritos analisados para o tecido do Ovário.

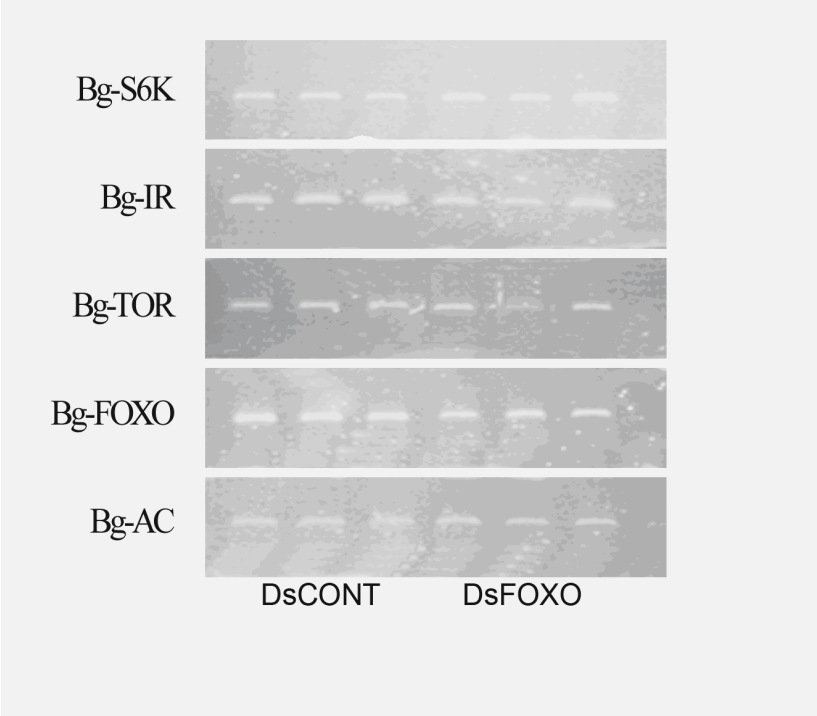


Fig. 3.4: Níveis de mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, Vg e actinas no OV em fêmeas adultas de 5 dias.

3.4.2 INTERFERENCIA PARA FOXO EM ANIMAIS ALIMENTADOS E NAO ALIMENTADOS ANALISADOS AO QUINTO DIA DE ADULTO

Começamos com o experimento para Interferidos, aplicando 2µg em 2 µl em animais no primeiro dia de ninfa 6, logo depois, assim como descrito no modelo anterior esperamos os animais mudarem a adulto e aplicamos novamente a quantidade de 2µg em 2 µl no primeiro dia de adulto, para serem analisados ao quinto dia de adulto, nos controles foram injetados 2µg en 2 µl de dsRNA heterologo. A partir do primeiro dia de adulto, para um grupo de indivíduos de cada tratamento (DsFOXO e DsCON) foi mantido somente com água (AL-), enquanto que o outro grupo de cada tratamento foi mantido tanto com água como com comida ad libitum (AL+).

Não houve nenhuma perda de animais nos DsCONT, todos os animais que não foram analisados foram descartados. Podemos ver tambem que os interferidos para FOXO mantidos sem alimento, tiveram uma taxa de mortalidade superior aos 50% sendo 7 animais de um total de 11, e mantiveram o fenótipo anterior de má formação nas asas, e oocitos deformados descrito anteriormente.

As dissecçoes ocorreram conforme descrito em metodologia, tanto para o CG quanto para o OV.

Para a dissecçao do ovário sempre se realizou a medida da LOB (Fig. 3.5) .

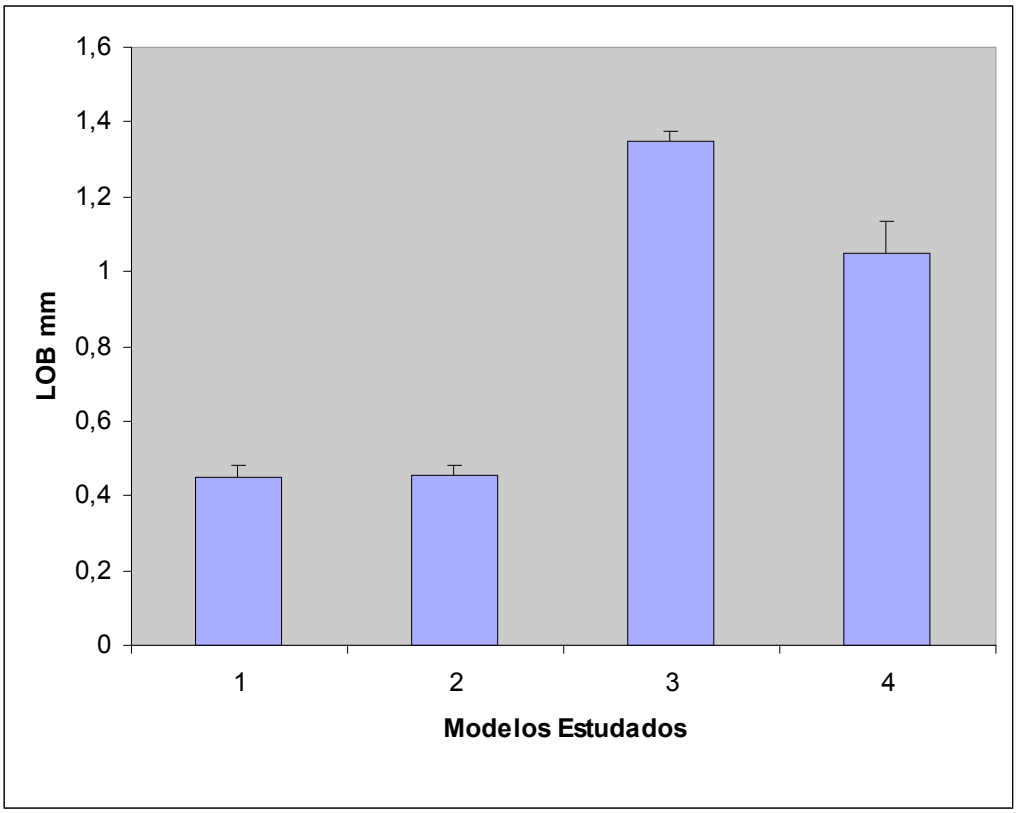


Fig. 3.5: Valores de LOB em fêmeas adultas de 5 dias de B. germânica alimentadas (AL+) ou não alimentadas (AL-) e tratadas com dsRNA para FOXO (DsFOXO) ou com dsRNA controle (DsCON). Resultados expressados como media +/- SEM.
1-DsCON AL-, 2-DsFOXO AL-, 3-DsCON AL+, 4-DsFOXO AL+

Nesse experimento tentamos analisar a interferência para FOXO com um atenuante: a presença ou ausência de alimento. Para a analise molecular utilizamos, indivíduos sem alimento interferidos para FOXO (DsFOXO AL-), indivíduos mantidos sem alimento controle (DsCONT AL-), indivíduos mantidos com alimento interferidos para FOXO (DsFOXO AL+), indivíduos mantidos com alimento controle (DsCONT AL+), para realizar uma comparação entre eles.

Com respeito a LOB se pode observar nos indivíduos alimentados a diferença da LOB já tinha sido observada anteriormente entre os grupos DsCON e DsFOXO (Fig. 3.2), Com respeito aos indivíduos não alimentados, tanto as fêmeas do grupo DsCON como as do grupo DsFOXO apresentavam

a LOB muito reduzida, similar a de fêmeas recém emergidas (Bellés *et al* 1987).

Se realizaram também um estudo da expressão dos diferentes mRNAs, no CG dos indivíduos submetidos aos diferentes tratamentos. Um dos resultados conseguidos mais significativos, alem da redução do mRNA para FOXO produzido pela interferência, é que os valores relativos da expressão de FOXO são maiores nos indivíduos não alimentados que nos alimentados (quando se comparam entre si os tratamentos, DsCON e Ds FOXO). Isto vem a confirmar o observado em animais não alimentados, de 3 dias, nos DsCON observamos que os níveis de mRNA de FOXO eram mais altos que nos animais alimentados (Fig. 2,8) e atribuímos isto ao fato do stress produzido pela não alimentação. No caso de animais de 5 dias, comprávamos que já não se observava esta diferença (Fig. 2.10) e sugerimos que 5 dias de não alimentação podia ser muito tempo para conservar níveis altos de expressão. Neste caso os resultados do presente capitulo os experimentos se realizaram em épocas diferentes com blocos de animais diferentes, e isso podia explicar o porquê de estas fêmeas não alimentadas ainda podem manter os níveis altos de expressão de FOXO. Outra possível explicação seria que ao juntar o stress produzido pela falta de alimento, com o stress produzido pelo tratamento com dsRNA, podia produzir aos cinco dias que os altos níveis de mRNA para FOXO.

Outro resultado que observamos foi que os animais não alimentados, DsCON, a Vg possui um nível de expressão muito baixo ou nulo, nos não alimentados DsFOXO, a Vg tem os níveis de expressão altos, que não correspondem com seu estado de não alimentados. Isto sugere que na situação de falta de alimento, o fator de transcrição FOXO, contribui para reprimir a transcrição do gene Vg, já que si reduzimos a presencia de FOXO, observamos uma alta expressão deste gene. O efeito observado podia ser devido a redução de FOXO no CG ou a um possível aumento da produção de HJ nos CA de animais DsFOXO não alimentados. Futuros experimentos comprovaram esta hipótese.

O resto de mRNA estudados (S6K, IR e TOR) não mostraram diferenças significativas com nenhum dos tratamentos.

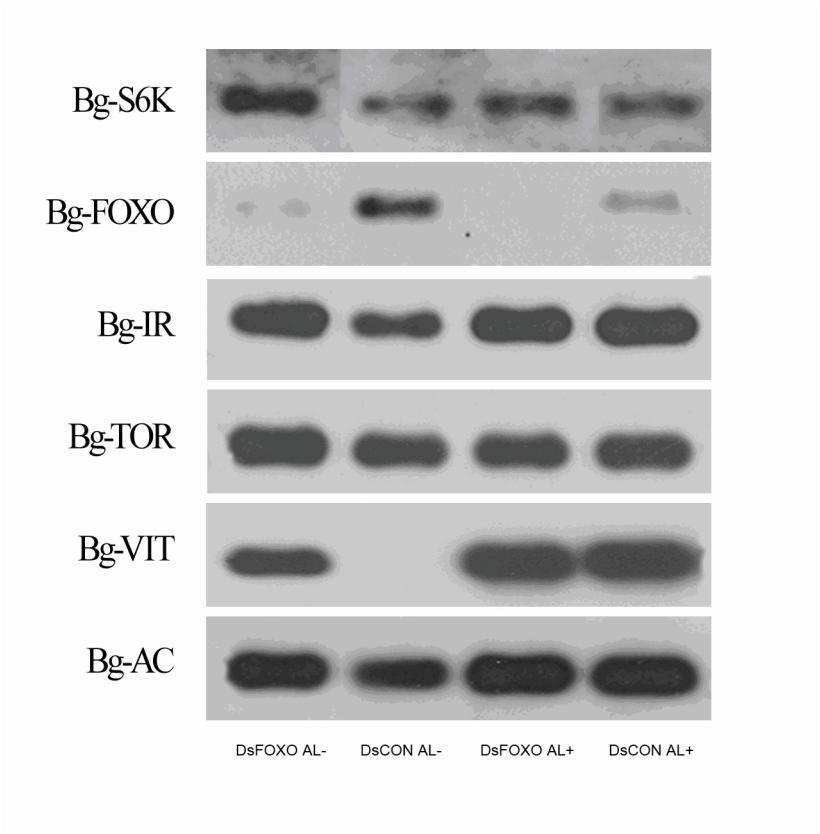


Fig 3.6: Níveis mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, Vg e actinas no CG de fêmeas adultas de B. germânica de 5 dias DsCON e DsFOXO e alimentados e não alimentados.

Foram também realizados os níveis de expressão dos diferentes transcritos no ovário de fêmeas dos diferentes tratamentos. Também foram observados neste caso, como no caso do CG, que a não alimentação fez aumentar os níveis dos transcritos para FOXO. Isto se fez mais evidente no caso dos animais não alimentados DsFOXO, no qual não se observa a redução dos transcritos de FOXO que se deveria produzir e que si observa nos animais alimentados.

Igualmente como no caso do CG não se observou diferenças para S6K, IR e TOR.

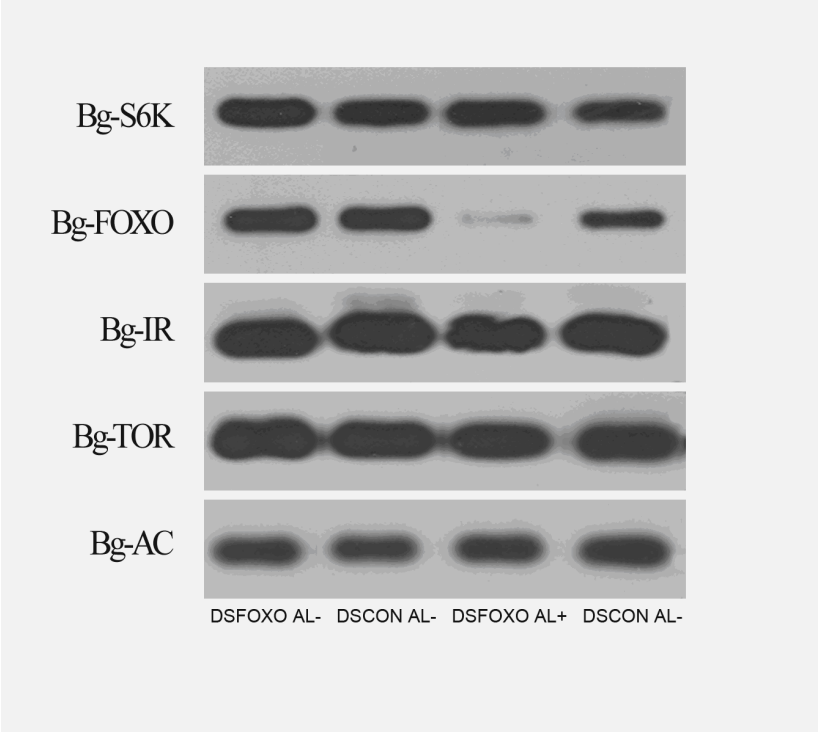


Fig 3.7: Níveis mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, e actinas no OV de fêmeas adultas de B. germânica de 5 dias DsCON e DsFOXO e alimentados e não alimentados.

Em *Apis mellifera* Corona *et al*., 2007 sugere um modelo de interação entre a Vg o HJ e o IR para regular a longevidade nessas abelhas. Eles propõem que em baixas condições de nutriente aumenta a expressão de IR resultando em fosforilaçao de FOXO e esse sendo assim é mantido no citoplasma. Nesse estagio FOXO não reprime a síntese de HJ, sendo contrario ao proposto para *Drosophila* (Flatt T. *et al*., 2005), Altos níveis de HJ reprime vitellogenesis resultando em baixos níveis de Vg, sendo um mecanismo de feedback pois com baixos níveis de Vg estimula a secreção de IR. Esse modelo seria um contrario ao da *B. germanica* visto que com altos níveis de HJ nesse inseto se aumenta a produção de Vg mais o interessante é que demonstra uma ligação direta entre FOXO e Vg. No nosso modelo estudado essa ligação seria oposta a encontrada visto que como vimos quando se anula o efeito de FOXO por Rnai interferência, obtivemos a expressão de Vg, mesmo em condições conhecidas de sua inibição (falta de alimento).

3.5 CONCLUSOES

- O tratamento de fêmeas de *B. germânica* com dsRNA *in vivo* para FOXO (DsFOXO) produz uma redução dos níveis de mRNAs para FOXO tanto no CG como no OV, o que sugere um efeito sistêmico para o tratamento.

- As fêmeas DsFOXO desenvolvem menos seus oocitos comparado ao DsCON. Este efeito podia ser devido a uma deficiência na oogenesis mais que a uma redução na produção de Vg, já que não observamos, diminuição de mRNA para Vg no CG de fêmeas DsFOXO.

- Com o tratamento de DsFOXO, a condição de presença ou ausência de alimento observamos que, tanto no CG como no OV, a ausência de alimento produziu um aumento de mRNA para FOXO, incluindo no caso de interferir a expressão de FOXO utilizando dsRNA.

- Alem disso no CG de fêmeas não alimentadas e tratadas com DsFOXO observamos uma elevada expressão de Vg. Isto sugere que FOXO estaria contribuindo com a inibição da transcrição do gene da Vg que se produz em fêmeas não alimentadas.

3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Belles, X., J. Casas, A. Messeguer, and M. D. Piulachs. (1987). In vitro biosynthesis of JH III by the corpora allata of adult females of Blattella germanica (L.). Insect Biochem. **17**:1007-1010.

Corona, M., Velarde, R. A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. A., and Robinson, G. E. (2007). Vitellogenin, juvenile hotmone, insulin signiling, and queen honey bee longevity. *PNAS*., 17 pp 7128-7133.

Flatt T., Tu M.P., Tatar M. (2005). Hormone pleiotrope and the juvenile hormone regulation of Drosophila development and life History. BioEssays 27 pp 999-1000

Furuyama, T. Nakazawa, T. Nakano, I. Mori, N. (2000). Identification of the differential distribuition patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J*., **349**:629-634.

Martín, D., Piulachs, M. D., Comas, D., and Belles, X. (1998) *Arch Insect Biochem Physiol* **38**, 137-146.

Nakae, J., Biggs, W.H., 3rd, kitamura, T., Cavenee, W. K., Wright, C.V., Arden, K.C., and Accili, D. (2002). Regulation of insulin action and pancreatic β-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo 1. *Nat. Genet*. **32**, 245-253.

Osorio, S., Piulachs, M.D., Bellés, X. (1997).Feeding and Activation of Corpora Allata in the Cockroach Blattella germanica (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). J. insect Physiol. 31-38.

Plasterk, R. 2002. RNA Silencing:The Genomes Immune System. Science. **296**(5571):1263-1265.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis (eds.). (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

4. ANEXOS;

MATERIAIS E METODOS.

2. METODOLOGIA E MATERIAIS

2.1 MATERIAL BIOLOGICO

2.1.1 INSETOS

Foram utilizados nos experimentos fêmeas de *B. germânica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae), que são mantidas em uma colônia no laboratório, com condições constantes de temperatura (30 °C), com umidade relativa (70 – 75 %) sem a presença de luz. A alimentação das baratas consiste em ração canina PANLAB 125 e agua *ad limitum* (Piulachs, 1987).

2.2 TECNICAS DE DISSECÇAO

Todas as dessecações foram realizadas com os animais anestesiados com CO_2. Para a manipulação e a extração dos tecidos foram utilizadas pinças INOX 5 Super Wite e microtesouras Diener. Todas as dessecações se realizaram com a solução salina Ringer.

Tabela 1: Condiçoes Soluçao Ringer

	Soluçao salina Ringer
NaCl	9 g/l
KCl	0,2 g/l
$NaHCO_3$	0,2 g/l
$CaCl_2$	0,2 g/l

2.2.1 DISSECÇAO DOS OVARIOS, DO CORPO GORDUROSO E CORPORA ALLATA.

Foram extraídos corpo gorduroso, ovário e corpora allata de fêmeas de 0 a 7 dias de adulto.

Para se determinar a idade fisiológica correta das fêmeas adultas foi medida a longitude basal do oocito como parâmetro, de acordo com Piulachs (1987).

Tabela 2: Medidas de LOB segundo modelo Piulachs., 1987

DIAS	LOB (mm)
0	0,42 – 0,47
1	0,48 – 0,5
2	0,53 – 0,54
3	0,61 – 0,81
4	0,99 – 1,28
5	1,30 – 1,68
6	1,76 – 1,94
7	1,96 – 2,26

Para extrair os ovários e o corpo gorduroso foram realizados cortes longitudinais na parte ventral do abdômen do inseto, da cloaca genital até o tórax. Seguidamente, foram separados os externos abdominais, o corpo gorduroso foi extraído retirando primeiro todo o tracto intestinal do animal, assim limpando esta região e não correndo risco de contaminação com resíduos intestinais ao corpo gorduroso, este se encontra junto à parede abdominal tanto do lado esquerdo como do lado direito. Foram utilizadas pinças para retirar este tecido completamente tomando sempre o cuidado de

não retirar a cutícula junto ao mesmo. Antes de extrair o corpo gorduroso (CG), foram extraídos os ovários (OV) que se encontram situados, um de cada lado do tubo digestivo.

As dessecações dos corpora allata (CA) foram realizadas através de uma abertura na cabeça do animal na zona occipital. Inclinado à cabeça do animal para frente e uma vez retirado o tecido muscular e gorduroso que se encontram justo depois do orifício occipital, se pode ver o complexo retrocerebral, formado por corpora cardíaca (CC) e os corpora allatas (CA), que estão entre dois grandes traqueas dorsais dispostas longitudinal e situado em cima do esôfago e do gânglio sub-esofagico.

Devido ao seu reduzido tamanho, os CA sempre foram extraídos com uma parte de CC, que posteriormente intentamos eliminar a maior parte possível deste tecido.

2.3 EXTRAÇãO DE ACIDOS RIBONUCLEICOS

As extrações de RNA foram realizadas com o Kit de Sigma GenElute Mammalian Total RNA seguindo as instruções do fabricante. Para as extrações de RNA total do corpo gorduroso e ovário, previamente congelados em nitrogênio liquido, foram triturados com um homogenizador mecânico, para os CA, foram congelados com o tampão de lises e foi realizada diretamente a extração de RNA. Uma vez extraído foi realizada a quantificação da concentração e pureza com absorbância a 260 e 280 nm.

2.4 CLONAGEM

A clonagem dos homólogos de FOXO em *B. germanica* foi realizada com PCRs, e complementadas com 5’ e 3’ RACE.

2.4.1 PCR

A partir do alinhamento das seqüências de FOXO conhecidas de insetos até o momento (*Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambie* entre outras) junto com as seqüências de FOXO 1 em humano, foram desenhados primers degenerados, tendo assim uma seqüência conhecida em *B. germânica,* Como molda foram utilizados cDNA gerado a partir de RNA poli A de células UM- BGE-1 de *B.germanica*.

As PCRs foram realizadas com a enzima Accutaq (Sigma), segundo normas do fabricante, menos quando foram utilizados primers degenerados, porque para os primers degenerados foram utilizados uma concentração 5 vezes maior do que com primers específicos.

OLIGONUCLEOTIDEOS DEGENERADOS UTILIZADOS:

Tabela 3: Nucleotídeos utilizados para amplificar primeiros fragmentos de FOXO em *B. germânica*

MOL.	NOME PRIMER	SEQUENCIA PRIMER	ESP. OU DEG.
FOXO	Foxo R 1	TCGTCGATGATT(C)GAT(C)CC(T)GAA(G)	
FOXO	Foxo R 2	ACCATCCA(CT)TC(AG)TA(AGT)AT(CT) TG	DEGENERADO
FOXO	Foxo F 1	AA(CT)GC(AGCT)TGGGG(AGCT)AA(CT) (CT)T	DEGENERADO
FOXO	Foxo F 2	CAA(G)ATT(C)TAT(C)GAA(G)TCGGAT(C)	DEGENERADO
FOXO	Foxo F 3	CCT(A/G)TAT(C)TTT(C)AAA(G)GCT(C/A) AAA(G)GGT(C/A)GAT(C)	DEGENERADO

.

Condiçoes para Foxo:

94 °C	2 min	X 1
94 °C	30 seg	
48 °C	30 seg	X 4
68 °C	1 min	
94 °C	30 seg	
52 °C	30 seg	X 35
68 °C	1 min	
68°C	10 min	X 1

2.4.2 AMPLIFICAÇÃO DOS EXTREMOS 5' E 3' DOS cDNAs

Para obter as seqüências completas de FOXO foram utilizadas as técnicas de 5' e 3' RACE (*Rapid Amplification of cDNA End*).Esta tecnica foi descrita inicialmente por Forhman *et al*. (1988) os experimentos foram realizados seguindo instruções do 5' RACE, Version 2.0 (Invitrogen), e seguindo as instruções do 3' RACE f, Version 2.0 (Invitrogen), a partir de 2µg de RNA total obtido de células UM-BGE-1 de *B. germanica*.

Os oligonucleotideos específicos utilizados nas duas técnicas foram desenhados com base na seqüência de FOXO obtida segundo descrito anteriormente.

Tabela 4: Nucleotídeos utilizados para amplificar extrema 5´ prima.

Tecnica	Molécula	Nome primer	Sequência primer
5'RACE	FOXO	FOXO R11	GTTCTGGACCATCCATTCGTAGAT
5'RACE	FOXO	FOXO R10	TGCGAGAGCGTGAGCCTCTTC

Tabela 5: Nucleotídeos utilizados para amplificar extrema 3´ prima

Tecnica	Molécula	Nome primer	Sequência primer
3'RACE	FOXO	FOXO F 7	CGTCCAAAATGAAGGCACAGGAAA
5'RACE	FOXO	FOXO F 10	TCGTATCCACAGTCCGAGCCGT

As reações de PCR foram realizadas com 5µl de dC- tailed DNA. Em todas as amplificações utilizou a DNA-polimerasa Ecotaq (Ecogen) seguindo as instruções do fabricante.

Condições das PCRs para 3' RACE:

94°C	2 min	
94°C	30 min	
74°C	1 min	5x
63°C	1 min	
94°C	30''	
74°C	1'30''	45x
63°C	1 min	
74°C	10 min	

Condições das PCRs para 5' RACE:

94°C	2 min	
94°C	30 min	
74°C	1 min	5x
63°C	1 min	
94°C	30''	
74°C	1'30''	45x
63°C	1 min	
74°C	10 min	

2.5 ELETROFORESE DE DNA

A eletroforese se realizou em gel de agarose 1% (p/v), preparados com tampão TBE 0,5X. Em cada poço foram cargados a quantidade adequada de DNA diluído em tampão de carga (Sambrook *et al*., 1989), com voltagem constantede100 – 130V logo depois foi realizado um banho com solução de brometo de etidio a 0,2µg/ml em água. A visualização se realizou em um transluminador de luz ultravioleta.

Tabela 6: Condições do Tampão de eletroforese.

Tampão eletroforese TBE 0,5X	
Tris base	44,5 mM
Acido borico	44,5 mM
EDTA (pH 8.0)	1 mM

2.6 LIGAÇãO

Todas os fragmentos de DNA conseguidos por PCR foram ligados em pSTBlue-I seguindo as instruções do pAcceptor Vector Kit (Novagen). As transformações do DNA plasmidico foram realizadas com células competentes Novablue de *E.coli* (Novagen), seguindo o procedimento descrito por Sambrook (1989).

2.7 PURIFICAÇãO DOS PLASMIDIOS

A purificação do DNA plasmidico se realizou seguindo as instruções de Gen Elute Plasmid Miniprep KIT (SIGMA) a partir de cultivos líquidos incubados overnight a 37°C com agitação constante (250 r.p.m).

2.8 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento do DNA se realizou com o metodo de terminação da cadeia de dideoxinucleotideos. Os diferentes clones foram sequenciados em ambos sentidos utilizando os oligonucleotideos T7 e SP6 (presentes no vector de clonagem), assim como outros internos especificos, com o sistema ABI de sequenciamento automático por fluorescência. Estas seqüências se realizaram no Servicio de sequenciamento de DNA do Instituto de Biologia Molecular de Barcelona do CSIC de Barcelona.

2.9 RT-PCR SEMIQUANTITATIVA

Para determinar as quantidades relativas dos UNAM se realizou a técnica de RT-PCR semiquantitativa. Esta técnica tem como principio a retro transcrição de uma quantidade constante de RNA, que serve como molde para realizar PCR com oligonucleotideos específicos, permitindo determinar a abundancia relativa de cada transcrito. Previamente a retro transcrição o RNA foi tratado com DNasa para eliminar qualquer traço de DNA genomico.

Procedimento:

- No volume inicial de 10µl acrescentar os seguintes reagentes
  300ng – 1µg de RNA
  1µl Tampão da DNasa
  1µl RQ1 RNase-Free DNase (PROMEGA)
- Incubar 30’ a 37°C.
- Acrescentar 1µl de solução Stop da DNasa a reação e incubar por 10’ a 65°C para que inative a reação da enzima.
- Colocar em gelo

Retrotranscrição:

- Incubar as amostras durante 5' a 75°C para a desnaturalização do RNA.
- Tirar e colocar em gelo para evitar hibridação entre as cadeias de RNA.
- Colocar em cada tubo

  4 µl tampão de reação 5X (invitrogen)

  0,5 µl Random primers (hexameros de 500ng/ µl

  0.4 µl de 10 µM de cada dNTP.

  2 µl de 0.1 M DTT

  1 µl de 40 unidades/ml de RNAsin Ribonuclease Inhibitor (Promega)
- Equilibrar a reação durante 10' a temperatura ambiente
- Acrecentar 200 unidades de SuperScript TM II RNase H^+ Reverse Transcriptase (Invitrogen)
- Equilibrar a reaçao durante 10 minutos em temperatura ambiente.
- Incubar por 50' a 42°C para a retrotranscrição.
- Incubar durante 10' a 75°C para terminar a reação.
- Deixar equilibrar a reação a temperatura ambiente.
- Acrecentar 20µl de TE pH 8.0

PCR:

As condições de PCR se realizaram dentro da zona de amplificação linear de cada transcrito. O mesmo produz a quantidade de DNA obtido pela PCR, ou seja proporcional a quantidade de cDNA inicial e por tanto a quantidade de mRNA que queremos analisar.

Para todo os transcritos analisados FOXO, ACTINAS, IR, TOR, S6K, VG, SINTASA, foram realizadas linearidades, nas quais as PCRs continham 4 amostras com as condições adequadas para cada transcrito, sendo ao completar uma quantidade de ciclos analisada é retirada uma amostra e contado cinco ciclos mais retira-se outra amostra, com três

pontos distintos de quantidades de ciclos para verificar que no tenha saturação da amostra e descobrir uma quantidade de ciclos adequada a cada transcrito.

Concentrações finais dos Reagentes

1X	Tampão da PCR
1,5mM	MgCl2
200µM	de cada dNTP
200nM	Primer reverse
200nM	primer
1µl	cDNA
1 uni	Taq DNA polimerase

Volume final 25µl em H2Odd

As condições de PCR se realizaram dentro da zona de amplificação linear de cada transcrito.

Concentrações dos Reagentes

1X	Tampão da PCR
1,5mM	MgCl2
200µM	de cada dNTP
200nM	Primer reverse
200nM	primer
1µl	cDNA
1 uni	Taq DNA polimerase

Volume final 25µl em H2Odd

OLIGONUCLEOTIDEOS UTILIZADOS:

Tabela 7: Nucleotídeos utilizados para amplificar a região utilizada para caracterizar a expressão do fragmento de FOXO, TOR, IR, S6K e VIT em fêmeas adultas de 0 a 7 dias

MOLECULA	NOME PRIMER	SEQUENCIA PRIMER	TAM. FRAG.
FOXO	FOXO R 5	GAAGTCGTAAGTCGGCTGGTACG	520 pb
FOXO	FOXO F 7	CGTCCAAAATGAAGGCACAGGAAA	
TOR	TOR R10	GCAGTCTGTCCCACCACATCTT	
TOR	TORF10	CTGGGAGAAGGCATTACATTCCTA	
S6K	S6K F5	CAAAGTCACAGGCCAAGATGCAG	
S6K	S6K R4	AGTGCTCCTAATGACCACCAGTC	
IR	IR R4	TAGGTCGCGATGTACATACTTCTT	
IR	IR F4	GTGCCATTAAGACTGTAAATGAAC	
VIT	VIT F	TGAAATGCGAAGGAAAGCCAA	
VIT	VIT R	CCTGTCAAGACCTGAAATGTA	

.

2.10. SOUTHERN BLOT

2.10.1 ELETROFORESE E TRANSFERÊNCIA DO DNA.

A eletroforese do DNA se realizou como descrito anteriormente. Posteriormente, os géis são desnaturalizados durante 30 minutos em uma solução de desnaturalização em agitação constante, e a continuação realizou se uma neutralização outros 30 minutos. Em seguida o DNA foi transferido overnight a uma membrana de nylon Hybondy-N (Amersham) por capilaridade em uma solução SSC x10. Depois de fixado o DNA a membrana mediante irradiação com luz ultravioleta (UVStratalinker 2400, Stratagene).

Soluções:

Solução de desnaturalização

NaCl 1,5 M

NaOH 0,5 M

Solução de neutralização

NaCl 1,5 M

Tris-HCl (pH7,2) 0,5 M

SSC x 10

NaCl 1,5 M

Citrato sodico 150 mM

Ajustar o pH a 7 e filtrar.

2.10.2 HIBRIDAÇÃO E DETECÇÃO

As membranas com o DNA fixado, se pre-hibridam em uma solução de hibridação, durante 1h a 42°C em agitação constante. Depois da pré-hibridação, se acrescentou a sonda correspondente marcada com fluoresceINA deixando em agitação a 42°C overnight. Para detectar a marcagem se seguio as instruções do Gene Image CDP-Star Detection module (Amersham).

Solução de Hibridação

SSC 2x

SDS 0,1%(p/v)

Sulfato de dextrano 5% (p/v)

Liquido de bloqueo 1/20

2.11 MARCAÇAO DE SONDA COM FLUORESCÊNCIA.

As sondas utilizadas nos Southern blot, das diferentes RT-PCRs, foram conseguidas por PCRs utilizando diferentes primers, específicos para cada transcrito, descritos em 2.9 resultados.Como molde foram utilizados cDNAs correspondentes de cada transcrito previamente clonados com vetor pSTBlue1. Estas PCRs foram purificadas com o Kit Sigma GenElute PCR Clean-up, e a continuação marcadas com fluorescência segundo instruções do Gene Images Random Labelling Module (Amersham).

2.12 RNA DE INTERFERENCIA *IN VIVO*

Uma aproximação atual da determinação da função das proteínas nos organismos que não se podem modificar geneticamente de forma estável, como e o caso da B. germânica, consiste no silenciamento transitório dos transcritos que codificam.

Este procedimento se baseia no tratamento com uma fita dupla de RNA (dsRNA) idêntica a um fragmento do mensageiro que se pretende silenciar, o qual, quando penetra nas células se processa em fragmentos de 21-23 nucleotídeos que desencadeiam a degradação do mensageiro endogeno da diana (Plasterk, 2002, Schutze, 2004).

2.12.1 OBTENÇÃO DO RNA DE FITA DUPLA (DSRNA):

- Clonagem

O primeiro passo foi realizar a clonagem da região de FOXO que se utilizaram para a síntese de dsRNA.

Tabela 8: Nucleotídeos utilizados para amplificar o duplo RNA.

MOLECULA	NOME PRIMER	SEQUENCIA PRIMER	TAM. FRAG.
FOXO	Foxo R 5	GAAGTCGTAAGTCGGCTGGTACG	520 pb
FOXO	Foxo F 7	CGTCCAAAATGAAGGCACAGGAAA	

Linealização do DNA plasmidico:

Para a síntese dos correspondentes dsRNAs tem que partir de um fragmento linear de DNA que contem, em um extremo o promotor T7, ou SP6, e um extremo 5' no outro extremo. Foi realizada uma digestão overnight com 30-40 µg do plasmidio com Bam HI e Sal I.

Depois de realizada a digestão dos fragmentos os mesmo foram precipitados com fenol-cloroformio/isoamilico (25:24:1). O precipitado foi resuspendido em 11 µl de H_2O DPEC.

Sínteses de dsRNA:

- As reações de síntese de RNA de fita simples (ssRNA) foi realizada de forma independente.
- Em m volume final de 50µl:

23µl	fragmento linear do DNA plasmidico
10µl	5x Promega Buffer (Promega)
4µl	100mM DTT (Promega)
1µl	RNAsin Ribonuclease Inhibitor (40µ/µl) (Promega)
10µl	10 mM cada rNTP (Amersham)
1,5µl	SP6 RNA-polimerase (15µ/µl) (Promega)
ou	T7 RNA-polimerase (20µ/µl) (Promega)

- Incubar 1h a 37°C.
- Verificar o correto funcionamento das reações com eletroferese (1µl de cada reação)
- Juntar as duas reações de ssRNA (Sp6 e T7 polimerase.).
- Incubar em um banho a 95°C durante 10 minutos.
- Deixar que a temperatura diminua progressivamente e naturalmente ate cegar a temperatura ambiente, permitindo assim a hibridação das fitas simples complementares de ssRNA.
- Concentrar os dsRNAs por precipitação por fenol/cloroformio/etanol. Resuspender el precipitado em 39,5 µl de H2O dpec.
- Realizar tratamento conjunto com DNasa e RNasaA para eliminar o DNA plasmidico, assim como o ssRNA que não se hibridou.
- Em um volume final de 50 µl:

5µl	Tampão da DNasa (x10) (Promega)
5µl	DNase/RNase-free (1µ/µl) (Promega)
0,5µl	RNaseA (10 µg/µl) (SIGMA)

  Incubar 15 min a 37°C
- Limpar e concentrar com outra precipitação fenol/cloroformio/isoamilico. Resuspender em 40 µl de H2Odpec.

2.12.2 PREPARAÇÃO E INSERÇÃO DO DSRNA:

A concentração do dsRNA foi determinada por leitura da densidade óptica em um biofotometro (Eppendorf). O dsRNA foi diluído em solução salina ringer filtrado com filtro millex de 0,22µm, ate obter a concentração desejada para injetar 1µl em fêmeas de quinta fase ninfa, sexta fase ou primeiro dia de adulta. O dsRNA foi injetado diretamente na cavidade abdominal do inseto, utilizando uma seringa HAMILTON.

2.12.3 DETECÇAO DO NÍVEL DE INTERFERÊNCIA.

Logo depois de realizada a interferência, foram realizados experimentos moleculares para detectar a redução do mRNAs de FOXO. As PCRs foram realizadas com um primer dentro e fora da região utilizada para produzir a fita dupla de RNA.
Seqüência dos primers:

OLIGONUCLEOTIDEOS UTILIZADOS:

Tabela 9: Nucleotídeos utilizados para amplificar a regiao utilizada para verificar a eficácia da técnica de RNAi.

MOLECULA	NOME PRIMER	SEQUENCIA PRIMER	TAM. FRAG.
FOXO	Foxo R 7	AGTCTGTAGGAACTCTCCACCTT	480 pb
FOXO	Foxo F 6	CTGTCGTTACACAACCGCTTCAT	

2.13 EXPERIMENTO ALIMENTADOS E NÃO ALIMENTADOS

Foram desenhados experimentos com animais, fêmeas *B. Germânica,* no qual foram retirados os alimentos, uma ração pra cachorro, comida utilizada como alimento diário no insectario, lugar aonde e mantida a colônia de *B. germânica,* no ultimo dia de larva da *B. germanica* sendo que estes animais foram mantidos sem alimento ate o terceiro dia de adulto, tendo somente água. Nesse experimento também utilizamos a mesma quantidade de animais sob as mesmas condições, mas com nutrientes como controles. Todos os botes com os animais a serem analisados foram mantidos em condições normais de desenvolvimento, no insectario com temperatura e ambientes adequados para seu desenvolvimento. Os botes contendo os animais que foram analisados eram verificados todos os dias pela manha e pela tarde para certificar de que estavam todos bem e vivos. Ao completar 3 dias de adulto, foram realizadas as dessecações dos tecidos do corpo gorduroso e ovário, estes tecidos foram congelados em freezer -80 C, e posteriormente foram realizadas extrações de RNA, e analises das expressões destes transcritos via técnicas de RT-PCR e Sourthern Blot.

2.13.1 EXPERIMENTO ALIMENTADOS E NÃO ALIMENTADOS E DEPOIS ALIMENTADOS APOS 6 HORAS.

Apos o primeiro experimento com animais alimentados foram desenhados outros experimentos com, fêmeas de *B. Germânica,* no qual os animais foram divididos em três grupos: 2 botes contendo 4 animais em cada bote foram retirados os alimentos*,* no ultimo dia de larva sendo que estes animais foram mantidos sem alimento ate o quinto dia de adulto, com somente água. O terceiro bote que pertence a este experimento possuía a mesma quantidade de animais sob as mesmas condições, mas com nutrientes como controles. Todos os botes com os animais a serem analisados foram mantidos em condições normais de desenvolvimento, no insectario com temperatura e ambientes adequados para seu desenvolvimento. Os botes contendo os animais que foram analisados eram verificados todos os dias pela manha e pela tarde para certificar de que

estavam todos bem e vivos. Ao completar 5 dias de adulto, foram realizadas as dessecações dos tecidos do corpo gorduroso e ovário, pela manha dos botes de animais alimentados e não alimentados estes tecidos foram congelados em freezer -80 C, e posteriormente foram realizadas extrações de RNA, e analises das expressões destes transcritos via técnicas de RT-PCR e Sourthern Blot. Ao terceiro bote foram colocados alimentos e mantidos desta maneira por 6 horas, ao final desse período foram realizadas as dessecações e analises descritas acima, para os outros animais.