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

IMUNODETECÇÃO em FRAÇÕES PROTÉICAS de CÉREBRO DE ABELHA *Apis mellifera* de PROTEÍNAS ASSOCIADAS A VESÍCULAS SINÁPTICAS, MIOSINA-V e CA2+/CALMODULINA QUINASE II (CaMKII)

Aluna: Viviane Rodrigues Alves de Moraes

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

UBERLÂNDIA - MG
2005

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

IMUNODETECÇÃO em FRAÇÕES PROTÉICAS de CÉREBRO DE ABELHA *Apis mellifera* de PROTEÍNAS ASSOCIADAS A VESÍCULAS SINÁPTICAS, MIOSINA-V e CA2+/CALMODULINA QUINASE II (CaMKII)

Aluna: Viviane Rodrigues Alves de Moraes

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte das exigências curriculares do curso de Pós-graduação em Genética e Bioquímica para obtenção do título de Mestre em Genética e Bioquímica.

UBERLÂNDIA - MG

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

M827i Moraes, Viviane Rodrigues Alves de, 1963-
Imunodetecção em frações protéicas de cérebro de abelha Apis melli-fera de proteínas associadas a vesículas sinápticas, miosina-V e CA2+/ calmodulina quinase II (CaMKII) / Viviane Rodrigues Alves de Moraes. - Uberlândia, 2005.
119f. : il.
Orientador: Foued Salmen Espindola.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Abelha-européia - Teses. 2. Proteínas - Teses. 3. Exocitose - Teses.
I. Espindola, Foued Salmen. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III.Título.

CDU: 595.799(043.3)

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

IMUNODETECÇÃO em FRAÇÕES PROTÉICAS de CÉREBRO DE ABELHA *Apis mellifera* de PROTEÍNAS ASSOCIADAS A VESÍCULAS SINÁPTICAS, MIOSINA-V e CA2+/CALMODULINA QUINASE II (CaMKII)

Aluna: Viviane Rodrigues Alves de Moraes

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Foued Salmen Espíndola (Orientador)
Examinadores:

Amélia Hamaguchi
Luiz Cláudio Cameron

Data da Defesa: 28/02/2005

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

Foued Salmen Espindola

Uberlândia____28_____de__fevereiro_de 2005

Chego aos campos e vastos palácios da memória onde estão os tesouros de inumeráveis imagens trazidas por percepções de toda espécie. Aí está também escondido tudo o que pensamos, quer aumentando quer diminuindo ou até variando de qualquer modo os objetos que os sentidos atingiram. Enfim, jaz aí tudo o que se lhes entregou e depôs, se é que o esquecimento ainda o não absorveu e sepultou... ...Quem poderá explicar o modo como elas se formaram, apesar de se conhecer por que sentidos foram recolhidas e escondidas no interior?..."

(Santo Agostinho, O palácio da memória, Confissões, Livro X).

SUMÁRIO

1. RESUMO GERAL 08.

2. INTRODUÇÃO GERAL 11.

2.1 – As abelhas 12.

2.2 – Tráfego de membranas (As proteínas SNAREs) 19.

2.3 – Miosina-V 37.

2.4 – CaMKII 43.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 52.

4. CAPÍTULO I 78.

4.1 – Resumo 79.

4.2 – Introdução 80.

4.3 – Materiais e Métodos 85.

4.4 – Resultados 92.

4.5 – Discussão 101.

4.6 – Referências bibliográficas 109.

4.7 – Conclusão Geral 119.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina tri-fosfato
5HT	Serotonina *(5-hydroxytryptamine)*
ABS	Álcool absoluto
BSA	Soroalbumina bovina (*Bovine Serum Albumine*)
CaMKII	Proteína quinase II dependente de Ca^{++}/calmodulina
DLC	Cadeia Leve de dineína (Dynein Light Chain)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético sal dissódico
EGTA	Ácido etilenoglicol bis (beta aminoetil éter) tetracético
IP3	fosfatil inositol trifosfato
LTP	Potenciação de Longa Duração (*Long-term potentiation)*
MB	Corpos em forma de Cogumelo (Mushroom bodies)
MLCK	Quinase da Cadeia Leve de Miosina (*Myosin Light Chain Kinase)*
Mr	Massa molecular relativa
MUNC	Homólogo em mamífero da unc (*Mammalian homologue of the unc)*
NMDA	N-metil-D-aspartato
n-SEC	N*euronal homologue of the yeast Sec1 protein*
NSF	*N-ethylmaleimide-sensitive factor*
PAGE	*Polyacrylamide gel electrophoresis*
PBS	Salina tamponada em fosfato
PKA	Proteína quinase A dependente de cAMP
PKC	Proteína quinase C dependente de Ca^{++}/fosfolipídio
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PSA	Persulfato de amônia
RIM	*Rab-interacting molecule*
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SEC	*Specific syntaxin binding protein (yeast)*
SM	Família de proteínas Sec/Munc
SNAP	*Soluble NSF attachment protein*
SNARE	*Soluble NSF attachment protein receptors*
TBS	Salina tamponada em Tris-HCI
TBS-T	Salina tamponada em Tris-HCI e tween
TEMED	N'N'N'N'- Tetrametilenodiamino
TV	Tampão de Vesículas
VAMP	*Vesicle associated membrane protein*
VS	Vesículas sinápticas

1.RESUMO GERAL

Entre os intrincados mecanismos construtores da neuroplasticidade, destacam-se aqueles que permitem a comunicação neuronal, como a exocitose. As várias etapas, os parceiros protéicos, as modificações enzimáticas e fisiológicas, e suas implicações na memória e aprendizado têm sido tema de inúmeros estudos. A abelha é um organismo considerado modelo, por seu complexo padrão comportamental e sua simples e eficiente plasticidade neural. Com o objetivo de encontrar proteínas envolvidas em etapas da via da exocitose, sondou-se por *immunoblottings*, frações de cérebro de *A. mellifera* relacionando o grau de similaridade existente entre estas e aquelas já descritas em vertebrados.

Sabe-se que a plasticidade sináptica está diretamente relacionada com a capacidade de aprendizagem, armazenamento e evocação de memórias. As abelhas apresentam um vasto repertório comportamental, servindo como parâmetro para estudos dos níveis de complexidade das funções cognitivas em cérebro de insetos. A base molecular de seu comportamento social tem sido sempre investigada devido ao paradoxo de possuírem exclusivas, intrigantes e complexas respostas a estímulos, baseados em uma simples e eficiente neuroplasticidade. Contendo aproximadamente cerca de 960.000 neurônios (células Kenyon), com um volume de 1 mm^3, o cérebro da abelha é equipado com sistemas sensoriais sofisticados cujos mecanismos essenciais não diferem drasticamente dos vertebrados como se supõe. Além disso, elas também possuem haplodiploidia, plasticidade fenotípica traduzida nas diferentes castas, longevidade, importância econômica e papel ecológico como polinizador.

O tráfego vesicular em células eucarióticas é essencial para integração regulada de processos celulares diversos que atuam em compartimentos celulares distintos garantindo sua manutenção. Estes mecanismos envolvem uma série de etapas como transporte, fosforilação e desfosforilaçao, ancoragem e fusão de vesículas. No transporte de vesículas, motores moleculares diversos atuam, como as dineínas, cinesinas e miosinas, baseando-se em filamentos de actina e microtúbulos, que compõem o citoesqueleto, movimentando-se de uma maneira dependente de ATP. Entre eles, destaca-se uma miosina não convencional, a miosina-V, um motor molecular baseado em actina. Convertendo a energia liberada

pela hidrólise do ATP em trabalho mecânico, a miosina-V movimenta-se unidirecionalmente na direção mais (+) dos filamentos de actina, atuando no transporte das vesículas sinápticas (VS) em terminais nervosos de diversos organismos.

A proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina (CaMKII) atua na via pré-sináptica e pós-sináptica de uma maneira fundamental em várias etapas, promovendo a liberação das VS ancoradas ao citoesqueleto e ativando por fosforilação a miosina-V. Esta então, liga-se a um parceiro protéico presente na membrana das VS (sinaptobrevina-VAMP), promovendo seu transporte até a zona ativa da membrana no terminal sináptico. Durante esta etapa várias proteínas de membrana de vesícula, citosólicas e de membrana plasmática atuam em um conjunto chamado SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors). Desta forma, a CaMKII, miosina-V e proteínas SNAREs atuando nas várias etapas da via da exocitose juntamente com outros parceiros protéicos, formam um conjunto essencial à comunicação neuronal.

Apesar dos inúmeros estudos em áreas específicas do mini cérebro da abelha, este ainda não revelou todo seu potencial. Novos estudos serão necessários para determinar se as proteínas que possuem regiões comuns conservadas em vertebrado e invertebrado mantêm também conservadas suas funções, e que talvez por isso, compartilhem os princípios básicos comuns ao transporte intracelular, tráfego de membranas e a transdução de sinal mediada por Ca++.

2.INTRODUÇÃO GERAL

AS ABELHAS

As abelhas são descendentes das vespas que deixaram de se alimentar de pequenos insetos e aranhas para consumirem o pólen das flores quando essas surgiram, há cerca de 135 milhões de anos. Durante esse processo evolutivo, surgiram várias espécies. Hoje são conhecidas mais de 20 mil, mas somente 2% das espécies das abelhas são sociais e produzem mel. Entre as espécies produtoras de mel, as do gênero *Apis* são as mais conhecidas e difundidas (Roubik,1989). Há aproximadamente, 2.400 anos a.C., os egípcios começaram a colocar as abelhas em potes de barro. Naquela época, as abelhas já assumiam tamanha importância, que eram consideradas sagradas para muitas civilizações. Com o tempo, elas também passaram a assumir grande importância econômica e, a serem consideradas, um símbolo de poder para reis, rainhas, papas, cardeais, duques, condes e príncipes, fazendo parte de brasões, cetros, coroas, moedas, mantos reais, entre outros. As primeiras *Apis mellifera* européias foram introduzidas no Brasil em 1839 pelo padre Antônio Carneiro. As africanas foram trazidas em 1956 pelo professor Warwick Estevan Kerr. Do cruzamento entre abelhas africanas e européias resultaram as chamadas africanizadas, que se espalharam pelo continente (Kerr et al.,1996).

No Brasil, a apicultura tem assumido grande importância econômica nos últimos anos, pois é uma das atividades capazes de causar impactos positivos, tanto sociais quanto econômicos, além de contribuir para a manutenção e preservação dos ecossistemas existentes. A cadeia produtiva da apicultura propicia a geração de inúmeros postos de trabalho, empregos e fluxo de renda, principalmente no ambiente da agricultura familiar, sendo, dessa forma, determinante na melhoria da qualidade de vida e fixação do homem no meio rural. Além disso, o Brasil apresenta características especiais de flora e clima que, aliado a presença da abelha lhe conferem um potencial fabuloso para a atividade apícola (Côrrea,2003). De 2000 a 2003, o segmento da apicultura cresceu, tanto na produção quanto na comercialização dos chamados produtos da colméia - mel, geléia real, própolis, cera e pólen. Isso refletiu diretamente nas exportações de mel que cresceram 14.000%, passando de US$ 231 mil para US$ 45,5 milhões. Os dados da Secretaria de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

mostram que, em 2003, o Brasil exportou 19,3 mil toneladas de mel, o que corresponde à cerca de 60% da produção nacional.

As abelhas apresentam um vasto repertório comportamental, servindo como parâmetro para estudos dos níveis de complexidade das funções cognitivas em cérebro de insetos (Giurfa, 2003). Elas também possuem haplodiploidia, plasticidade fenotípica traduzida nas diferentes castas, longevidade, importância econômica, e, papel ecológico como polinizador. A base molecular de seu comportamento social tem sido amplamente investigada devido ao paradoxo de possuírem exclusivas, intrigantes e complexas respostas a estímulos, baseados em uma simples e eficiente plasticidade neuronal. Contendo aproximadamente cerca de 960.000 neurônios (células Kenyon), com um volume de 1 mm^3, o cérebro da abelha é equipado com sistemas sensoriais sofisticados,cujos mecanismos essenciais não diferem drasticamente dos vertebrados como se supõe (Giurfa et al., 2003).

Comparando a anatomia do sistema nervoso da abelha adulta com o de sua forma larval pode-se observar várias modificações ocorridas progressivamente durante seus estágios de pupa. Em sua forma adulta, a *Apis mellifera* apresenta cordão nervoso com sete gânglios, enquanto, sua larva apresenta onze gânglios (Snodgrass, 1956). Seu cérebro é dividido em três regiões ou lobos: protocérebro na região anterior, compreendido pelos lobos ópticos e corpos de cogumelo (*Mushroom bodies* - MB), o deutocérebro formado pelos lobos antenais e o tritocérebro abaixo do deutocérebro, aparecendo reduzido no adulto (Snodgrass, 1956; Camargo & Stort, 1973). (Figura 1A e B). Informações sobre odores no ambiente são detectadas pelos neurônios sensoriais olfatórios (OSNs). Nos insetos, seus axônios se projetam no lobo antenal, o centro olfatório primário no cérebro, o qual mostra estreita similaridade em arquitetura e função com o bulbo olfatório de mamíferos (Hildebrand & Shepherd; 1997). Dois lobos antenais (um por antena) são encontrados em cérebro de abelhas, com 160 glomérulos cada, sendo o primeiro local onde as interações sinápticas acontecem entre os receptores neuronais olfatórios da antena, interneurônios locais, projeções neuronais e neurônios periféricos para as outras estruturas cerebrais (Galizia & Menzel, 2000). Portanto, o lobo antenal é o sítio primário no sistema nervoso central no qual a informação é recebida. A informação

quimiosensorial da antena da abelha é transmitida para o gânglio subesofágico de onde pode ser retransmitida para os MB e outras regiões do cérebro (Meller e Davis 1996). Os corpos de cogumelo (MB) ocupam aproximadamente um terço do cérebro e são comparados funcionalmente ao hipocampo dos vertebrados (Capaldi et al., 1999). Em abelhas são bem desenvolvidos em comparação com outros invertebrados. Em *Drosophila*, por exemplo, onde existe apenas um cálice em cada MB, há aproximadamente 2500 células Kenyon por hemisfério (Balling et al., 1987). Cada MB de abelha consiste em aproximadamente 170.000 neurônios firmemente justapostos, denominados células Kenyon, divididos em duas subunidades, um cálice lateral e um mediano, fundidos em um pedúnculo, no qual um lobo vertical e um lóbulo medial, podem ser reconhecidos. Cada cálice é subdividido em três compartimentos principais, os quais recebem impulsos sensoriais específicos: o lábio (olfatório), o colarinho (visual), e o anel basal (olfatório e mecanosensorial (Oleskevich et al., 1997). O impulso sensorial não é limitado aos cálices, mas a toda estrutura da qual faz parte, assim, os MB parecem ser os centros onde a integração sensorial acontece, tornando-se substratos potenciais para associações e transferências entre as diferentes modalidades sensoriais (Mobbs, 1982).

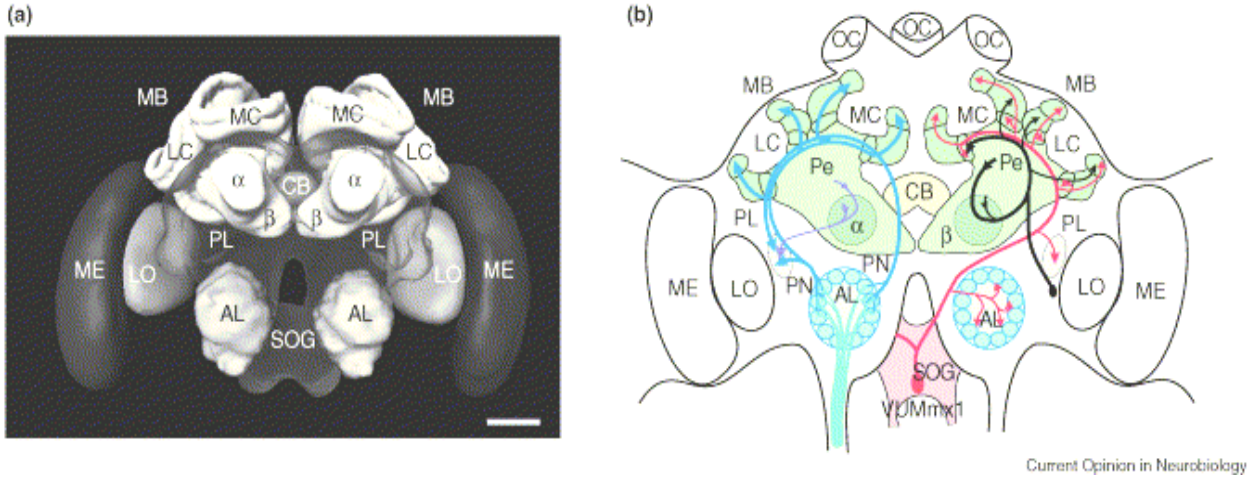


Figura: 1**(a)** Reconstituição tri-dimensional do cérebro da abelha em visão frontal. Bar:200µm. **(b)** Esquema das neurópilas do cérebro da abelha mostrando as convergências entre os padrões olfatórios (a esquerda, em azul) e os processos gustatórios (a direita, em vermelho). Abreviações: AL, lobo antenal; CB, corpo central; LO, lóbula; MB, corpos de cogumelo; ME, medula; OC, ocelo; Pe, pedúnculo; PL, protocérebro; PN, projeções neuronais; SOG, gânglio subesofágico; VUMmx1, neurônios ventrais medianos da maxila (Adaptado de GIURFA, 2003).

O aumento na complexidade dos corpos de cogumelo de abelhas, em termos de estrutura e funcionamento, pode ser relacionado com a variedade de sinais sensoriais processados por elas. Embora a base molecular para tomada de decisões em abelhas ainda não seja totalmente esclarecida, acredita-se que pode estar associada com transmissores químicos que operam no circuito sináptico local dos MB (Kamikouchi et al., 1998).

O fato das abelhas serem haplodiplóides possuindo a mais alta taxa de recombinação conhecida que qualquer animal (Hunt & Page, 1995), são características que facilitam análises genéticas de comportamento. Os avanços nos últimos anos nas áreas da genômica e proteômica da *Apis mellifera*, têm levado ao estabelecimento de relações entre os genes e seu complexo comportamento. Este inclui uma variedade de fenômenos, tais como, reconhecimento familiar, comunicação complexa através da linguagem da dança, divisão de trabalho regulada socialmente, e uma grande variedade de formas de aprendizagem (Robinson et al., 1992). Nos últimos anos o desenvolvimento tecnológico tem permitido o estudo de milhares de genes, simultaneamente, gerando informações que são geralmente disponibilizadas em uma rede de bancos de dados que cresce em proporção e informação. O desenvolvimento de abelhas transgênicas, o uso de genes candidatos, clonagem posicional, aproximações genômicas funcionais, combinadas a utilização de ferramentas tecnológicas, fornecem recursos adicionais que contribuem para análises moleculares do comportamento da abelha (Omholt & Amdam, 2004). Em 2002, estudos que buscavam acelerar a análise molecular do comportamento da abelha, criaram ESTs (expressed sequence tags), por meio do sequênciamento de mais de 20.000 clones, conseguindo identificar 15.311 ESTs de alta qualidade representando 8912 supostos transcritos. Estes foram, funcionalmente anotados, usando o sistema de classificação Gene Ontology, com base no alinhamento de seqüências gênicas de *Drosophila melanogaster*. O resultado obtido mostra que metade dos genes de *Drosophila* normalmente implicados na transmissão sináptica e comportamento estão representados em *A. mellifera*, porém, mais de 100 seqüências transcritas de *Apis* que são conservadas em outros organismos não aparecem no genoma de *Drosophila* (Whitfield et al., 2002). Usando a estratégia

ORESTES (Open Reading frame Expressed Sequence Tags), um grupo de consorciados brasileiros conseguiu gerar 5021 seqüências de todos os estágios do ciclo de vida de abelhas operárias *A. mellifera*. Os resultados mostram o alinhamento com seqüências já conhecidas de *Apis* (35.2%), define ortólogos em outras espécies, *Anopheles* (43.9%), *Drosophila* (29.5%), e também revelam que 42.4% não alinham com nenhuma seqüência depositada no GenBank (Nunes et al., 2004). Desta forma, o genoma da *Apis* torna-se a cada dia uma realidade que, sem dúvida facilitará e completará os inúmeros estudos já realizados, evidenciando ortologia, filogenia, similaridade e homologia de seus vários genes com outros invertebrados e vertebrados.

Nas abelhas como em outros animais, a formação de memória segue o condicionamento dinâmico clássico, em processos multifásicos que envolvem várias regiões do cérebro em eventos que conduzem, desde de um transiente traço ininterrupto de memória, até uma memória estável e duradoura (Menzel, 2001; Menzel & Giurfa, 2001). O envolvimento dos lobos antenais e octopamina no estágio inicial do processo, e os corpos de cogumelo nos estágios posteriores são bem descritos durante a memorização (Menzel, 2001). Outros neurotransmissores, em particular, acetilcolina, também estão implicados no processo de memorização em abelhas (Lozano et al., 2001). As abelhas exibem formas complexas de aprendizagem, tais como aprendizagem contextual, categorização e aprendizagem de regras abstratas, as quais são em geral atribuídas exclusivamente a vertebrados. Assim, são consideradas capazes de formas não elementares de aprendizagem, o que significa dizer que tais formas vão além de conexões entre dois estímulos (no caso de condicionamento Pavloviano) ou entre estímulo e repostas (no caso de condicionamento operante) (Giurfa, 2003). A abelha pode formar uma memória olfatória duradoura com a aprendizagem de uma simples trilha (Menzel, 2001). Podem memorizar uma via através de labirintos e aprender a discriminar entre complexos padrões visuais (Menzel, 2001; Zhang et al., 1999). Os corpos de cogumelo são os supostos sítios de armazenamento de memória nos cérebro de insetos (Hammer & Menzel 1995). Oleskevich e colaboradores em 1997 mostraram que a potenciação de longa duração (LTP-*long-term potentiation*) da conexão

monosináptica em cérebro de abelha é similar àquela que ocorre em vertebrados, reforçando a analogia entre os corpos de cogumelo de insetos e o hipocampo dos vertebrados, no que diz respeito à indução e consolidação de memórias.

Em mamíferos, a fosforilação induzida de receptores NMDA dos fatores de transcrição CREB e a expressão de seus genes alvo, são uma etapa essencial na consolidação de memórias (Ghosh, 2002). Em insetos existem evidências de que o glutamato é usado nas vias centrais de comunicação sináptica, e desempenha papel importante nas junções neuromusculares (Petersen et al., 1997). O seqüênciamento de genes que codificam receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos têm revelado que estes são altamente conservados em insetos (Ultsch et al., 1993, Parmentier et al., 1996; Volkner et al., 2000; GenBank AAP94623) e, a imunoreatividade ao glutamato tem sido detectada em cérebro de insetos, incluindo o da abelha (Bicker et al., 1988; Bicker, 1999; Sinakevitch et al., 2001). Estudos farmacológicos envolvendo a inibição e posterior estímulo de receptores glutamatérgicos e de NMDA, constataram variações nas memórias de curta e longa duração em abelhas *A. mellifera* (Si et al., 2004). Portanto, em insetos, estes dados apóiam a noção de que a transmissão glutamatérgica é parte integrante da memória em abelhas.

Apesar dos mecanismos moleculares nos quais se baseiam os processos de memória em abelha parecerem altamente conservados, supõe-se que a dinâmica temporal dos estágios da memória está ajustada ao comportamento dependente da função desempenhado por este inseto (Ghosh, 2002). A aprendizagem em abelhas pode ser comparada a dos vertebrados de muitas maneiras, portanto, as abelhas servem como modelo para se entender os níveis de complexidade das funções cognitivas e seus substratos neurais. As possibilidades apresentadas pelo avanço tecnológico aplicado a novas técnicas de estudo, podem esclarecer quais são as limitações específicas do cérebro de abelha quando comparado a cérebros maiores em termos de estrutura e fisiologia. O mini cérebro da abelha ainda não revelou todo seu potencial (Giufa, 2003).

Apis mellifera						
PROTEÍNAS / OUTROS ORGANISMOS	CaMKII	Clatrina	Miosina-V	Sintaxina	SNAP-25	UNC-5
A. thaliana	50,80% / 421aa	----------	25,13% / 176 aa	25,33% / 226 aa	50,78% / 127 aa	----------
C. elegans	67,13% / 425 aa	66,45% / 155 aa	33,33% / 182 aa	42,22% / 86 aa	48,53% / 134 aa	30,93% / 190 aa
D. melanogaster	86,56% / 439 aa	89,81% / 157 aa	33,50% / 199 aa	----------	82,84% / 134 aa	23,55% / 245 aa
E. coli	36,39% / 410 aa	----------	----------	----------	----------	----------
H. sapiens	73,47% / 426 aa	84,91% / 159 aa	46,89% / 204 aa	48,09% / 231 aa	65,93% / 134 aa	32,75% / 390 aa
M. musculus	74,18% / 426 aa	----------	46,89% / 204 aa	47,91% / 231 aa	67,41% / 134 aa	30,89% / 492 aa
R. novergicus	70,23% / 438 aa	84,91% / 159 aa	46,84% / 204 aa	47,44% / 231 aa	66,67% / 134 aa	35,06% / 399 aa
S. cerevisiae	59,23 % / 412 aa	39,10% / 152 aa	24,62% / 194 aa	----------	34,59% / 132 aa	23,55% / 245 aa

Tabela 1: Comparação da similaridade entre as proteínas: CaMKII, clatrina, miosina-V, sintaxina, SNAP25 e UNC-5, expressas em *A. mellifera* em relação a outros

TRÁFEGO DE MEMBRANAS (AS PROTEÍNAS SNAREs)

Para que haja o processamento de informações, conseqüente aprendizado e armazenamento sob forma de memórias, sejam de curta ou longa duração, é necessário que ocorra comunicação neuronal. O ponto crítico do sistema nervoso é controlar e coordenar as funções do organismo, permitindo a este responder e agir no ambiente. Todas as sensações, sentimentos, pensamentos, respostas motoras ou emocionais, aprendizagem e memória, e, qualquer outra função ou deficiência orgânica do cérebro, não podem ser entendidas sem o conhecimento sobre o processo fascinante de comunicação entre células nervosas. Neurônios precisam colher informações continuamente sobre o estado interno do organismo e seu ambiente externo, têm que avaliar tais informações, e, coordenar atividades destinadas à situação para atender as necessidades em questão. Impulsos nervosos podem passar de uma célula a outra, criando uma cadeia de informações dentro de uma rede de neurônios. Dois tipos de fenômenos são envolvidos no processamento do impulso nervoso: elétrico e químico (Cardoso, 2001). A transmissão sináptica é a chave para se compreender a operação básica do sistema nervoso a nível celular, pois ela é o processo fundamental da ação integrativa deste sistema.

A exocitose em células eucarióticas é descrita como um processo no qual as membranas de vesículas intracelulares fundem-se com a membrana plasmática, levando a uma continuidade entre o meio intra e extracelular. Assim realiza duas funções: a fusão das membranas vesicular e plasmática, e, a liberação dos conteúdos intravesiculares para fora da célula. A exocitose pode ocorrer por duas vias. A exocitose constitutiva, que acontece no interior de todas as células eucarióticas, na qual as vesículas fundem-se com a membrana plasmática na ausência de estímulos externos desempenhando um papel de manutenção constante do equilíbrio dos meios intra e extracelulares (Lin & Scheller, 2000). E, a exocitose regulada, que é uma via limitada a células que executam funções específicas, desempenhando diversos papéis que incluem a liberação de neurotransmissores, hormônios, enzimas e citocinas, respondendo a estímulos internos ou externos. Também é crucial no controle dos níveis de diversos lipídios, receptores, e transportadores da membrana plasmática. A forma mais intensivamente estudada e

melhor compreendida da exocitose regulada é a transmissão sináptica química, a qual serve como principal meio pelo qual as células nervosas se comunicam (Lin & Scheller, 2000). O evento principal no ciclo das vesículas sinápticas é a reação de fusão desencadeada por um fluxo de íons cálcio que resulta na liberação do neurotransmissor, caracterizando a exocitose. A exocitose é seguida por uma rápida endocitose que permite reutilizar as vesículas. Aliando o uso de estudos genéticos e bioquímicos funcionais e estruturais, a identificação de fatores importantes no ciclo das vesículas sinápticas, torna-se realidade constatada a cada nova descoberta (Lin & Scheller, 2000).

As vesículas sinápticas (VS) são organelas abundantes, presentes em neurônios, de tamanho uniforme e com um diâmetro de aproximadamente 40 nm (Bennett & Scheller, 1993). Estima-se que haja 200 proteínas em uma vesícula. Estas possuem o interior ácido em um pH~5.5, mantido por uma bomba de prótons, criando um gradiente para captação de neurotransmissores, (Lin & Scheller, 1997) (Figura 2). Podem ser classificadas de acordo com sua morfologia e o tipo de neurotransmissor em: vesículas sinápticas grandes de centro denso com uma região central elétron-densa contendo neuropeptídeos; vesículas elétron-densa pequenas, contendo aminoácidos;e vesículas pequenas de centro claro, contendo neurotransmissores de ação rápida como acetilcolina, GABA ou glutamato (Calakos & Scheller, 1994). O ciclo de vida de uma vesícula sináptica começa com a síntese de lipídios e proteínas no retículo endoplasmático e sua modificação ao passar pelo aparelho de Golgi, no corpo celular do neurônio. Muitas das proteínas integrais da membrana de vesículas sinápticas (VS) são incorporadas nesta fase, (Lin & Scheller, 1997). A neurosecreção é mediada por um tráfego de membranas especializado que inclui a montagem e preenchimento de vesículas secretoras e seu transporte até a zona ativa da membrana.

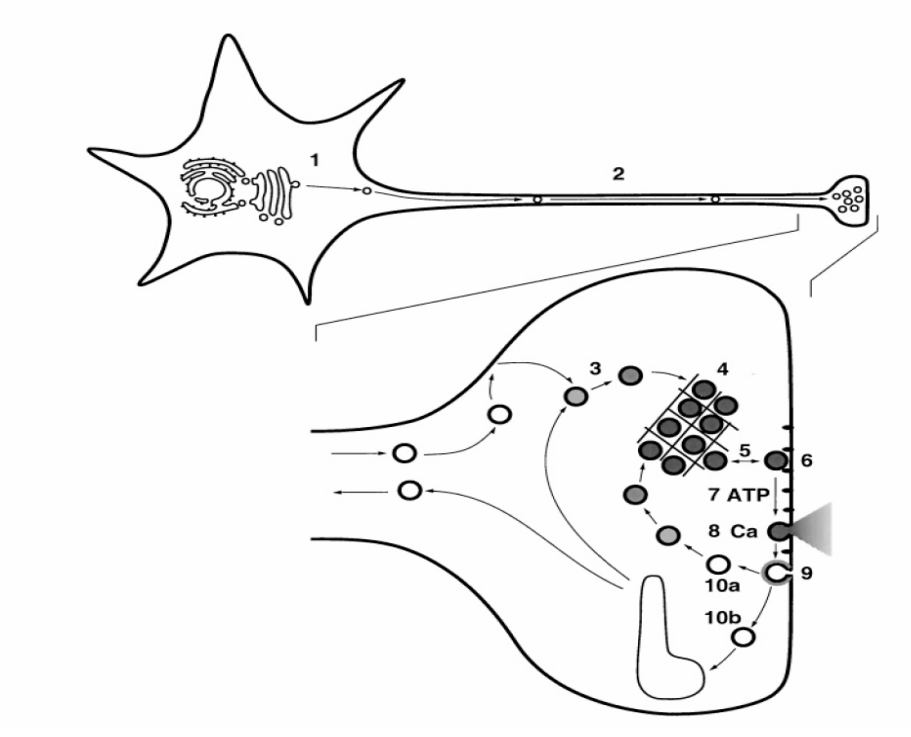


Figura.2: Ciclo de vida de uma vesícula sináptica (VS), que começa com a síntese de proteínas no corpo celular do neurônio (1), seguido do endereçamento até o terminal sináptico (2), onde ocorrem os passos de maturação, exocitose e endocitose (3 a 9) (Ting & Scheller, 1995).

As sinapses necessitam transmitir sinais de maneira altamente localizada e rápida, sendo que para atender a estas duas exigências, é necessária a localização exclusiva da exocitose na zona ativa, e, a velocidade com a qual o cálcio a desencadeia (Rothman, 1994). Todas as funções pré-sinápticas envolvem, diretamente ou indiretamente, as vesículas sinápticas, que por sua vez, passam por um ciclo nos terminais sinápticos, que pode ser dividido em passos seqüenciais. Primeiro, os neurotransmissores são transportados ativamente para o interior das vesículas, que formam um reservatório ancorando (docking) em frente à zona ativa da membrana . Então as vesículas são preparadas (priming) , convertendo-se à um estado competente para abertura do poro de fusão disparado pelo sinal de Ca2+. Depois da abertura do poro de fusão, as vesículas sofrem endocitose e reciclagem, provavelmente por três vias alternativas: (a) As vesículas são reacidificadas e

recarregadas com neurotransmissores sem se ancorar à membrana plasmática, permanecendo assim prontas para nova liberação (*Kiss-and-stay*)(Figura 3A); (b) as vesículas não ancoradas são recicladas no local sofrendo endocitose, porém sem participação da clatrina e voltam diretamente a ser reacidificadas e recarregadas com neurotransmissores (*Kiss-and-run*)(Figura 3B); ou (c) As vesículas sofrem endocitose através da clatrina e são reacidificadas e recarregadas diretamente, ou passam por intermediação endosomal (*endosomal recycling*) (Südhof, 2004).(Figura 3C)

O ciclo completo de uma vesícula sináptica tem um tempo aproximado de 60 segundos, e foi subdivido em nove etapas por Südhof (1995) (Figura 3C). Dentro deste tempo, a fusão desencadeada pelo cálcio ocorre em menos de 1 milisegundo. A ancoragem (docking) e a preparação (priming) possuem um tempo estimado de 10 a 20 milisegundos e a endocitose ocorre em alguns segundos. Portanto, os processos que requerem maior tempo no ciclo são a captação do neurotransmissor e a reciclagem destas vesículas. Importante também é ressaltar que a reciclagem das vesículas ocorre no terminal nervoso, gerando uma certa autonomia do ciclo das vesículas em relação ao núcleo. Este processo é fundamental, pois o terminal nervoso pode estar separado do núcleo por mais de 100 cm (Schekman & Orci,1996).

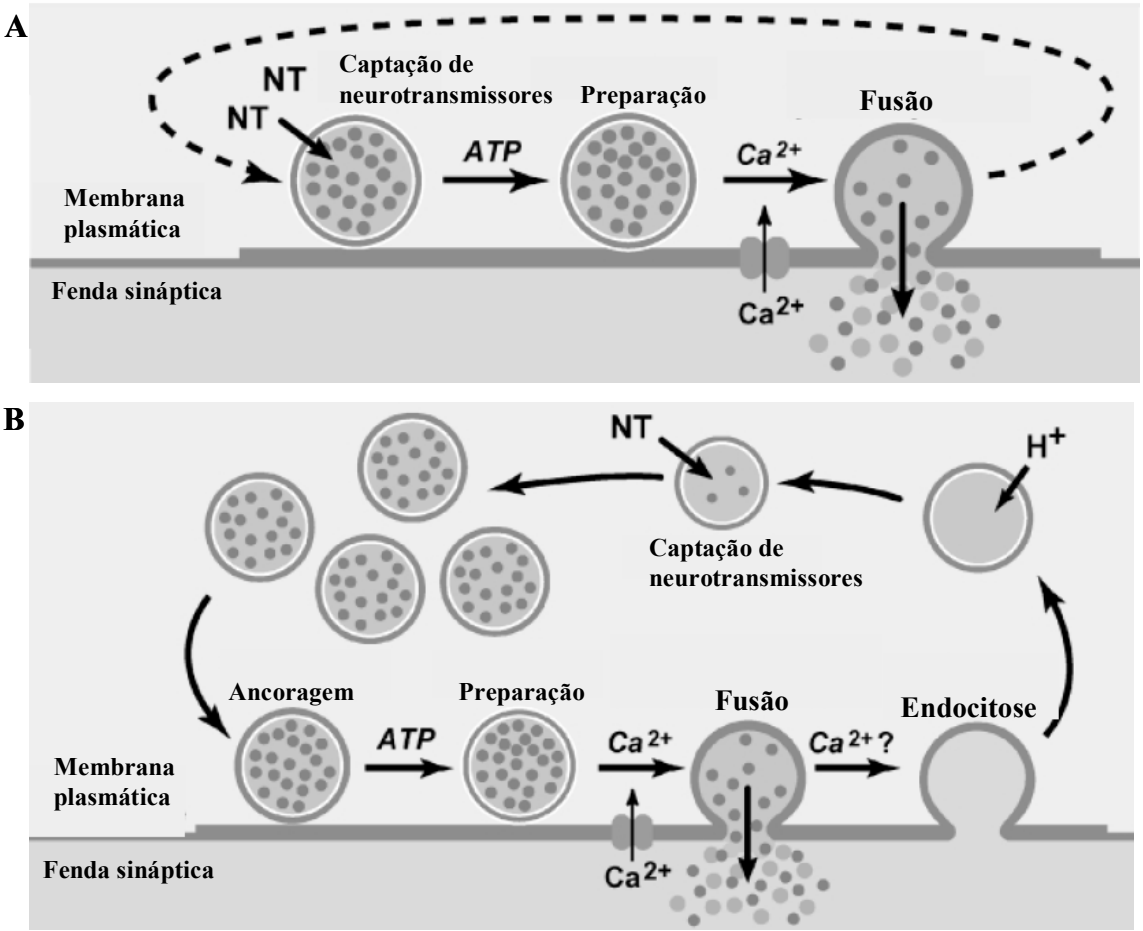


Figura 3A: Representação esquemática da fusão e recilagem de vesículas sinápticas segundo o modelo *Kiss-and-stay*, onde não há endocitose . 3B: Esquema representativo do modelo *Kiss-and-run* , na fusão e recilagem das VS, onde ocorre a endocitose sem a participação da clatrina (Adaptado de Südhof, 2004)

C

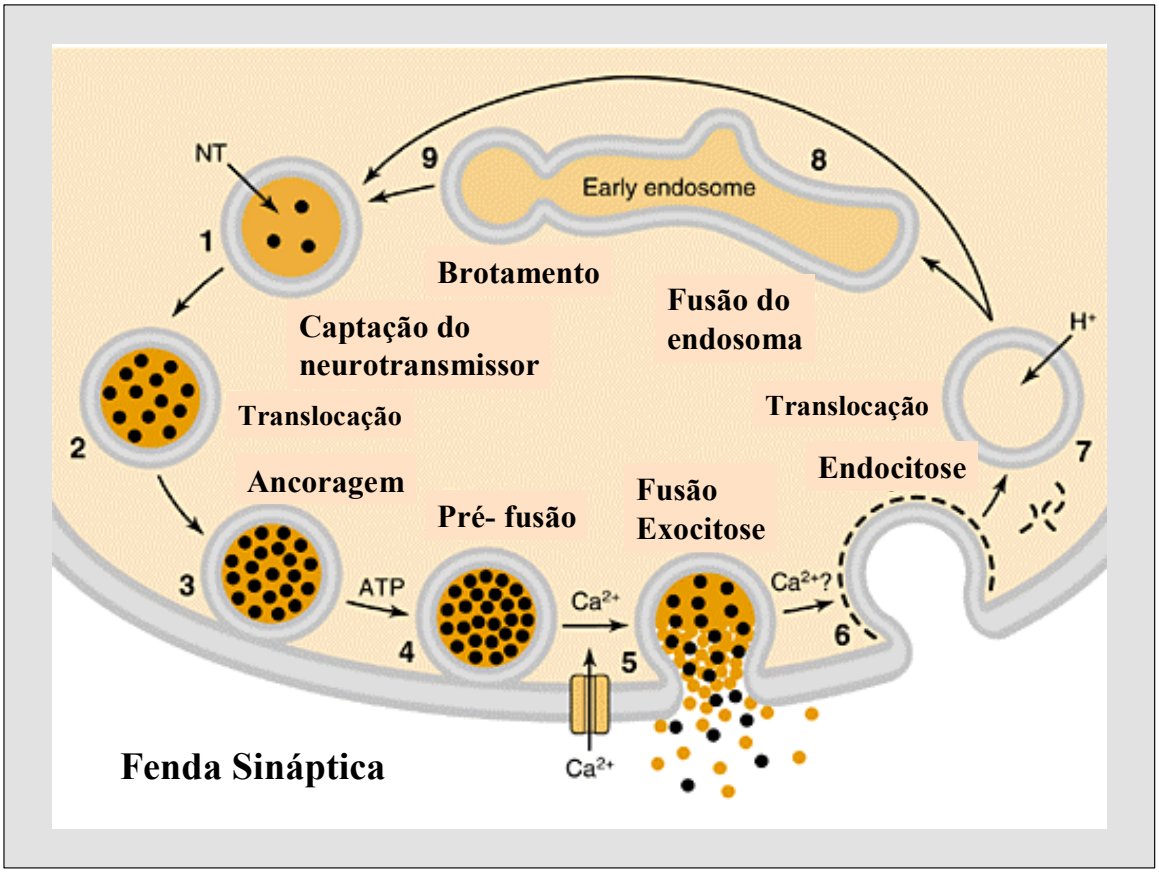


Figura 3C: Representação esquemática da *Endosomal Recycling,* postulado por Südhof et al., 1995, e revisto em 2004, do processo de exocitose/endocitose.1 - Captação do neurotransmissor - As vesículas são recarregadas com neurotransmissores por meio de um gradiente eletroquímico criado por uma bomba de prótons; 2 – Translocação – as vesículas sinápticas contendo neurotransmissores são transportadas de volta para a zona ativa por difusão ou elementos do citoesqueleto. 3-Ancoragem (docking) – as vesículas cheias de neurotransmissores ancoram na zona ativa do terminal;4-Maturação – (priming) – após a ancoragem no terminal pré-sináptico a vesícula sofre um processo de maturação que as torna competentes para uma fusão rápida com a membrana pré-sináptica cujo processo é disparado pela entrada de cálcio; 5- Fusão e exocitose - as vesículas maturadas são fusionadas e liberam seu conteúdo; 6 - Endocitose - as membranas de vesículas sinápticas vazias são invaginadas e revestidas de clatrina; 7 - Translocação - as vesículas eliminam sua cobertura de clatrina, são acidificadas e se tornam vesículas recicladas; 8 - Fusão com o endossoma primários;9 - Brotamento - as vesículas sinápticas são regeneradas primariamente através de brotamento dos endossomas;
(Adaptado de Sudhof, 1995).

Para que haja transmissão química é necessário: síntese do neurotransmissor; seu armazenamento em vesículas secretoras; liberação regulada do neurotransmissor (exocitose); receptores específicos presentes na membrana pós-sináptica. Neurotransmissores têm sido divididos em três categorias: 1) Neurotransmissores que são aminoácidos como glutamato, GABA e glicina. 2) Neurotransmissores clássicos como acetilcolina, catecolaminas e 5-hidroxitriptamina (5-HT). 3) Neuropeptídeos que estão caracteristicamente presentes em concentrações muito baixas (somastostatina, vasopressina, etc.) (Bajjalieh, 1999). As VS são direcionadas especificamente para a zona ativa da membrana plasmática com seus respectivos alvos para desencadearem a exocitose. No entanto, muitas dessas vesículas quando não requeridas se tornam membros de um reservatório baseado em elementos do citoesqueleto (Sasagawa et al., 2002). A mobilização de tais vesículas requer atividade ATPase realizada provavelmente pela proteína Quinase II dependende de cálcio e calmodulina (CaMKII) e MLCK (myosin light chain kinase) (Sasagawa et al., 2002; Ryan, 1999) que fosforilam os substratos sinapsina, miosina II e miosina V (Prekerris & Terrian, 1997). Após sua liberação as VS mobilizadas precisam ser ancoradas na zona ativa da membrana plasmática. Esta ancoragem pode ser definida de duas maneiras: Ancoragem morfológica, que ocorre quando as VS estão a uma distância mínima de 2nm da membrana plasmática, e, ancoragem bioquímica que se refere a conexões entre as VS e a membrana plasmática através de interações proteína-proteina (Bajjalieh, 1999).

Os eventos pré e pós-sinápticos são altamente regulados. Até o presente, a maioria das proteínas de vesículas sinápticas têm sido caracterizadas e geneticamente analisadas em vários organismos. Estes estudos mostram que as VS contêm proteínas conservadas com diversas estruturas e funções (Bajjalieh, 1999). Estas proteínas foram divididas em: proteínas que fazem parte da membrana das vesículas sinápticas (v-Snares), aquelas que fazem parte da membrana alvo (T-Snares), e, proteínas citosólicas (família séc/munc e as rab GTPases) que participam da via da exocitose (Söllner et al.,1993). Estas proteínas formam um conjunto denominado hipótese SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), que até recentemente tem sido o modelo que explica mais

claramente como o processo de exocitose se realiza (Südhof, 1995). De invertebrados a vertebrados, incluindo o ser humano, inúmeras proteínas que fazem parte da hipótese SNARE, bem como seus homólogos, têm sido encontrados, evidenciando uma maquinaria altamente conservada (Bock and Scheller , 1999).

A hipótese SNARE foi proposta primeiramente por Söllner e colaboradores (1993) e postula que, toda vesícula de transporte contém proteínas específicas em sua superfície (v-Snares); as membranas alvo possuem parceiros protéicos correspondentes (t-Snares), que ao interagirem entres si conduzem aos eventos de fusão subseqüentes. Entretanto, o esquema inicial v/t Snares poderia ser confundido com outras reações similares, como a fusão osmótica de vacúolos em leveduras. Assim, uma segunda nomenclatura foi proposta com base em um resíduo chave, geralmente arginina (R-SNAREs) ou glutamina (Q-SNAREs) . Ambos os esquemas, um funcional (v/t), e , outro estrutural (R/Q), são comumente usados (Fasshauer et al., 1998). A fusão de duas membranas requer, pelo menos, quatro SNAREs. A maioria, se não todas, as reações intracelulares de fusão de membrana envolvem uma R-SNAREs (da vesícula), e, três Q-SNARES (da zona ativa de membrana alvo) (Bock et al., 2001).

Em 1988, Block e colaboradores purificaram NSF [NEM (N-ethylmaleimide-sensitive factor)], a primeira proteína que pode estimular *in vitro* a reação de transporte vesicular, dando assim, o primeiro passo para a montagem atual da hipótese SNARE. A descoberta concomitante de proteínas tipo-SNARE, requeridas para a secreção em leveduras indicou que elas executam uma função comum para todos os tráfegos de membrana (Bennett Scheller, 1993). Usando ensaios de tráfego de membranas *in vitro* desenvolvidos no início da década de 80, Rothman., pôde purificar duas proteínas solúveis necessárias à reconstituição de um transporte eficiente. Estas proteínas, (N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF), e, uma proteína adaptadora chamada NSF attachment protein (SNAP) (Block et al., 1988), atuam em muitas vias de tráfego intracelular. Tais proteínas foram usadas subseqüentemente para purificar por afinidade os seus respectivos receptores de membrana em cérebro de rato, uma estratégia que revelou proteínas cruciais para liberação de neurotransmissores na fusão mediada por vesículas (Söllner & Rothman, 1994).

Estes receptores foram chamados SNAREs (por serem receptores de SNAP). Novos membros SNAREs têm surgido devido a inúmeros estudos, formando uma superfamília que atua não somente na neurotransmissão sináptica , mas na maioria, se não em todas as vias de tráfego intracelular (Chen & Scheller 2001; Jahn, 2004; Kavalali 2002 ; Pelham 2001; Rizo & Südhof 2002). Atualmente, o complexo SNARE pode ser isolado a partir de extratos de células neuronais, podendo ser também montado *in vitro* a partir de proteínas recombinantemente). expressas e purificadas, exibindo notável estabilidade térmica e química. O complexo central SNARE (cerne) consiste de um barril de quatro hélices paralelas. Este complexo central (core complex) é suficiente para promover fusão de vesícula *in vitro* (Scheller et al., 1999). Baseados nessa estrutura, Hanson e colaboradores (1997); Lin e Scheller (2000), sugerem a hipótese de que a formação do complexo SNAREs atrai vesículas para sua membrana alvo, e, que a resultante proximidade, assim como a força exercida pela ligação em paralelo das SNAREs, induz à fusão da membrana.

O recrutamento, ancoragem e direcionamento de vesículas que vão sofrer exocitose compreendem um grande complexo protéico. Atuam no direcionamento das VS as proteínas Rab pertencentes à superfamília das Ras GTPases, sendo de baixo peso molecular. A subfamília Rab3 compreende rab3A, B, C, e D. Rab3A e C são mais abundantes no cérebro, onde são enriquecidas em VS, contando com uma taxa de mais de 25% das atividades GTPases locais. As RabB e D encontram-se distribuídas em outras áreas do cérebro. Assim como as SNAREs, as rab são altamente conservadas, presentes de leveduras a humanos em múltiplas isoformas, específicas para cada compartimento de membrana (Johannes et al.,1996). A exocitose parece ser limitada a poucas vesículas por ação da rab3. Na ausência de rab3 e presença de Ca2+, muitas vesículas se fundem, sugerindo que rab3 regula o número de vesículas que são capazes de responder ao Ca2+ (Pfeffer, 1996). Como outras pequenas proteínas G, os membros da família rab podem funcionar como chaves (switches) moleculares ou cronômetros, variando entre a forma inativa, ligada a GDP, e a forma ativa ligada a GTP , regulando suas proteínas efetoras e seus alvos “downstream” (Armstrong, 2000). Duas pequenas proteínas interagem com rab3 somente quando esta se liga ao GTP. Uma delas, a rabfilina é recrutada para a

membrana vesícula, pela rab3 para tornar-se uma proteína periférica da mesma. A outra, chamada RIM (Rab-interacting molecule) é uma proteína da membrana plasmática que pode interagir com rab3 na vesícula somente quando esta está próxima da zona ativa. Uma grande variedade de potenciais efetores rab, incluindo rabfilina, RIM, e PRA-1 (prenylated Rab acceptor) também sugerem possíveis papéis para as mesmas. Estes papéis podem ser desdobrados em três categorias principais. Primeiro, Rabs podem interagir com seus efetores para ligar ou desligar vesículas do citoesqueleto. Segundo, estudos genéticos dos efetores Rab têm reforçado as evidências de que estas podem regular as associações das proteínas Snares (Calakos & Scheller, 1994). Terceira, Rabs e seus efetores podem participar da ancoragem das vesículas. A proteína RIM, por exemplo, tem sido sugerida como um regulador rab3a-dependente na formação do complexo GTP-dependente entre a vesícula e a zona ativa da membrana plasmática (Wang et al., 1997). Uma maneira pela qual as Rab participariam tanto da ancoragem das VS quanto da regulagem da formação do complexo SNARE, seria através das interações entre seus efetores e membros da família SEC1/MUNC18 (SM). Evidências que reforçam este argumento vêm principalmente de estudos em leveduras (Ungar et al., 2003).

Dentre as principais proteínas que compõem o complexo SNARE estão as proteínas da família SM. Estas foram descobertas inicialmente em leveduras, incluindo os produtos gênicos séc 3, 5, 6, 8, 10, 15 e exo 70 (família sec1), em *C.elegans* e *Drosophila*: unc-18 e unc-13, e, em mamíferos: munc-18 (Hata et al., 1993; Dulubova et al., 1999). As proteínas SM interagem firmemente com a sintaxina, e esta interação inibe sua associação com a VAMP/ sinaptobrevina e Snap25,o que pode levar ao bloqueio da formação do complexo NSF/SNAP/SNARE, inibindo o processo de ancoragem e posterior fusão das VS (Schraw et al., 2003). As proteínas SM são substrato da PKC (proteína Kinase C) na presença de Ca^{2+} e, ao serem fosforiladas perdem a interação com a sintaxina, o que permite a formação do complexo NSF/SNAP/SNARE (Fujita et al., 1996). SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa) é proteína da zona ativa da membrana plasmática sendo descrita formando um complexo com sintaxina e outras proteínas eventuais, durante as etapas de “priming” , “docking” e “attach” na exocitose. (Söllner *et al.*,

1993; Rothman, 1994). Sintaxina é uma proteína da zona ativa da membrana plasmática (t-Snare) de peso molecular 35 KDa, que interage com vários parceiros no tráfego de membranas, possuindo vários homólogos entre espécies diferentes e,está implicada na ancoragem das vesículas sinápticas. (Bennett & Scheller, 1993; Yoshida et al., 1997; Sheng et al., 1998) (Figuras 4 e 5).

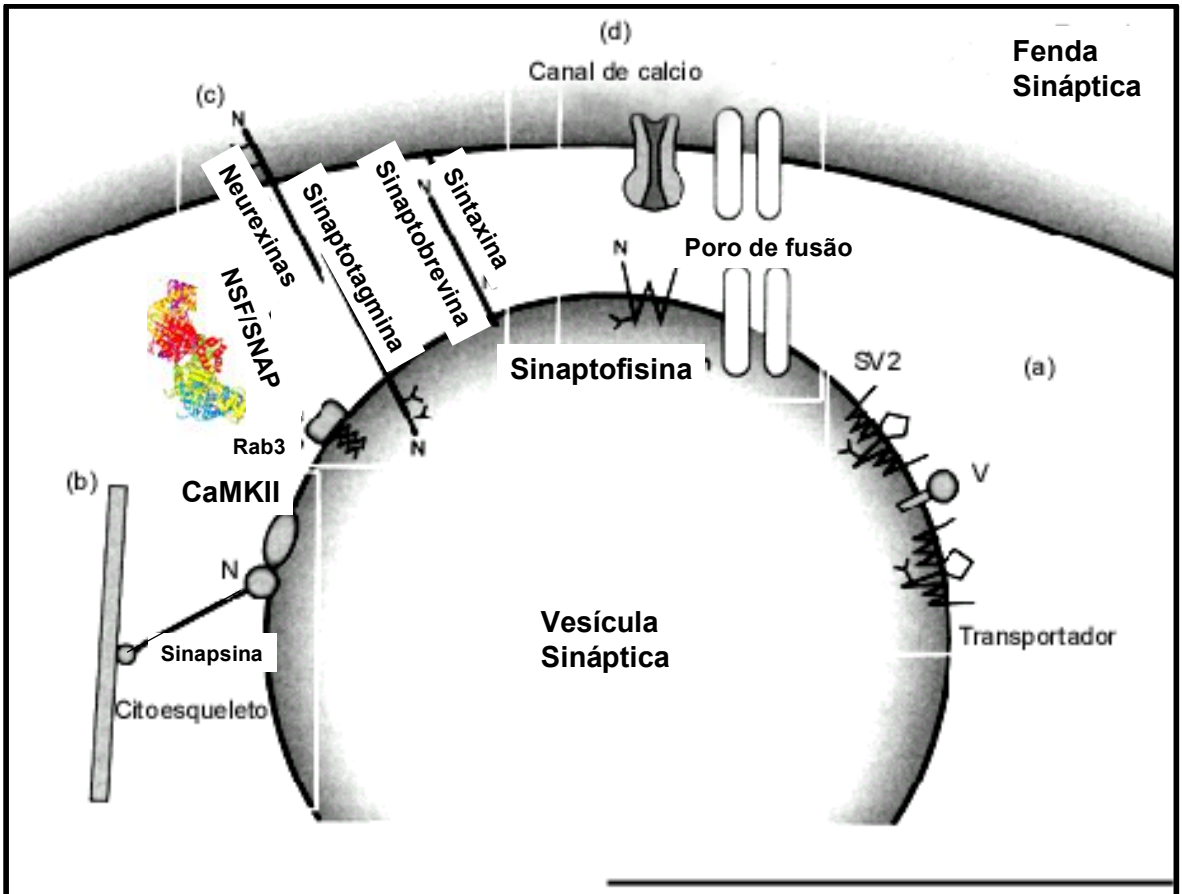


Figura 4 : Esquema das proteínas envolvidas no processo de exocitose(Söllner et al.,1993).
(a) Proteínas encarregadas da armazenagem de neurotransmissor.
(b) Proteínas encarregadas da ancoragem ao citoesqueleto.
(c) Proteínas encarregadas da ancoragem à membrana plasmática.

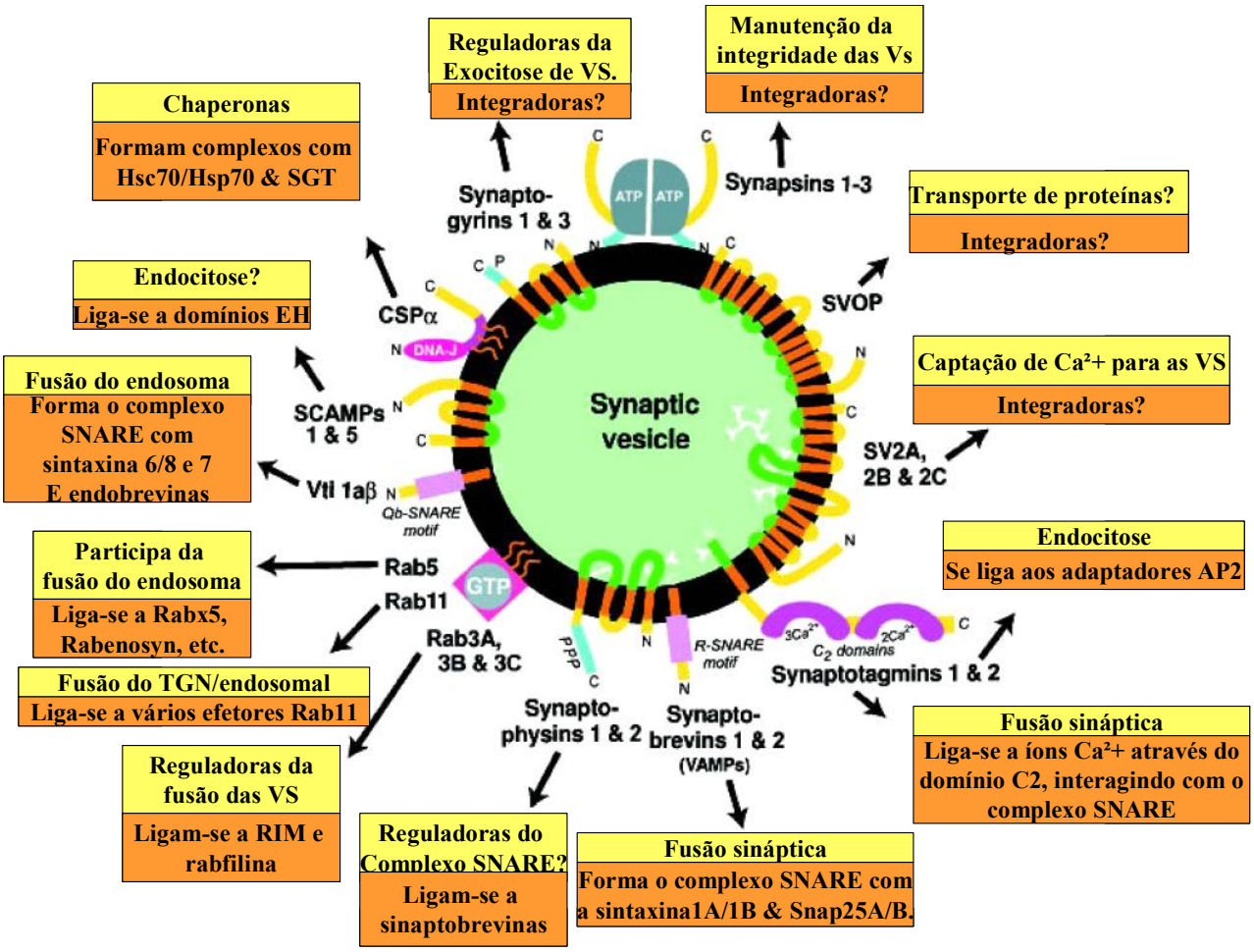


Figura 5: Esquema das interações propostas, e supostas funções, das proteínas de vesículas sinápticas. Em verde,seqüências intravesiculares; em laranja, regiões transmembrana; em azul, domínios de fosforilação; em rosa, motivos SNAREs; em vermelho e cinza, domínios conformacionais; em amarelo, outras seqüências. As linhas brancas no espaço intravesicular identificam pontes dissulfeto. Nas caixas de texto, estão as descrições para cada proteína, com as propostas funções destacadas em amarelo e as supostas interações destacadas em laranja (Adaptado de Südhof, 2004) .

Após o direcionamento das vesículas sinápticas, é necessária a montagem do complexo SNARE para que ocorra a exocitose. As SNAREs têm, no mínimo, três estados conformacionais: primeiro, a conformação fechada da sintaxina dissociada do complexo; segundo, o complexo binário da sintaxina e SNAP-25; e terceiro, o complexo ternário da sintaxina, SNAP-25 e o domínio citoplasmático da sinaptobrevina. A conformação fechada da sintaxina dissociada do complexo contém um barril de 4 hélices composto do domínio aminoterminal regulatório $H_AH_BH_C$ e aproximadamente metade do domínio do complexo central H_{core} (Parlatti et al., 1999). A topologia desta conformação fechada foi deduzida por dados de ressonância nuclear magnética (Brunger et al., 2001). Uma conformação similar da sintaxina foi recentemente observada na estrutura cristalizada da sintaxina no complexo sintaxina/SM (Misura et al., 2000), sugerindo que é a conformação fechada da sintaxina que se liga a Sec1/Munc. Quando a sintaxina se dissocia das proteínas SM, sua conformação muda para um estado aberto para se ligar a SNAP-25. Neste estado, a ligação a outras SNAREs é mediada pelo domínio H_{core}. A formação de complexos binários ou ternários está associada com uma indução aumentada da estrutura α-hélice nas regiões não estruturadas ou flexíveis. Este modelo "zipper" da fusão de vesícula tem sido proposto por experimentos utilizando transferência de energia ressonante fluorescente (Lin & Scheller, 1997), microscopia eletrônica e polarização eletrônica de complexos SNARE marcados (Poirier et al., 1998) (Figura 6).

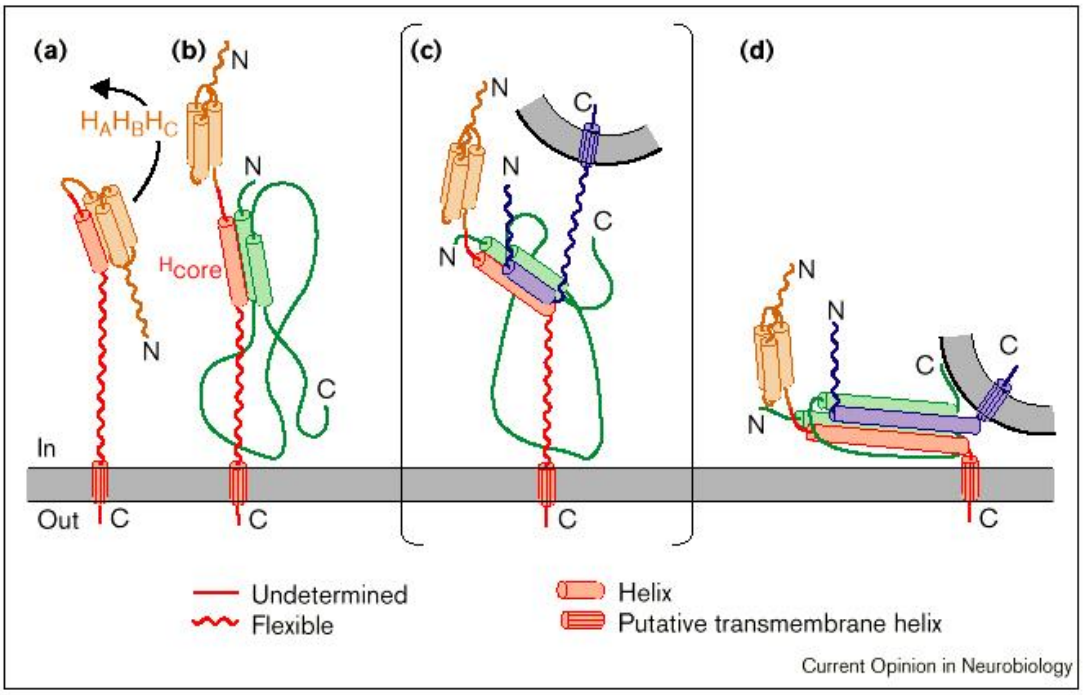


Figura (6): Estados conformacionais e eventos envolvendo as proteínas SNAREs e seus possíveis papéis na fusão de vesícula. As SNAREs possuem no mínimo três estados conformacionais: (a) fechado; (b) binário; (c,d) ternário. Sinaptobrevina-azul; SNAP-25-verde; sintaxina em vermelho e laranja mostrando seus possíveis estados conformacionais: (em traço contínuo) indeterminado, nenhuma informação disponível sobre a conformação ou conformações da proteína; (em traço ondulado) flexível, resíduo que estão provavelmente passando por significante mudança conformacionais mas não são partes do "core complex" da proteína (Adaptado de Bock & Scheller, 1999)

As sinapses apresentam dois desafios, primeiro é preciso liberar os neurotransmissores rapidamente em função do aumento de concentração de Ca^{++}. Isto provavelmente é conseguido antes da reação de fusão, resultando em um reservatório de VS ancoradas prontas a liberar seu conteúdo. O Ca^{++} então ativa a sinaptotagmina, que funciona como um sensor de cálcio para disparar a reação completa de fusão. Sinaptotagmina é uma SNARE com dois domínios ligantes de Ca^{++} (C2A e C2B), por isso considerada seu principal sensor. A sinaptotagmina possui mecanismos de fusão que ainda não foram totalmente esclarecidos, mas que são cruciais a exocitose, pois supostamente dispara a fusão completa da VS, com a liberação do neurotransmissor. Mutantes de *Drosophila*, onde o domínio C2A foi completamente deletado, ou pontualmente modificado, mostram que tanto a

oligomerização dependente de cálcio da sinaptotagmina, quanto à formação do complexo SNARE e posterior fusão, são interrompidos (Littleton et al., 2002). O outro desafio que se apresenta à sinapse é assegurar-se de que estará sempre pronta para disparar repetidamente sempre que necessário, portanto, todo o reservatório não pode ser disparado de uma só vez. A liberação deve ser gradual, de apenas um número limitado de VS. Isto provavelmente é conseguido devido à ação da Rab3 que determina quais as vesículas deverão responder ao influxo de cálcio e realizar a fusão completa. Por estas razões Rab3 e sinaptotagmina são considerados os dois lados da mesma "moeda" da fusão de membranas: ambas atuam no mesmo passo do ciclo das VS, porém em funções opostas. Apenas sua ação combinada garante uma regulação fisiológica na liberação de neurotransmissores (Geppert et al., 1998).

Caenorhabtidi elegans e *Drosophila melanogaster*, são usados como modelo para estudos genéticos envolvendo neurotransmissão e neuroregulação, principalmente na última década. Tais estudos revelam que muitas proteínas SNAREs estão presentes nestes organismos. No primeiro passo de preparação da VS para a exocitose, onde a sintaxina se encontra em conformação fechada ligada a uma proteína SM, foi mostrado que em *C. elegans* a Unc-18 é substrato para Unc-13 [proteína ligante DAG(diacilglicerol)]. Confirmando este resultado, ratos, *C. Elgans* e *Drosophila* knockouts para Unc-13, perdem a capacidade de evocar a transmissão sináptica. Mutantes em *C. elegans* da proteína RIM , que interage com Unc-13, sinaptotagmina, SNAP25, e proteínas SH3, mostram uma redução de 60% na transmissão sináptica, levantando questões de que RIM seria mais que um simples efetor de Rab3 (Dulubova et al., 1999). Em *Drosophila*, mutantes da proteína de membrana SNAP25, produzem um fenótipo sensível a temperaturas superiores a 37° C, causando rápida dissociação desta proteína, impedindo a fusão das VS. Este mutante apresenta também uma menor sensibilidade ao cálcio, e alterações morfológicas na zona ativa da membrana. Outro mutante em *Drosophila* para sintaxina, resulta na incapacidade de formação de um complexo SNARE estável *in vitro*, e, virtualmente nenhuma fusão de VS ocorre *in vivo*. Os mutantes para NSF *comatose* e *shibire*, combinados ao mutante de canais de sódio *paralytic* ,sensível a

temperatura, provocam em *Drosophila*, arranjos e desarranjos do complexo SNARE, sugerindo que o papel do NSF é anterior a fusão da VS (Richmond, 2002). Desta forma, confirma uma estratégia conservada na modulação e regulagem da neurotransmissão que parece estar presente também em leveduras, outros invertebrados e vertebrados (Richmond, 2002).

Em resumo, de acordo com a hipótese SNARE, em primeiro lugar acontece o recrutamento da VS, que se daria pela adesão de rab3 ativada por GTP à sua superfície, possivelmente em resposta ao aumento de $Ca2^{+}$. Então, a proteína Quinase II dependente de cálcio e calmodulina (CaMKII) fosforila a sinapsina que mudando sua conformação libera a VS, ao mesmo tempo em que outro substrato da CaMKII e da MLCK, a miosina-V, ao sofrer fosforilação se associa a sinaptobrevina, desempenhando supostamente um papel de transporte desta VS. A rab3 presente na superfície da membrana da vesícula recruta seus efetores, Rabfilina, que atua no direcionamento da VS, e, a RIM, que atua como um controle, atrasando ou adiantando os passos da formação do complexo SNARE, devido a sua ligação com proteínas da família Séc/Munc. A RIM provavelmente atua como um sinalizador para que a PKC ative por fosforilação as mudanças conformacionais das proteínas SM, fazendo com que estas se dissociem da sintaxina, que até este momento estava em sua conformação fechada. Com a dissociação das proteínas SM, a sintaxina em sua conformação aberta associa-se a outras proteínas SNAREs, como sinaptobrevina (VAMP), Snap25, e sinatotagmina. A sinaptotagmina possui dois domínios ligantes de cálcio, funcionando como um sensor, disparando a reação completa da exocitose, com a liberação do neurotransmissor (Figura 7).

Nesta fase entra em ação o complexo NSF. De acordo com um modelo atual, NSF e SNAP atuam juntas para dissociar os complexos SNARE antes e após a fusão. Proteínas SNAREs podem formar ambos complexos, cis (mesma membrana) e trans (membranas opostas), que são substratos para SNAPs e NSF (Otto et al., 1997). NSF é um hexâmero e pertence à família de proteínas AAA (ATPases associadas com as atividades celulares). Cada NSF contém três domínios distintos, um domínio amino-terminal requerido para ligação SNAP-SNARE e dois domínios ATPase, chamados D1 e D2. A ligação de ATP e hidrólise por D1 é

necessária para a que ocorra a reação de dissociação de SNAREs. E, a ligação de ATP, mas não a hidrólise, por D2 é necessária para a formação do hexâmero. SNAP e NSF ligam-se seqüencialmente a complexos SNAREs, formando partículas 20S, assim chamadas devido ao comportamento de sedimentação do super complexo (Whiteheart et al., 2004).

Enquanto a função exata dos SNAREs é o tópico de alguns debates, existem várias evidências que elas desempenham um papel fundamental na fusão de membrana. Por exemplo, a clivagem sítio específica dos SNAREs por neurotoxinas clostridiais, inibe a neurotransmissão (Jahn & Südhof , 1999). E também, as SNAREs representam a maquinaria de fusão mínima, podendo ser reconstituídas em lipossomos artificiais induzindo fusão in vitro (Parlatti et al., 1999). Experimentos em um sistema de células PC12 permeabilizadas também confirmaram a importância dos SNAREs para a fusão *in vivo* (Chen et al., 1999). Outra evidência é que, os domínios solúveis dos SNAREs espontaneamente reúnem-se em um barril de 4 hélices extremamente estável *in vitro*. A composição α-helical e a alta estabilidade térmica e química do complexo são similares para as proteínas que estão envolvidas na fusão viral, possivelmente indicando um mecanismo ancestral comum para ambos os sistemas de fusão (Sutton et al., 1998). E ainda, a formação do complexo provavelmente prossegue de uma maneira direcional, iniciando na extremidade do complexo distal à membrana e prosseguindo para a extremidade proximal à membrana. Este processo de associação direcional pode trazer proximidade às membranas, assim superando a barreira de energia livre para a *stalk formation*, ou seja , o processo anterior a hemifusão (Fiebig et al., 1999).

Embora a hipótese SNAREs seja atrativa por sua elegante simplicidade, evidências recentes indicam que o complexo SNAREs é apenas um de diversos complexos protéicos envolvidos no direcionamento e na fusão de vesículas. Sabe-se hoje que, complexos adicionais contribuem para a precisão do direcionamento, ancoragem e fusão de vesículas, sugerindo que estes processos ocorrem em etapas (Jahn & Südhof, 1999).

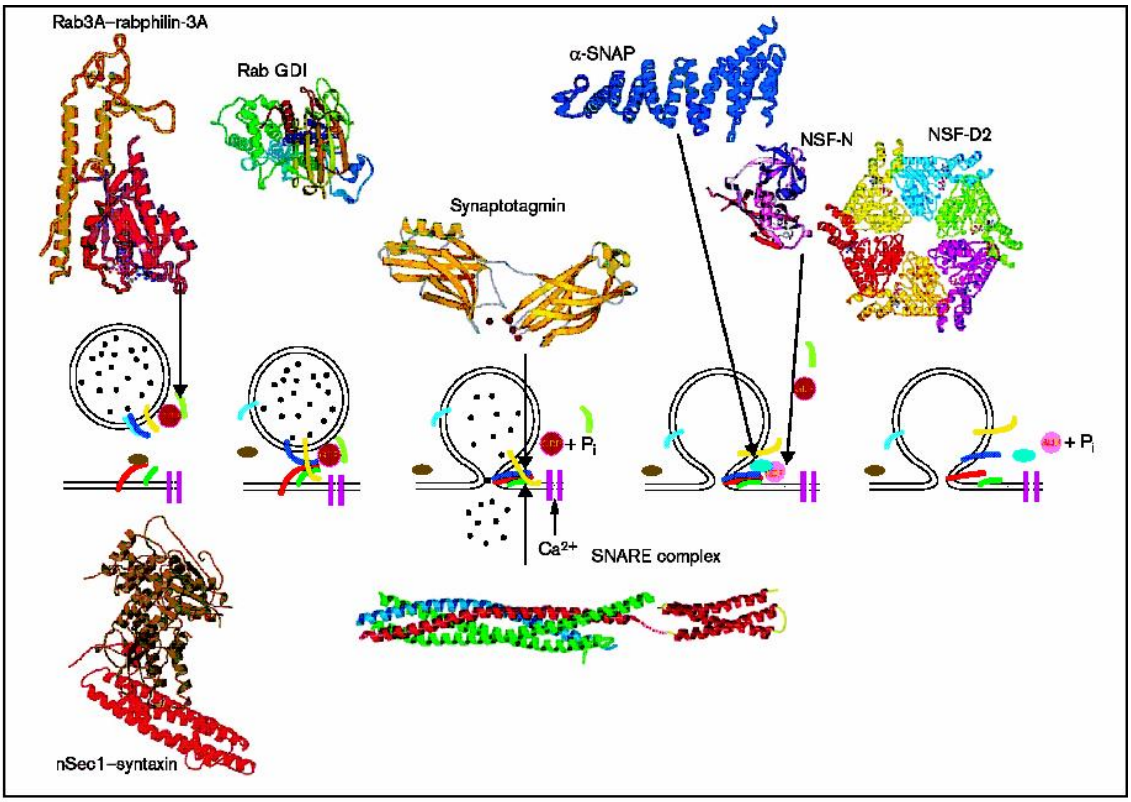


Figura 7: Resumo esquemático de proteínas envolvidas na montagem e desmontagem do complexo SNARE durante o processo de exocitose, destacando suas estruturas e possíveis interações. As proteínas estão coloridas de acordo com o código:sinaptobrevina (azul escuro), sinaptofisina (azul claro), sintaxina (vermelho), nSec1 (marrom), SNAP-25 (verde), sinaptotagmina (amarelo), Rab3A (círculo vermelho escuro), rabfilina-3A (verde claro), canal de cálcio (magenta), NSF (rosa) e a α–SNAP (círculo azul celeste). Pi, fosfato inorgânico (Adaptado de Brunger, 2001).

MIOSINA-V

Além de desempenhar papel mecânico de suporte, o citoesqueleto possui um papel funcional amplo: estabelece, modifica, mantém a forma das células, além de ser responsável por movimentos celulares como contração, formação de pseudópodes e deslocamentos intracelulares de organelas, cromossomos, vesículas e grânulos diversos. O citoesqueleto compõe-se de três classes principais de fibras: microfilamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários. Associadas a esses filamentos encontram-se um conjunto de proteínas acessórias, chamadas mecanoenzimas, capazes de hidrolizar ATP e acoplar a energia química dessa hidrólise à produção de força e movimento necessários a vários eventos celulares (Reck-Peterson et al., 2000).

Existem três principais proteínas motoras que participam do transporte intracelular de organelas, interagindo com microfilamentos de actina e microtúbulos, as miosinas, as dineínas e as cinesinas são denominações desses motores moleculares, cada um pertencendo a uma superfamília gênica com muitas classes distintas (Cheney,1992; Langford, 1995).

As miosinas formam uma superfamília de motores moleculares baseados em actina, com 18 classes atualmente descritas (Berg et al., 2001). As miosinas participam de vários eventos celulares, desde a contração muscular, passando pelo transporte de vesículas, organelas, mRNA, até ancoramento e estabilização de esteriocílios, entre outros (Mermall et al.,1995). Miosinas da classe V são motores moleculares conservados evolutivamente, sendo encontrados em plantas, leveduras, nematóides e vertebrados, incluindo o ser humano (Reck-Peterson et al., 2000). Em vertebrados a classe V de miosinas se divide em três subclasses: a miosina-V de cérebro e o produto do gene *dilute/*camundongo formam a subclasse M-Va (Espreáfico et al., 1992; Mercer et al., 1991; Engle e Kennett, 1994); a subclasse M-Vb corresponde a myr6 de rato (Zhao et al., 1996) e está presente em outras espécies (Reck-Peterson et al., 2000); a subclasse M-Vc é encontrada em tecidos epiteliais e glandulares, como pâncreas, próstata, mamas, estômago, cólon e fígado de humanos (Rodriguez e Cheney, 2000). A comparação do RNA mensageiro e da expressão das M-Va, b e c revelam que estas têm expressão diferenciada podendo

ou não ter funções distintas ou sobreposição funcional dentro das células (Reck-Peterson et al.; 2000).

Invertebrados como *Dictyostelium*, *Acanthamoeba, P. falciparum*, *C. elegans*, scallop, lula, *Drosophila* entre outros, apresentam proteínas da superfamília de miosinas (Molyneaux et al., 2000). Em *Drosophila*, já foi seqüenciado e caracterizado o gene da miosina de classe V (M-V). Neste organismo, a miosina-V pode estar envolvida em processos requeridos em uma variedade de tipos celulares (Bonafé e Selers, 1999). A miosina-V de *Drosophila* está muito relacionada, tanto ao nível de nucleotídeos quanto de aminoácidos, à miosina-V de outras espécies e é mais similar àquelas de vertebrados (camundongo dilute, BM-V e Myr 6) do que às de leveduras e nematóides. Todos os estágios de desenvolvimento deste inseto expressam o RNA mensageiro que codifica miosina-V (Bonafé e Sellers, 1999).

Em *A. mellifera,* o gene responsável pela expressão de miosina-V, apresenta grau de similaridade variada com relação a outros organismos. Em *A. thaliana,* 25.13% , *C. elegans* 33.33% , *D.melanogaster 3*3.50%, *H.sapiens* 46.89%, *M. musculus* 46.89%, *R. norvegicus* 46.89%, *S. cerevisiae* 24.62% (UniGene Cluster Ame.1621 *A. mellifera*) (Tabela 1).

A miosina-V é composta por duas cadeias pesadas idênticas (~1850 aminoácidos) formando um dímero que pode ser dividido em três módulos distintos (Cheney et al.,1993a). Na região N-terminal está o domínio cabeça/pescoço (~900 aminoácidos), o segundo módulo contém o dominio cauda proximal/medial (~550 aminoácidos), e o terceiro, o domínio cauda distal/globular (~400 aminoácidos) (Langford, 2002).(Figura 8). A cabeça globular do domínio cabeça/pescoço contém sítios ligantes de ATP e actina, sendo considerado o domínio motor pela capacidade de quando ligado a actina, converter a energia liberada pela hidrólise do ATP em trabalho mecânico, movimentando-se. O domínio pescoço é considerado o domínio regulatório, e, contém seis repetições de uma seqüência denominada “motivos IQ”, sítios de ligação de calmodulina e cadeias leves de 23 kDa e 17 kDa. O domínio cauda, região C-terminal, subdivide-se em três subdomínios: cauda proximal formada por segmentos curtos de alfa-hélice dupla (*coiled-coil),* que são responsáveis pela dimerização das duas cadeias pesadas; cauda medial, região de estrutura variável,

contendo segmentos globulares alternados com segmentos em alfa-hélice duplos; cauda globular**,** região menos conservada entre os membros da classe V, cuja função é fazer a interação da miosina V com outras proteínas, vesículas e organelas (Reck Peterson et al., 2000). Neste domínio associa-se um par de cadeias leves de dineína de 8 kDa, indicando uma possível interação entre os sistemas de F-actina e microtúbulos (Benashski et al., 1997). Também, foi identificada em cérebro de galinha uma cadeia leve adicional de 10 kDa que se liga a este domínio da miosina-V. Essa subunidade de 10 kDa (DLC8/PIN) é uma proteína originalmente identificada como uma cadeia leve (DLC8) de dineína flagelar e axonal e também como a proteína inibidora da NO sintase. Sua presença em miosina-V, dineína e como proteína inibidora da isoenzima neuronal da sintetase do óxido nítrico possivelmente sugere que, de maneira semelhante à calmodulina, essa proteína possa interagir com diversas proteínas alvo da célula participando nas mais diversas funções (Espindola et al.; 2000). Homólogos da DLC8/PIN foram identificados em *Saccharomyces cerevisae* (Dick et al., 1996); *Schistosoma mansoni* (Hoffmann e Strand, 1996) e outros.

Originalmente, a purificação de uma preparação de actomiosina de cérebro de coelho, revelou que uma proteína ligante de calmodulina, denominada P190, tinha propriedades bioquímicas características da classe das miosinas, porém distintas da miosina convencional (classe II) de cérebro (Larson et al., 1986,1990; Espindola et al., 1992). Estas descobertas foram confirmadas por três trabalhos independentes que levaram à identificação das miosinas da classe V em camundongos (Mercer et al., 1991), leveduras (Johnston et al 1991) e galinha (Espreáfico et al 1992). Desde então, estudos morfológicos, bioquímicos e genéticos desta miosina sugerem seu desempenho como transportador de organelas e vesículas.

Os estudos de localização são também informativos em termos da implicação com a função dos motores moleculares. A miosina V foi localizada tanto nas pontas de neurônios como na região perinuclear do corpo celular (Espindola et al., 1992; Espreáfico et al., 1992). Suter et al. (2000) e Evans et al. (1997) mostraram uma localização pontuada de miosina-V no cone de crescimento e na região rica em organelas. Dados de microscopia imunoeletrônica mostraram que a miosina-V está

presente sobre pequenas organelas de 50-100nm, em filamentos de actina e na membrana plasmática (Evans et al., 1997). Em leveduras, o mutante para o gene *MYO2,* que codifica a miosina-V, apresenta nas células-mãe acúmulo citoplasmático de vesículas oriundas das membranas do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, evidenciando falha no transporte dessas estruturas para o broto (Johnston et al., 1991). No mutante *dilute* de camundongo, resultante da falha na expressão da miosina-V, há alterações no transporte de melanossomos para os queratinócitos provocando não-pigmentação (Provance & Mercer, 1995, Nascimento et al., 1997). Estes camundongos apresentam também defeitos neurológicos tais como, convulsões e tremores que iniciam ao 10º dia de idade e progridem até a morte do animal em duas a três semanas após o nascimento (Mercer et al., 1991). Em humanos, uma doença autossômica recessiva relacionada com a mutação no gene *MyO5a* localizado no cromossomo15q21, denominada síndrome de Griscelli é caracterizada pelo clareamento na pigmentação da pele e dos cabelos devido ao acúmulo de melanossomos na região perinuclear dos melanócitos (Griscelli et al., 1978). Os portadores desta síndrome podem apresentar imunodeficiência celular que provoca a morte (Pastural et al., 1997).

Em tecidos neurais a miosina-V foi encontrada em frações enriquecidas de sinaptossomos de cérebro de ratos (Mani et al.,1994). Prekeris & Terrian (1997) , trabalhando com vesículas sinápticas isoladas, demonstraram que a miosina-V interage, via domínio cauda, com o complexo sinaptofisina/sinaptobrevina, que são proteínas integrantes da membrana destas vesículas . Posteriormente, foi observada a co-imunoprecipitação da miosina Va com sintaxina, proteína que faz parte zona ativa da membrana plasmática, e também, a co-imunoprecipitação da miosina-V com a proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina (CaMKII), ambas proteínas importantes no transporte, ancoragem e fusão de vesículas sinápticas (Costa et al., 1999). Dados demonstrando a interação da miosina-V ao complexo sinaptofisina/sinaptobrevina, reforçam seu papel de transporte de vesículas em terminais sinápticos. (Ohyama et al., 2001) Outros estudos relacionam a miosina-V com o transporte de vesículas do retículo endoplasmático em axônios do sistema nervoso de lula; em extensões dendríticas de células de Purkinje e em vesículas

derivadas do Golgi (Tabb et al., 1998; Takagishi et al., 1996; Evans et al., 1998; Miller e Sheetz, 2000; Langford, 2002).

Estudos de imunolocalização e imudetecção feitos em cérebro de *A. mellifera*, sondando formas larvais e adultas, mostram que a miosina-V, a DLC, e sinaptotagmina, uma proteína integrante do conjunto protéico SNARE, estão presentes em cérebro de abelha. Sendo que a miosina-V localiza-se preferencialmente nos lobos ópticos e corpos de cogumelo, reforçando as suposições de que estes sejam os centros de processamento de informações e memória das abelhas (Passos-Lima, 2001; Peixoto, 2002). Em 2002, Silva et al., sondando fração enriquecida em sinaptosomas de cérebro de *A. mellifera*, observaram marcações para miosina-V, miosina-VI, sinaptofisina e clatrina em várias regiões. Porém, as células Kenyon dos corpos de cogumelo foram marcadas somente por miosina-V, sinaptofisina e clatrina. Sugerindo assim, a associação destas proteínas de vesícula com a miosina-V, em áreas relatadas como centros de integração sensorial.

Em uma das etapas do processo de purificação de miosina V de cérebro obtém-se uma fração sedimentada (P2) com miosinas-V fortemente associadas a vesículas. Esta fração foi alvo de estudos da interação de miosina V com sua carga e ficou demonstrada sua motilidade sobre filamentos de actina carregando vesículas sinápticas (Evans et al., 1998).

Assim, as evidências publicadas até agora, sugerem que, as miosinas da classe V, por meio de seu domínio carboxi-terminal (cauda globular) interagem com uma gama de outras proteínas envolvidas em diversos processos celulares. Tais como, papel de transporte e/ou ancoragem de vesículas da rede cortical de actina em melanócitos (Provance & Mercer, 1995; Nascimento et al., 1997; Wu et al., 1997), em células nervosas (Takagishi et al., 1996; Evans et al. 1997; Prekeris & Terrian, 1997; Langford, 1998; Ohyama et al., 2001). Estas observações sugerem, de fato, um papel geral e essencial para miosina V como um transportador de vesículas e organelas em terminais nervosos e no intrincado mecanismo de transmissão sináptica. A co-localização de proteínas que fazem parte da hipótese SNARE e

miosina-V, pode indicar uma suposta interação entre elas, fundamental para o processo de exocitose.

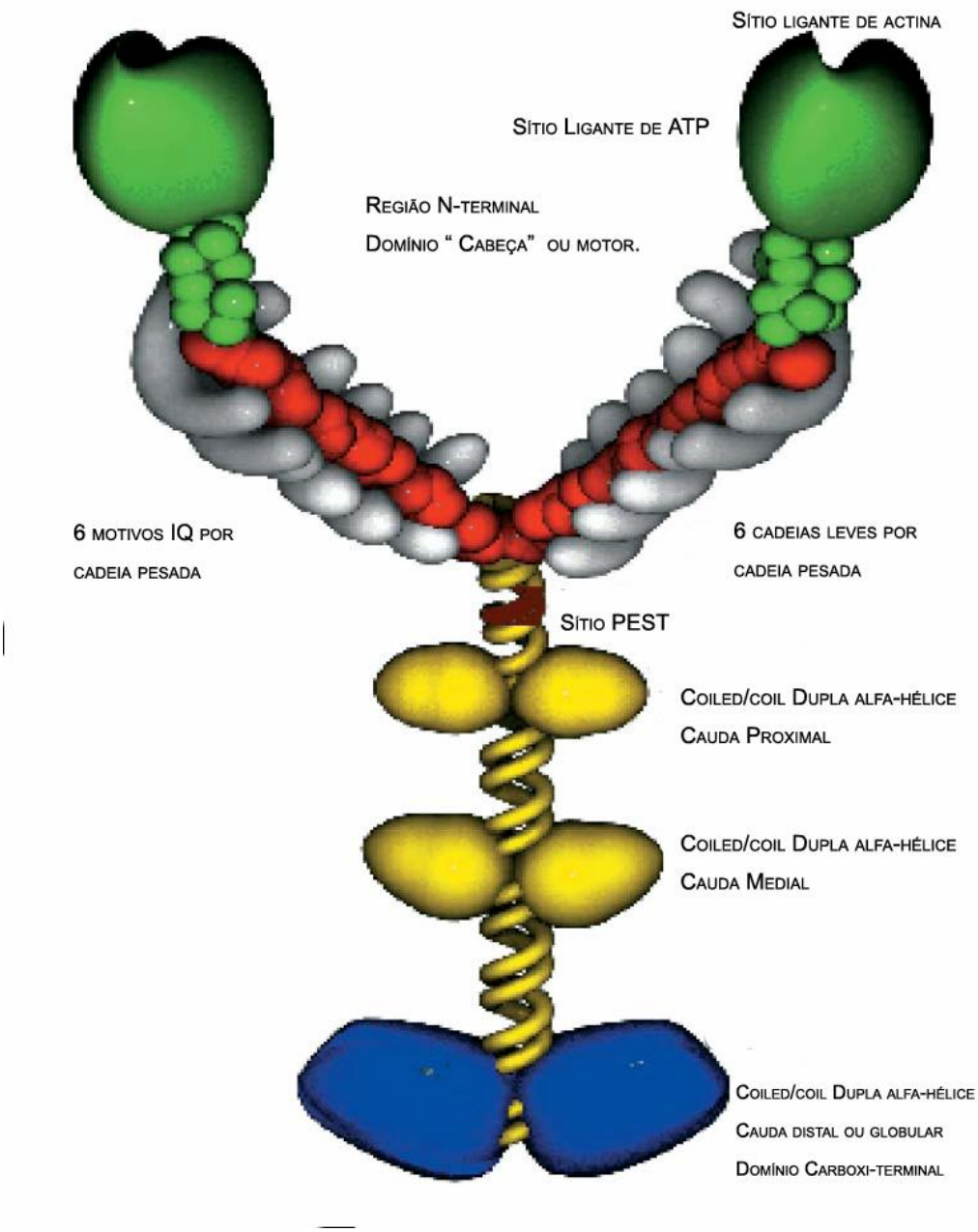


Figura 8: Esquema diagramático da miosina-V, dividida em três módulos codificados pelas cores: cabeça/pescoço em verde/vermelho; cauda proximal/medial em amarelo; cauda dista/globular em azul. (Adaptado de Langford, 2002)

CaMKII (Proteína Quinase II dependente de Ca^{++}/Calmodulina)

As abelhas com sua impressionante capacidade de aprendizagem, e um sistema nervoso simples, são um bom modelo para estudos dos mecanismos básicos da formação e evocação de memórias. A abelha pode formar uma memória olfatória duradoura com a aprendizagem de uma simples trilha (Menzel 1990). Podem memorizar uma via através de labirintos e aprender a discriminar entre complexos padrões visuais (Menzel, 2001; Zhang et al., 1999). Os corpos de cogumelo são os supostos sítios de armazenamento de memória nos cérebro de insetos (Davis, 1996; Hammer & Menzel, 1995). Oleskevich e colaboradores, em 1997, mostraram que a potenciação de longa duração da conexão monosináptica em cérebro de abelha é similar àquela que ocorre em vertebrados, reforçando a analogia entre os corpos de cogumelo de insetos e o hipocampo dos vertebrados, no que diz respeito à indução e consolidação de memórias.

Os eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória incluem, inicialmente, a ativação de receptores glutamatérgicos dos tipos N-metil-D-aspartato (NMDA) e metabotrópico (mGluRs), e a ativação de cascatas bioquímicas nos neurônios. Entre as proteínas cerebrais envolvidas nessas cascatas, destacam-se a proteína quinase A (PKA), a proteína quinase C (PKC), a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) e a quinase II dependente de cálcio-calmodulina (CaMKII). A expressão ou evocação da memória requer a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA). Em ratos, esses eventos bioquímicos, ou alguns deles, ocorrem no hipocampo, na amígdala e em diferentes áreas corticais quando os animais são submetidos a um novo aprendizado. Muitos desses mecanismos também participam da LTP(*long-term potentiation)* e de outros modelos animais de memória em pintainhos, na mosca da fruta *Drosophila* e no molusco *Aplysia* (Izquierdo & Medina, 1997).

Em tecido nervoso de abelha *Apis mellifera*, a proteína CaMKII foi purificada e caracterizada em três subunidades α, β e β′ de 52 kDa, 58 kDa e 60 kDa, respectivamente (Altfelder et al., 1991). Estudos feitos através do isolamento de fragmentos de cDNA que codificavam homólogos de CaMKII. os genes de receptor 1,4,5-trifosfato (IP3R), e PKC analisaram a expressão de genes para proteínas

envolvidas na transdução de sinal mediados por cálcio no cérebro de abelha. Verificaram através de hibridização *in situ*, que a CaMKII e os genes de receptor 1,4,5-trifosfato (IP3R) se expressavam preferencialmente nas células Kenyon maiores e corpos de cogumelo, enquanto a PKC era expressa nas células Kenyon maiores e menores, sugerindo assim, que a função do cálcio intracelular na transdução de sinal aumenta a atividade das células Kenyon, em comparação com outros tipos celulares encontrados em cérebro de abelha (Kamikouchi et al., 1998, 2000).

O papel da PKC na aprendizagem associativa da abelha foi testado via lobo antenal por indução de múltiplas condições. Este estudo mostrou que os estímulos aumentam a atividade PKC. A inibição das vias de ativação da PKC durante o condicionamento impediu as fases distintas de formação de memória de longa duração, mas não afeta a formação de memória de curta duração. Assim, a proteína PKC parece contribuir para fase inicial da formação de memórias (Kamikouchi et al., 2000).

É bem decrito que alguns receptores sinápticos acoplam-se com proteínas G para ativar a fosfolipase C quando os receptores se ligam a neurotransmissores.Esta enzima fornece um par de segundos mensageiros, diacilglicerol e IP3. Por sua vez, IP3 mobiliza Ca^{2+} de reservas intracelulares através de IP3R, e o Ca^{2+} então, se liga à calmodulina ativando a CamKII. Ambas a CaMKII e a PKC, catalizam a fosforilação de várias proteínas celulares que tem duplo efeito, atuando nas respostas biológicas de curta duração como as modificações de proteínas sinápticas, e, respostas neuronais de longa duração que requerem a modificação da expressão gênica (Clapham, 1995).

A CaMKII é conhecida como uma central de coordenação e execução de transdução de sinais mediados por Ca^{2+}. Os substratos fosforilados pela CaMKII estão implicados em importantes processos celulares, e principalmente nas modificações dependentes de sinapses das funções neuronais que estão por trás de complexas respostas cognitivas e comportamentais, incluindo aprendizagem e memória. A CaMKII compreende uma família de enzimas com 28 isoformas similares que são derivadas de quatro genes (α, β, γ e δ), a subunidade β é a forma

predominante em cérebro (Lisman et al., 2002). A holoenzima CaMKII tem uma arquitetura única apresentando 12 domínios funcionais, divididos em dois grupos de seis, que consistem nas subunidades α e β. Cada subunidade contém um domínio catalítico, um regulatório e um associativo (Lisman et al., 2002).

A regulação da atividade da CaMKII envolve um domínio autoinibitório que atua como um pseudosubstrato no estado basal (ausência de cálcio/calmodulina), ocupando o sítio catalítico da quinase, inibindo sua ligação à outros substratos. Como a região ligante de calmodulina e o domínio auto-inibitório são sobrepostos, a ligação de calmodulina (que requer a presença de cálcio), é necessária para deslocar esse domínio e tornar a subunidade ativa. Através desta interação com uma seqüência alvo que sobrepõe o domínio catalítico, o complexo Ca^{2+}/CaM atua liberando o bloqueio. Uma vez ativada, a CaMKII não só fosforila outras proteínas como demonstra também uma proeminente autofosforilação atingindo o resíduo Thr 286 dentro do domínio do pseudosubstrato da subunidade α (Thr 287 nas subunidades β, γ e δ). A subunidade a ser fosforilada também deve ter calmodulina ligada; portanto a mesma mudança conformacional que move o domínio inibitório do sítio ativo para ativar a quinase, pode também apresentá-lo a uma subunidade vizinha para ser fosforilado. A autofosforilação da Thr 286 é um fenômeno inter-subunidade/intraholoenzima que requer a ligação do complexo Ca^{2+}/CaM para duas diferentes e adjacentes subunidades na mesma enzima, uma subunidade atuando como uma quinase e a outra servindo como substrato (Mukherji & Soderling, 1994). Assim, a ligação Ca^{2+}/CaM desinibe o domínio autoregulatório, permitindo a autofosforilação e complexas mudanças na afinidade da CaMKII por Ca^{2+}/CaM, (de nanomolar a picomolar), por reduzir a constante de dissociação do complexo quinase-calmodulina. Este fenômeno é denominado *trapping*, ou seja, a calmodulina fica aprisionada por alguns segundos, mesmo que o cálcio seja removido. No estado de *trapping*, a enzima apresenta 100% de atividade, independente da concentração de cálcio (Meyer et al., 2000). Assim, a presença do resíduo fosforilado, por si só, é suficiente para romper o domínio auto-inibitório e manter uma atividade parcial de 20 a 80%, mesmo após a dissociação de calmodulina. Por esta razão, a forma autofosforilada é dita independente de Ca^{2++}/CaM e, assim permanece até que

ocorra desfosforilação. Porém, esta atividade, também chamada autônoma, promove autofosforilação (independente de cálcio) dos resíduos $Thr^{30 \text{ a } 306}$ e Ser^{314}, resultando na inibição da enzima por diminuir sua afinidade por calmodulina (Braun & Schulman, 1995; Hanson & Schulman, 1992). Estes processos conferem um tipo de memória molecular para autoregulação e atividade da CaMKII. As propriedades bioquímicas únicas da CaMKII fazem desta proteína um dos modelos paradigmáticos na eterna busca da "molécula da memória" (Cammarota et al., 2002). (Figura 9) A atividade da CaMKII portanto, é regulada pelo aumento no Ca2+ intracelular que ocorre após a ativação de receptores NMDA. Um recente achado particularmente importante é o fato de, CaMKII e NMDA (N-metil-D-aspartato) formarem um estável e forte complexo entre si e a sinapse. A afluência de cálcio através de receptores NMDA resultam na ativação da CaMKII e autofosforilação da Thr 286. Esta autofosforilação interativa permite à quinase ser ativa até mesmo em inibição por ausência de cálcio. Além disso, a fosforilação da Thr 286 promove associação com a densidade pós sináptica (PSD) pela ligação ao receptor NMDA (Strack et al., 2000; Roesler et al., 2002). Conseqüentemente, um aumento passageiro de cálcio pode dramaticamente mudar a atividade e a localização desta quinase. É importante frisar que ambos, a indução de potenciação a longo prazo (LTP), e, o comportamento induzido por treino, ativam a autofosforlação da CaMKII na Thr 286, sugerindo que este mecanismo é crítico para sinapse e a plasticidade comportamental (Lisman et al., 2002).

Em *Drosophila*, linhagens diferenciadas que expressam um inibidor específico para CaMKII, mostram prejuízos no comportamento associativo condicionado (Griffith & Greenspan, 1993). Inibidores de CaMKII induzem amnésia em ratos (Tan & Liang, 1996), e um aumento na atividade dessa enzima ocorre após o treino (Bernabeu et al., 1997b). Camundongos transgênicos *knockout* para CaMKII apresentam déficits de LTP e memória (Silva et al., 1992a,b), e camundongos com expressão localizada do transgene para CaMKII na camada CA3 do hipocampo apresentam prejuízos de memória (Mayford et al., 1996). Nesta via atua também a Proteína Kinase C (PKC), que é ativada por vários neurotransmissores, entre eles a acetilcolina e o glutamato (Bliss & Collingridge, 1993). A PKC estimula a adenilato ciclase e a síntese de AMPc (Yoshimura & Cooper, 1993). A proteína quinase

dependente de GMPc (PKG) participa da LTP hipocampal (Zhuo & Schultz, 1994a). Assim, a CaMKII é intermediária na fosforilação de várias proteínas importantes para a plasticidade sináptica, incluindo os receptores glutamatérgicos ionotrópicos.

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais importante no SNC, atuando por meio da ligação a proteínas receptoras específicas, os receptores glutamatérgicos. Estes podem ser divididos em dois grandes grupos, de acordo com suas estruturas e mecanismos de ação: os receptores ionotrópicos estão associados a canais iônicos e, quando ativados, permitem a entrada de cátions na célula, causando uma despolarização de membrana neuronal. Os receptores metabotrópicos (mGluRs) estão associados a proteínas G, agindo por meio de sinalização intracelular. Os receptores ionotrópicos são subdivididos em receptores NMDA, AMPA e cainato. Os receptores NMDA são associados a canais iônicos com grande permeabilidade a íons Ca2+. No potencial de repouso, os receptores NMDA permanecem bloqueados de forma dependente de voltagem por íons Mg2+. Para que os receptores sejam ativados, é necessário que haja uma despolarização de membrana que cause a remoção do Mg2+, e ligação de duas moléculas do agonista endógeno glutamato e do co-agonista glicina a sítios específicos (Ascher & Johnson, 1994; Gasic & Hollman, 1992; Sucher et al., 1996). Em vertebrados muitas das atividades neuronais são controladas por vários estados funcionais de receptores de glutamato (Milner, 1998). Em mamíferos, a fosforilação induzida de receptores NMDA dos fatores de transcrição CREB e a expressão de seus genes alvo, são uma etapa essencial na consolidação de memórias (Ghosh, 2002).

O sequenciamento de genes que codificam receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos têm revelado que estes são altamente conservados em insetos (Ultsch et al., 1993, Parmentier et al., 1996, Volkner et al., 2000, GenBank AAP94623) e, a imunoreatividade ao glutamato tem sido detectada em cérebro de insetos, incluindo o da abelha (Bicker, 1999; Bicker et al., 1988; Sinakevitch et al., 2001). Estudos farmacológicos envolvendo a inibição e posterior estímulo de receptores glutamatérgicos e de NMDA, constataram variações nas memórias de curta e longa duração em abelhas *A. mellifera.* Portanto, em insetos estes dados apóiam a noção de que a transmissão glutamatérgica é parte integrante da memória em abelhas (Si et al., 2004).

O estudo das bases neurofisiológicas e neuroquímicas do aprendizado e da memória é um dos mais atrativos temas em neurociências. Estudos em modelos

animais têm mostrado que a formação da memória envolve uma série de alterações bioquímicas em várias áreas do sistema nervoso central (SNC), entre as quais destaca-se o hipocampo. Existe uma opinião geral de que a memória e a aprendizagem podem ser codificadas por modificações dependentes do uso em conexões sinápticas. Esta idéia é antiga, remetendo-nos aos trabalhos de Freud (1895), Pavlov (1926), Hebb (1949) e Ramón & Cajal (1911, 1952). Nos últimos anos, essa idéia foi reforçada pelo estudo de fenômenos de plasticidade neuronal, entre eles a potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation* – Bliss & Collingridge, 1993; Bliss & Lomo, 1973). A potenciação de longa duração é um aumento duradouro na resposta excitatória pós-sináptica, descrito pela primeira vez na formação hipocampal de coelhos em 1973 (Bliss & Lomo, 1973; Bliss & Collingridge, 1993). Esse fenômeno apresenta várias propriedades em comum com a memória: indução rápida, manutenção por longos períodos, especificidade para um estímulo e expressão imediata quando é novamente aplicado o estímulo original (Izquierdo et al., 1994).

Existem diferentes categorias de memórias, entre elas estão: a memória ultra-rápida cuja retenção não dura mais que alguns segundos. A memória de curto prazo (ou curta duração), que pode durar minutos ou horas e serve para proporcionar a continuidade do nosso sentido do presente. A memória de longo prazo (ou de longa duração), que estabelece traços duradouros (dura dias, semanas ou mesmo anos). Dentro da categoria de longa duração existem basicamente dois grandes tipos de memória: as explícitas ou declarativas, que são aquelas que relatamos e reconhecemos como memórias, subdivididas em episódicas e semânticas, e, as não-declarativas ou implícitas, porque não precisam ser verbalizadas. Esta é a memória para procedimentos e habilidades, que muitos denominam hábitos, e que adquirimos e evocamos de maneira mais ou menos automática (Izquierdo et al., 1994).

Vários modelos de aprendizado, incluindo a LTP hipocampal (Grant & Silva, 1994; Huang & Kandel, 1995; Huang et al., 1994), a facilitação induzida por 5HT no molusco *Aplysia* (Bartsch et al., 1995), condicionamento em *Drosophila* (Tully, 1996) aprendizado espacial em camundongos (Roesler & Quevedo, 2002), esquiva inibitória em pintainhos (Zhao et al., 1995) e esquiva inibitória em ratos (Bernabeu et al., 1997a-c; Bevilacqua et al., 1997a, b; Quevedo et al., 1997b) envolvem a ativação

de uma via AMPc/PKA/CREB. O CREB é uma família de fatores de transcrição que, quando fosforilados (CREB-P), regulam a síntese de várias proteínas (Davis et al., 1996; Ferrer et al., 1996). A ativação de CREB-P por PKA modula a ativação gênica e a síntese protéica que são necessárias para a persistência de todas as formas de plasticidade citadas por mais de 4 horas (Carew, 1996; Martin & Kandel, 1996; Tully, 1996).

Sabe-se que a memória de curto prazo se deve a modificações em funções de certos canais iônicos, de tal maneira que mais íons cálcio entram no terminal nervoso, traduzindo-se em uma maior liberação de neurotransmissores na sinapse, e, portanto uma amplificação do reflexo. Esta modificação geralmente se deve a fosforilação de certos canais iônicos pela PKA (Proteína Kinase A) ativada por AMPc. Porém, estímulos de maior intensidade e duração resultam em um tipo de memória que permanece por várias semanas, conhecidas como memória de longo prazo. Neste caso, a maior intensidade do estímulo produz níveis maiores do segundo mensageiro AMPc e portanto mais ativação da PKA. Esta última chega ao núcleo do neurônio e ao fosforilar certas proteínas reguladoras modifica a síntese de proteínas que se encontram participando da sinapse, aumentando a formação de umas e diminuindo a formação de outras. O resultado final é a modificação da forma da sinapse, aumentando os sítios de liberação do transmissor e incrementando assim a função sináptica. Em contraste com a memória de curto prazo, a memória de longo prazo requer a formação de novas proteínas. Se a síntese destas é bloqueada, se anula o estabelecimento da memória de longo prazo, mas não a formação da memória de curto prazo (Roesler & Quevedo, 2000). Múltiplos critérios têm sido propostos para identificar a função celular da CaMKII. Entre estes critérios estão: (a) A CaMKII sinaliza eventos que produzem a fosforilação do substrato em questão, em resposta a outro estímulo fisiológico ou farmacológico que aumentam o nível de Ca^{2+}. (b) A inibição da CaMKII *in situ* bloqueia ambas as ações, no substrato de interesse e no efeito funcional desejado. (c) A fosforilação do substrato *in vitro* mimetiza os sítios de fosforilação do substrato *in vivo*. (d) Ativadores da CaMKII produzem os efeitos celulares desejados e fosforilação do substrato específico. (e) Introdução de Ca^{2+} de forma independente da CaMKII mimetiza ativadores e produz a fosforilação

de um conjunto de substratos específicos em resposta ao estímulo por Ca^{2+}. (f) Reduzindo ou removendo do conteúdo celular a quinase de interesse, há redução ou eliminação das vias mediadas por Ca^{2+}. Muitos destes critérios que dizem respeito à regulação da transmissão sináptica pela CaMKII, têm sido demonstrados com sucesso, entretanto, o papel dos processos autoregulatórios seguidos de ativação e autofosforilação ainda não foram totalmente elucidados quanto a sua função fisiológica neuronal (Hudmon & Schulman, 2002)

Muitos dos substratos da CaMKII já foram identificados, incluindo tubulina, MAP2 (microtubule-associated protein 2), proteína tau, sinapsina, caseína, myosin light chains, e miosina-V. No caso da miosina-V, foi mostrada a fosforilação da molécula inteira e após proteólise por calpaína (específica no domínio cauda), sugerindo que sua função seja regulada por fosforilação em resposta ao cálcio (Coelho & Larson, 1993). Além disso, em um estudo anterior que visava detectar interações de importância funcional entre a miosina-V e proteínas-alvo em células nervosas, surgiram evidências de uma possível associação entre a miosina-V e CaMKII (Costa, 1994). Costa e colaboradores, em 1999, demonstraram através de ensaios de imunoprecipitação e *overlay,* a existência de associação física entre a miosina-V e a CaMKII, concluindo que existe uma associação entre estas proteínas, envolvendo vários aspectos de importância funcional, como o fato das duas proteínas serem reguladas por cálcio, e , a CaMKII ser dependente também de calmodulina, que se encontra associada à miosina-V.

Apesar dos mecanismos moleculares nos quais se baseiam os processos de memória em abelha parecerem altamente conservados, supõe-se que a dinâmica temporal dos estágios da memória está ajustada ao comportamento dependente da função, desempenhada por este inseto (Giurfa & Menzel, 2002).

A aprendizagem em abelhas pode ser comparada a dos vertebrados de muitas maneiras, portanto, as abelhas servem como modelo para se entender os níveis de complexidade das funções cognitivas e seus substratos neurais. As possibilidades apresentadas pelo avanço tecnológico aplicado a novas técnicas de estudo, podem esclarecer quais são as limitações específicas do cérebro de abelha quando comparado a cérebros maiores em termos de estrutura e fisiologia, revelando assim, um potencial ainda não explorado no mini cérebro deste inseto (Giufa, 2003).

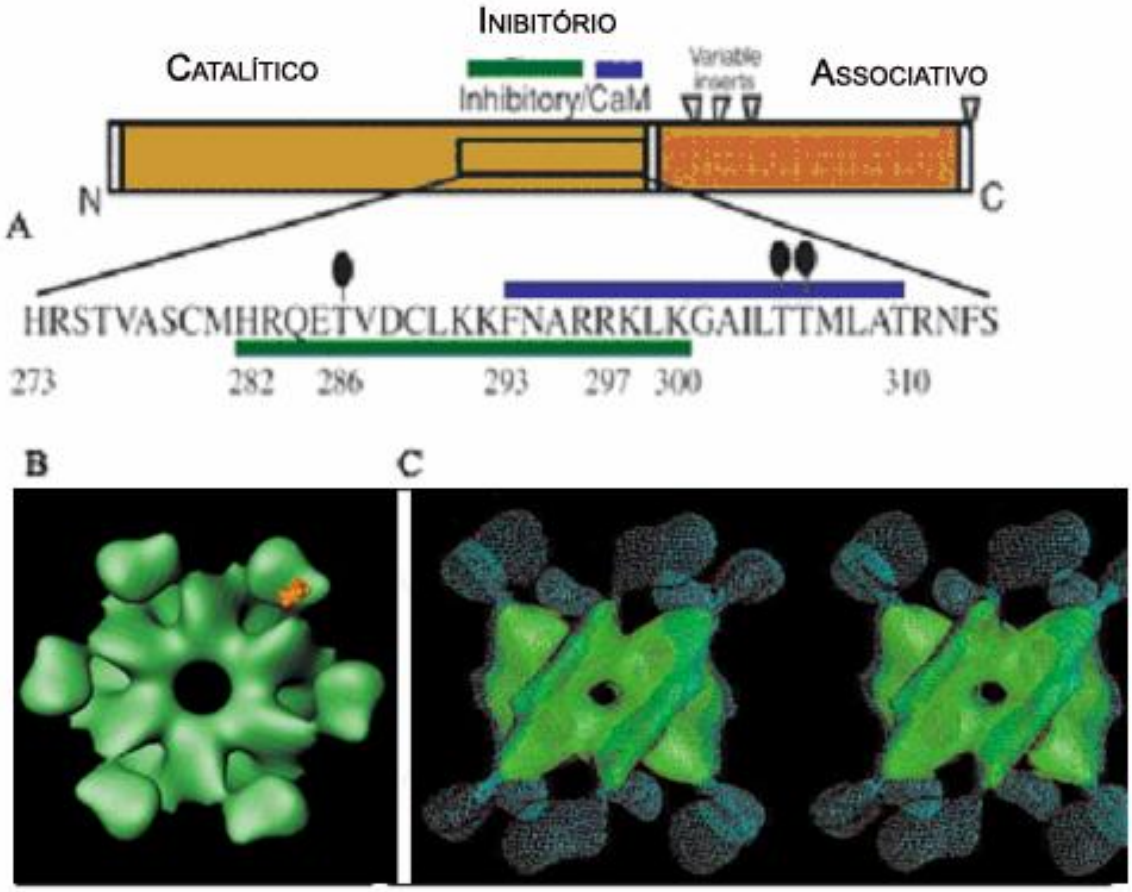


Fig 9 - (A): Esquema mostrando as sequencias que codificam os dominios: catalitico, regulatorio e associativo da CaMKII.
(B): Estrutura tridimensional da CaMKII.
(C): Visao perpendicular da CaMKII, mostrando a associaçao dos dominios das 12 subunidades (Lisman et al., 2002).

3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altfelder, K.; Muller, I.; Menzel, R., 1991. Ca^{2+}/ Calmodulin and Ca^{2+}/ Phospholipid-dependent protein Kinase in the neural tissue of the honeybee *Apis mellifera*. Insect Biochem. Vol. 21, Nº 5, pp. 479-486.

Armstrong, J., 2000. How do Rab proteins function in membrane traffic? Review. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 32.

Balch, W.E.; Glick, B.S.; Rothman, J.E., 1984.Sequential intermediates in the pathway of intercompartmental transport in a cell-free system.Cell. 39(3 Pt 2):525-36.

Balling, A.; Technau, G.M.; Heisenberg, M.,1987.Are the structural changes in adult Drosophila mushroom bodies memory traces? Studies on biochemical learning mutants. J Neurogenet. 4(2-3):65-73.

Bajjalieh, S.M., 1999. Synaptic vesicle docking and fusion. Current Opinion in Neurobiology, 9:321–328

Bartsch, D.; Ghirardi, M.; Skehel, P.A., 1995. Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: Relief of expression converts transient facilitation into long-term functional and structural changes. Cell 83: 979-992.

Benashski, S.E.; Harrison, A.; Patel-King, R.S.; King, S.M., 1997.Dimerization of the highly conserved light chain shared by dynein and myosin V. J Biol Chem. 15 ; 272 (33): 209-235.

Bennett, M.K.;Scheller, R.H.,1993. The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. Proc Natl Acad Sci USA ,90:2559-2563.

Berg, J.S.; Powell, B.C.; Cheney, R.E., 2001. A millennial myosin census.Mol Biol Cell. Apr;12(4):780-794. Review.

Bernabeu, R.; Schröder, N.; Quevedo, J., 1997a. Further evidence for the involvement of hippocampal cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. Neuroreport 8: 2221-2224.

Bernabeu, R.; Cammarota, M.; Izquierdo, I. & Medina, J.H., 1997b. Involvement of glutamate AMPA receptors and a cAMP/protein kinase A/CREB-P pathway in memory consolidation of an aversive learning task in rats. *Braz J Med Biol Res 30:* 967-970.

Bernabeu, R.; Bevilacqua, L.; Ardenghi, P., 1997c. Involvement of hippocampal D1/D5 receptor-cAMP signaling pathways in a late memory consolidation phase of an aversively-motivated task in rats. *Proc Natl Acad Sci USA 94:* 7041-7046.

Bevilacqua, L.; Ardenghi, P.; Schöder, N., 1997a.Agents that affect cAMP levels or protein kinase A activity modulate memory consolidation when injected into rat hippocampus but not amygdala. *Braz J Med Biol Res 30:* 967-970.

Bevilacqua, L., Ardenghi P., Schöder N., 1997b. Drugs acting upon the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A signalling pathway modulate memory consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amygdala. *Behav Pharmacol 8:* 331-338.

Bicker, G.; Schäfer S.; Ottersen O.P.; Storm-Mathisen J., 1988. Glutamate-like immunoreactivity in identified neuronal populations of insect nervous systems. J Neurosci; 8:2108– 22.

Bicker, G., 1999. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. Microsc Res Tech; 45:174– 83.

Bliss, T.V.P. & Collingridge, G.L,1993. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature, 361:* 31-39.

Bliss, T.V.P. & Lomo T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol 232:* 331-356.

Block, M.R.; Glick B.S.;Wilcox C.A.; Wieland F.T.; Rothman J.E. 1988. Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. Proc. Natl. Acad. Sci.USA 85:7852–56

Bock, J.B.; Scheller, R.H.1999. SNARE proteins mediate lipid bilayer fusion. Proc Natl Acad Sci USA ,96:12227-12229.

Bock, J.B.; Matern H.T.; Peden A.A.; Scheller R.H., 2001.A genomic perspective on membrane compartment organization. Nature 409(6822):839-41.

Bonafé, N.; Sellers J.R.; 1999. Molecular characterization of myosin V from Drosophila melanogaster. J Muscle Res Cell Motil. ;19(2):129-41. Erratum in: J Muscle Res Cell Motil 20(2):239.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Braun, A. P.;Schulman H.,1995. The Multifunctional Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase: From Form to Function. Annual Review of Physiology. Vol.57:417-445.

Brodin, L.; Löw, P.; Shupliakov, O. 2000. Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. Current Opinion in Neurobiology, 10:312–3200959-4388/00.

Brunger, A.T., 2001. Structure of proteins involved in synaptic vesicle fusion in neurons. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 30:157–71

Calakos, N., Scheller, R.H., 1994. Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. J. Biol. Chem. 269: 24534-24537

Camargo, J. M. F.; Stort, A. C..,1973.A Abelha: *Apis mellifera Linnaeus*. São Paulo: EDART, 80p.

Cammarota, M.; Bevilaqua, L. R.M.; Viola, H.; Kerr, D. S.; Reichmann, B.; Teixeira V.; Bulla M.; Izquierdo I.; Medina J.H., 2002. Participation of CaMKII in Neuronal Plasticity and Memory Formation. Cellular and Molecular Neurobiology, Vol. 22, Nº. 3, Review.

Capaldi, E.A.; Robinson G.E.; Fahrbach, S.E.,1999. NEUROETHOLOGY OF SPATIAL LEARNING: The Birds and the Bees. Annu. Rev. Psychol. 50: 651.682.

Cardoso, S. H., 2001. Communication between nerve cells. Brain and Mind Magazine (versão eletrônica), UNICAMP.

Carew, T.J., 1996. Molecular enhancement of memory formation. Neuron 16: 5-8.

Chen, Y.A.; Scales, S.J.; Patel, S.M.; Doung, Y.C.; Scheller, R.H., 1999. SNARE complex formation is triggered by $Ca2^{+}$ and drives membrane fusion. Cell 97:165-174.

Chen, Y.A.; Scheller, R.H., 2001.SNARE-mediated membrane fusion.Nat Rev Mol. Cell Biol. Pp. 98-106. Review.

Cheney, R. E.; Mooseker, M. S., 1992. Unconventional myosins. Curr. Op.Cell Biol. Vol. 4: pp. 27-35.

Cheney, R.E.; O'Shea, M.K.; Heuser, J.E.,;Coelho, M.V.; Wolenski, J.S., 1993a. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. Cell 75:13-23

Cheney, R.E.; Riley, M.A.; Mooseker, M.S., 1993b. Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. *Cell Motility Cytoskeleton* 24:215-223.

Clapham, D.E., 1995. Calcium signaling. Cell 80:259–268.

Coelho, M.V; Larson, R.E., 1993.Ca (2+)-dependent phosphorylation of the tail domain of myosin-V, a calmodulin-binding myosin in vertebrate brain. Braz J Med Biol Res. 26(5):465-472.

Côrrea, M.P.F., 2003 – Embrapa ISSN 1678-(8818 Versão Eletrônica).

Costa, M.C.; Mani F.; Santoro, W.; Espreáfico, E.; Larson, R.E., 1999. Brain Myosin-V, a Calmodulin-carrying Myosin, Binds toCalmodulin-dependent Protein Kinase II and Activates Its Kinase. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 274, No. 22, Issue of May 28, pp. 15811–15819.

Davis, G.W.; Schuster, C.M.; Goodman, C.S., 1996. Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. III. CREB is necessary for presynaptic functional plasticity. *Neuron 17:* 669-679.

Dick, T.; Surana, U.; Chia, W., 1996.Molecular and genetic characterization of SLC1, a putative Saccharomyces cerevisiae homolog of the metazoan cytoplasmic dynein light chain 1.Mol Gen Genet. Apr 24;251(1):38-43.

Dulubova, I.; Sugita, S.; Hill, S.; Hosaka, M.; Fernandez, I.; Südhof, T.C.; Rizo, J., 1999. A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. The EMBO Journal Vol. 18,pp. 4372-4382.

Engle, L.J.; Kennett, R.H., 1994.Cloning, analysis, and chromosomal localization of myoxin (MYH12), the human homologue to the mouse dilute gene. Genomics 19(3):407-16.

Espindola, F.S. Espreáfico, E.M.; Coelho, M.V.; Martins, A.R.; Costa, F.R.; Mooseker, M.S.; Larson R.E.,1992.Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin. J Cell Biol. 118(2):359-68.

Espindola, F.S.; Suter, D.M.; Partata, L.B.; Cao, T.; Wolenski, J.S.; Cheney R.E.; King, S.M.; Mooseker, M.S., 2000.The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN.Cell Motil Cytoskeleton. 47(4):269-81.

Espindola, F.S.; Silva M. F. R.; Santos P. M.; Peixoto, P.M.V.; Santos A.A.D., 2004a. Isolation of synaptosomes from *Apis mellifera* brain and identification of myosins V and VI and clathrin. Bioscience.

Espindola, F.S.; Silva, F. R.M.; Peixoto, V. M. P.; Lima A. B. P.; Colleto, A. S.C.; Peixoto G. L.; Cálabria, L. K.; Teixeira, R. R.; Moraes, V. R. A., 2004b. Myosin-V in honeybee brain *Apis mellifera* In: Proceedings of the 8th IBRA International Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto.

Espreáfico, E.M.; Cheney, R.E.; Matteoli M.; Nascimento A.A.; De Camilli P.V.; Larson, R.E.; Mooseker, M.S., 1992.Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. J Cell Biol. 119(6):1541-57.

Evans , L.L.; Hammer, J.; Bridgman, P.C.,1997. Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from dilute-lethal neurons. J. Cell Science 110,439-449.

Evans L. L.; Lee, A. J.; Bridgman, P. C.; Mooseker, M. S., 1998. Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport.Journal of Cell Science 111, 2055-2066.

Fasshauer, D.; Sutton, R.B.; Brunger, A.T.; Jahn, R., 1998.Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs.Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 22;95(26):15781-6.

Ferrer, I.; Blanco, R.; Rivera, R., 1996. CREB-1 and CREB-2 immunoreactivity in the rat brain. *Brain Research 712:* 159-164.

Fiebig, K.M.; Rice, L.M.; Pollock, E.; Brunger, AT.,1999 . Folding intermediates of SNARE complex assembly.Nat Struct Biol.;6(2):117-23. PMID: 10048921

Freud, S., 1895. Proyecto de una psicología para neurólogos.

Fujita, Y.; Sasaki, T.; Fukui, K.; Kotani, H.; Kimura, T.; Hata, Y.; Südhof, T.C.; Scheller, R.H.; Takai, Y.,1996.Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by Protein Kinase C ITS IMPLICATION IN REGULATING THE INTERACTION OF Munc-18/n-Sec1/rbSec1 WITH SYNTAXIN. Vol. 271, Nº 13, pp. 7265-7268.

Galizia, C.G.; Menzel, R., 2000. Odour perception in honeybees: coding information in glomerular patterns.Curr Opin Neurobiol. 10(4):504-10. Review.

Gasic, G.P.; Hollman, M., 1992. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Ann Rev Physiol 54:* 507-536.

Geppert, M.; Südhof, T.C., 1998. RAB3 AND SYNAPTOTAGMIN:The Yin and Yang of Synaptic Membrane Fusion- Annu. Rev. Neurosci. 21:75–95.

Ghosh, A.,2002.Neurobiology Learning more about NMDA receptor regulation. Science ;295:449– 51.

Giurfa, M., 2003.Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. Current Opinion in Neurobiology 2003, 13:726–735

Govindan, B.; Bowser, R.; Novick, P., 1995. The role of Myo2, a yeast class V myosin,in vesicular transport. J. Cell Biol. 128: 1055-1068

Grant, S.E.; Silva, A.C., 1994.Targeting learning. Trends Neurosci 17: 71-75.

Griscelli, C.; Durandy, A.; Guy-Grand, D.; Daguillard, F.; Herzog, C; Prunieiras, M. A., 1978. Syndrome associating partial albinism and immunodefeciency. Am. J. Med**.** V. 65: 691-702,

Griffith, L.C.; Greenspan, R.J., 1993. The diversity of calcium/calmodulindependent protein kinase II isoforms in Drosophila is generated by alternative splicing of a single gene. J Neurochem 61:1534–1537.

Hammer, J.A., 1994. The structure and function of unconventional myosins: A review. *J.Muscle Res. Cell Motility* 15:1-10.

Hammer, M.; Menzel, R., 1995.Learning and memory in the honeybee.J Neurosci. 1617-30. PMID: 7891123.

Hanson, P.I.; Schulman, H., 1992. Inhibitory autophosphorylation of multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase analyzed by site-directed mutagenesis.J Biol Chem. 267(24):17216-24.

Hanson, P.I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R., Heuser, J.E.,1997. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. Cell , 90:523-535.
Hata, Y., Slaughter, C.A., Sudhof, T.C., 1993. Synaptic vesicle fusion complex contains unc18 homologue bound to syntaxin. Nature 366:347–51

Hebb, D.O., 1949. The Organisation of Behaviour: A Neuropsychological Theory. New York, Wiley.

Hildebrand, J.G.; Shepherd, G.M.,1997. Molecular mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. Annu Rev Neurosci 20: 593-631

Huang, Y.Y.; Kandel, E.R., 1995. D1/D5 receptor agonists induce a protein-sysnthesis-dependent late potentiation in the CA1 region of the hippocampus. Proc Natl Acad Sci USA 92: 2446-2450.

Huang, Y.Y.; Colley, P.A.; Routtenberg, A.,1990. Postsynaptic then presynaptic protein kinase C activity may be necessary for long-term potentiation. *Neurosci 4:* 819-827.

Hudmon, A.; Schulman, H., 2002.Structure-function of the multifunctional Ca2+/ calmodulin-dependent protein kinase II. Biochem J. (Pt 3):593-611. Review.

Hunt, G.J.; Page, R.E. Jr. ,1995. Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers.Genetics; 139(3):1371-82

Izquierdo, I.,1994.Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. *FASEB J 8:* 1139-1145.

Izquierdo, I.; Medina, J.H., 1997.Memory formation: The sequence of Biochemical Events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem 68:* 285-316.

Jahn, R.; Südhof, T.C.,1999. Membrane fusion and exocytosis. Annu. Rev. Biochem. 68:863–911.

Jahn, R.; Grubmüller, H.,2002. Membrane fusion. Current Opinion in Cell Biology 14:488–495

Jahn, R., 2004. Principles of exocytosis and membrane fusion.Ann N Y Acad Sci. Apr;1014:170-8. Review.

Johannes, L.; Doussau, F.; Clabecq, A.; Henry, J.P.; Darchen, F.; Poulain, B., 1996. Evidence for a functional link between Rab3 and the SNARE complex. Journal of Cell Science 109, 2875-2884 .

Johnston, G. C.; Prendergast, J. A.; Singer, R. A., 1991. The *Saccharomyces cerevisae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J. Cell Biol*. 113: 539-51.

Johnston, P.A.; Südhof, T.C., 1989. The Multisubunit Structure of Synaptophysin. The Journal of Biological Chemistry by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.Vol. 265, Nº. 15, p. 886-946.

Kamikouchi, A.; Takeuchi, H.; Sawata, M.; Ohashi, K.; Natori, S.; Kubo, T., 1998. Preferential expression of the gene for a putative inositol 1,4,5-trisphosphate receptor homologue in the mushroom bodies of the brain of the worker honeybee *Apis mellifera* L.Biochem Biophys Res Commun.;242(1):181-6.

Kamikouchi,.A.; Takeuchi, H.; Sawata, M.; Natori, S.; Kubo, T., 2000.Concentrated expression of Ca2+/ calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in the mushroom bodies of the brain of the honeybee *Apis mellifera* L.J Comp Neurol. 417(4):501-10.

Kamikouchi, A.; Morioka, M.; Kubo, T., 2004. Identification of honeybee antennal protein/ genes expressed in a sex-and/ or caste selective manner. Zoological Science 21:53-62.

Kavalali, E.T., 2002. SNARE interactions in membrane trafficking: a perspective from mammalian central synapses. Bioessays 24:926–36

Kerr, W.E.,1998. A Importância da Meliponicultura para o País. Biotecnologia Nº3.

Kubo, T.; Sakani, M.; Nakamura, J.; Sasagawa, H.; Ohashi, H. T.; e Natori, S.,1996. Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. J. Biochem., 119:291-295.

Langford, G. M., 1995. Actin and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr. Opin. Cell Biol*., 7: 82-8.

Langford, G.M.; Molyneaux, B.J., 1998.Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects.Brain Res Brain Res Rev. Nov;28(1-2):1-8. Review.

Langford, G.M., 2002. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. Traffic. Dec;3(12):859-65. Review.

Larson, R.E.; Ferro, J.A.; Queiroz, E.A., 1986.Isolation and purification of actomyosin ATPase from mammalian brain.J Neurosci Methods.(1):47-58.

Larson, R.E.; Espindola, F.S.; Espreáfico, E.M., 1990.Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin.J Neurochem. 54(4):1288-94.

Lin, R. C.; Scheller, R. H., 1997.Structural Organization of the Synaptic Exocytosis Core Complex. Neuron, Vol. 19, 1087–1094.

Lin, R.C.; Scheller, R.H., 2000. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16:19–49.

Lisman, J.; Schulman, H.; Cline, H., 2002.The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. Nat Rev Neurosci. (3):175-90.

Littleton, J.T.; Barnard, R.J.; Titus, S.A.; Slind, J.; Chapman, E.R.; Ganetzky, B., 2001 Oc. SNARE-complex disassembly by NSF follows synaptic-vesicle fusion.Proc. Natl Acad Sci U S A.9;98(21):12233-8. PMID: 11593041

Lozano, V.C.; Armengaud, C.; Gauthier, M., 2001. Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee..J Comp Physiol [A].;187(4):249-54.

Martin, K.C.; Kandel, E.R.,1996. Cell-adhesion molecules, CREB, and the formation of new synaptic connections. Neuron 17: 567-570,

Mani, F.; Espreáfico, E.M.; Larson, R.E., 1994. Myosin-V is present in synaptosomes from rat cerebral cortex. Braz J Med Biol Res. (11):2639-43.

Mayford, M.; Bach, M.E.; Huang, Y.Y., 1996. Control of memory formation through regulation of a CaMKII transgene. *Science 274:* 1678-1683.

Medina, J.H.; Izquierdo I., 1995 Retrograde messengers, long-term potentiation and memory processes. *Brain Res Rev 21:* 185-194.

Meller, V.H.; Davis, R.L., 1996.Biochemistry of insect learning: lessons from bees and flies.Insect Biochem Mol Biol. (4):327-35. Review.

Menzel, R., 1990. Learning, memory, and “cognition” in honey bees. In Neurobiology of comparative cognition (ed. R.P. Kesner and D.S.Olton), pp. 237–292. Erlbaum Inc., Hillsdale, NJ.

Menzel, R., 1999. Memory dynamics in the honeybee. J Comp Physiol [A] 185:323-340.

Menzel, R., 2001. Searching for the Memory Trace in a Mini-Brain,the Honeybee. Learn Mem, 8:53-62.

Menzel, R.; Giurfa M., 2001.Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. Trends Cogn Sci. 1;5(2):62-71.

Mercer, J. A.; Seperack, P. K.; Strobel, M. C.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A., 1991. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus.Nature. 21;349 (6311):709-13. Erratum in: Nature 1991;352(6335):547.

Mermall, V.; Miller, K.G., 1995. The 95F unconventional myosin is required for proper organization of the *Drosophila* syncytial blastoderm. *J. Cell Biol.*

Meyer, T.; Shen K., 2000. In and out of the postsynaptic region: signalling proteins on the move. Trends Cell Biol .6:238-44 Review.

Miller, K.E.; Sheetz, M.P., 2000.Characterization of Myosin V Binding to Brain Vesicles. J Biol Chem, Issue 4, 2598-2606.

Milner, N., 1998. Memory and the medial temporal regions of the brain. In: Pribram, K.H. & Broadbent, D.B. – Biology of Memory. New York, Academic Press,p. 29-50.

Misura, K.M.; Scheller, R.H.; Weis, W.I., 2000.Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin complex. Nature 404:355–62

Mobbs, P.G.; Mercer, A.R., 1984. A glyoxylic acid method for the localization of catecholamines in insect nervous systems.Stain Technol. 59(1):58-61.

Molyneaux, B.J.; Mulcahey, M.K.; Stafford, P.; Langford, G.M., 2000. Sequence and phylogenetic analysis of squid myosin-V: a vesicle motor in nerve cells. Cell Motil Cytoskeleton. 46(2):108-15.

Mooseker, M. S.; Cheney, R. E. 1995. Unconventional myosins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 11: 633-75.

Mooseker, M.S.; Wolenski, J.S.; Coleman, T.R.; Hayden, S.M.; Cheney, R.E.; 1991.Structural and functional dissection of a membrane-bound mechanoenzyme: Brush border myosin-I. From *Ordering the Membrane-Cytoskeleton Trilayer*. Current Topics in Membranes. *Academic Press*, 38:31-55.

Mukherji, S.; Soderling, T.R., 1994.Regulation of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II by inter- and intrasubunit-catalyzed autophosphorylations.J Biol Chem. May 13;269(19):13744-7.

Mulholland, J.; Wesp, A.; Riezman, H.; Botstein, D., 1997. Yeast actin cytoskeleton mutants accumulate a new class of Golgi-derived secretory vesicle. Mol Biol Cell

Müller, U., 2002. Learning in honeybees: from molecules to behaviour .REVIEW. Zoology 105 (2002): 313–320

Nascimento, A. A. C.; Amaral, R. G.; Bizario, J. C. S.; Larson, R. E.; Espreáfico, E.M., 1997. Subcellular localization of myosin-V in the B16 melanoma cells, a wild typecell line for the *dilute* gene. *Mol. Biol. Cell*, 8.

Nunes, F. M F.; Valente, V.; Sousa, J.F.; Cunha, M.A.V.; Pinheiro, D.G.; Maia, R. M.; Araújo, D. D.; Costa, M. C.R.; Martins, W. K.; Carvalho, A. F.; Monesi, N.; Reis, L.F. L.; Nascimento, A. M.; Peixoto, P. M. V.; Silva, M. F. R.; Ramos, R. G. P.; Dias-Neto, E.; Souza, S. J.; Simpson, A. J. G.; Zago, M. A.; Soares, A. E. E.: Bitondi, M.M.G.; Espreáfico, E. M.; Espindola, F. S.; Paco-Larson, M. L.; Simões, Z. L. P.; Hartfelder, K.; Silva jr, W.A .,2004. The use of Open Readingframe ESTs (ORESTES) for analysis of the honey bee transcriptome BMC Genomics , 5:84 doi:10.1186/1471-2164-5-84

Ohyama, A.;Komiya, Y.; Igarashi, M., 2001.Globular Tail of Myosin-V is bound to vamp/synaptobrevin. Biochem Biophys Res Commun.2;280(4):988-91.

Ohyama, A.; Hosaka, K.; Komiya, Y.; Akagawa, K.; Yamauchi, E.; Taniguchi, H.; Sasagawa, N.; Kumakura, K.; Mochida, S.; Yamauchi, T.; Igarashi M., 2002. Regulation of exocytosis through Ca2_/ATP-dependent binding of autophosphory lated $Ca2^{+}$/calmodulin-activated protein kinase II to syntaxin 1A. The Journal of Neuroscience. 22(9):3342–3351.

Oleskevich, S.; Clements, J.D.; Srinivasan, M.V.J., 1997. Long-term synaptic plasticity inthe honeybee. J Neurophysiol. 78(1):528-32 .

Omholt, S.W.; Amdam, G.V., 2004.Related Articles Epigenetic regulation of aging in honeybee workers.Sci Aging Knowledge Environ. 30;2004(26):pe28. Review. PMID: 15229347.

Otto, H.; Hanson, P.I.; Jahn, R.,1997.Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A.94(12):6197-201.

Parlatti, F.; Weber, T.; McNew ,J.A.; Westermann, B.; Söllner, T.H.; Rothman J.E., 1999. Rapid and efficient fusion of phospholipid vesicles by the a a -helical core of a SNARE complex in the absence of an N-terminal regulatory domain. Proc Natl Acad Sci USA ,96:12565-12570.

Parmentier, M.L.; Pin, J.P.; Bockaert, J.; Grau, Y., 1996.Cloning and functional expression of a Drosophila metabotropic glutamate receptor expressed in the embryonic CNS. J Neurosci;16:6687– 94.

Passos-Lima, A. B., (2001) Análise bioquímica e imunohistoquímica de dineína, miosina-V e VI no cérebro das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona Scutellaris*. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG.

Pastural, E.; Barrat, F.J.; Dufoureq-Lagehouse, R.; Certain, S.; Sana, O.; Jabado, N.; Seger, R.; Griscelli, C.; Fisher, A.; Saint, B. G., 1997. Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in myosin-Va gene. *Nature Genetics*. 16: 289-92.

Pavlov, I.P., 1926. Conferências sobre o trabalho dos grandes hemisférios cerebrais. In: Obras Escolhidas. São Paulo, Fulgor.

Peixoto, P. M.V.; Passos, A. B. L.; Mendes, C. T.; Gonçalves, S. M.; Colleto, A. S.; Pellizon, C. H.; Espreáfico, E. E. M.; Santos, A. A. D.; Espindola, F. S., 2000. Myosin-V identification and localization in nervous tissues of *Apis mellifera* and *Melipona scutellaris*. In: Proceedings of Ithe I International Symposium on Myosin V and II Ibero American Forum on the Cytoskeleton. Paraty –RJ.UNIRIO.

Peixoto, P. M. V., 2002. Localização de miosina-V e cadeia leve de dineína em diferentes regiões do cérebro de *Apis mellifera*. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG.

Pelham, H.R., 2001.SNAREs and the specificity of membrane fusion.Trends Cell Biol. 99-101. Review.

Petersen, S.A.; Fetter, R.D.; Noordermeer, J.N.; Goodman, C.S.; DiAntonio, A., 1997. Genetic analysis of glutamate receptors in Drosophila reveals a retrograde signal regulating presynaptic transmitter release.Neuron. 19(6):1237-48.

Pfeffer, S. R., 1996. Transport vesicle docking SNAREs and associates. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12:441–61.

Poirier, M.A.; Xiao, W.; Macosko, J.C.; Chan, C.; Shin, Y.K.; Bennett, M.K.; 1998. The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. Nat. Struct. Biol. 5:765–69

Prekerris, R.; Terrian, D.M.,1997. Brain Myosin-V is a sinaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca^{++}-dependente interaction with the sinaptobrevin sinaptophisin complex . *J. Cell Biol*.,137: 1589-1601.

Provance, D.W.; Mercer, J. A., 1995. Association of dilute with melanosomes in melanocytes. Mol.Biol. Cell 6 (suplement), 146 a.

Quevedo, J.; Vianna, M.; Zanatta, M.S. et al. 1997b. Involvement of mechanisms ependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the ippocampus but not in the caudate nucleus in memory. *Behav Pharmacol 8:* 13-717.

Ramón & Cajal, S., 1952. Neuronismo o reticularismo? Madrid, Instituto Ramón y Cajal.

Reck-Peterson, S. L.; Provance, W.Jr.; Mercer, J. A.; Mooseker, M.S., 2000. Class V myosins. Biochimica et Biophysica Acta 1496 36-51.Review.

Richmond, J. E.; Broadie, K. S., 2002. The synaptic vesicle cycle: exocytosis and endocytosis in Drosophilaand C. elegans. Current Opinion in Neurobiology , 12:499–507

Rizo, J.; Südhof, T.C., 2002. Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. Nat. Rev. Neurosci. 3:641–53

Robinson, G.E.; Strambi, C.; Strambi, A.; Huang, Z.Y., 1992. Reproduction in worker honey bees is associated with low juvenile hormone titers and rates of biosynthesis. Gen Comp Endocrinol. 87(3):471-80. PMID: 1426950

Robinson, M.S.,1994. The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. Curr Opin Cell Biol, 6:538–544.

Rodriguez, O.C.; Cheney, R.E., 2000.A new direction for myosin.Trends Cell Biol. (8):307-11. Review.

Roesler, J.; Quevedo, J., 2002. Review. Revista de Psiquiatria Clínica, nº 4, vol.25, edição Internet.

Rosé, S.D.; Lejen, T.; Cassaleti, L.; Larson, R.E.; Pene, T.D.; Trifaró, J.M., 2003. Myosin II and V in chromaffin cells: Myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. Journal of Neurochemistry, 85, 287-298.

Rothman, J.E.,1994. Mechanisms of intracellular protein transport. Nature 1994, 372:55-63.

Roubik, D.W.,1989. Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge, Cambridge University Press, 514p.

Ryan, T., 1999.Inhibitors of myosin light chain kinase block synaptic vesicle pool mobilization during action potential firing. J Neuroscience, 19:1317-1323.

Schekman, R.; Orci, L.,1996. Coat proteins and vesicle budding. Science , 271:1526.

Sheng, Z.H.; Westenbroek, R.E.; Catterall, W.A., 1998. Physical link and functional coupling of presynaptic calcium channels and the synaptic vesicle docking/fusion machinery.J.Bioenerg Biomembr.4:335-45.Review.

Schraw, T. D.; Lemons, P.P.; Dean, W.L.; Whiteheart, S.W.,2003.A Role for Sec1/Munc18 Proteins in Platelet Exocytosis. Biochemical Journal. Manuscript BJ20030610.

Seeburg, P.H., 1994. Monyer, H.; Sprengel, R. & Burnashev, N. – Molecular biology of MDA receptors. In: Collingridge, G.L. & Watkins, J.C. Oxford University Press. p. 147-57.

Shapiro, M.L.; Caramanos, Z.,1990. NMDA antagonist MK-801 impairs acquisition but not performance of spatial working and reference memory. *Psychobiology 8:* 231-243.

Sheu, F.S.; McCabe, B.J.; Horn, G.; Routtenberg, A., 1993. Learning selectively increases protein kinase C substrate phosphorylation in specific regions of the chick brain. Proc Natl Acad Sci USA 90: 2705-2709.

Si, A.; Helliwell, P.; Maleszka, R., 2004. Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memoryin the honeybee (*Apis mellifera*). Pharmacology, Bio chemistry and Behavior 77 191–197.

Silva, A.J.; Stevens, C.F.; Tonegawa, S.; Wong, Y.,1992a. Deficient hippocampal long-term potentiation in a-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. Science 257: 201-206.

Silva, A.J.; Paylor, R.; Wehner, J.M.; Tonegawa, S., 1992b. Impaired spatial learning in -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science 257:* 206-210.

Silva, M.F.R.; Calabria, L. K.; Teixeira, R.R.; Santos, A. A. D.; Martins, A. R.; Espíndola, F. S.,2002. Myosin V and VI localization in brain tissue and synaptosomes fractions of honeybee *Apis mellifera*.Molecular Biology of the cell. Vol.13, 457a.

Sinakevitch, I.; Farris, S.M.; Strausfeld, N.J, 2001. Taurine-aspartate and glutamate like immunoreactivity identifies chemically distinct subdivisions of Kenyon cells in the cockroach mushroom body. J Comp Neurol;439:352–67.

Snodgrass, R. E., 1956. Anatomy of the honey bee. Comstock Publishing Associates, New York, 334p.

Söllner, T.; Whiteheart, S.W.; Brunner, M.; Erdjument-Bromage, H.; Geromanos, S.; Tempst, P.; Rothman, J.E., 1993.SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature, 362(6418):318-24.

Söllner, T.; Rothman J.E., 1994 Aug. Neurotransmission: harnessing fusion machinery at the synapse.Trends Neurosci. 17(8):344-8.

Strack, S.; McNeill, R.B.; Colbran, R.J., 2000. Mechanism and regulation of calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II targeting to the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor.J Biol Chem.275(31):23798-806.

Sucher, N.J.; Awobuluyi, M.; Choi, Y.B.; Lipton, S.A.,1996. NMDA receptors: from genes to channels. *Trends Pharmacol Sci 17:* 348-355.

Südhof, T.C.,1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein–protein interactions. Nature , 375:645-653.

Südhof, T.C.,2004.The synaptic vesicle cycle. Annu Rev Neurosci. 27:509-7.Review.

Suter, D.M.; Espindola, F.S.; Lin, C.H.; Forscher, P.; Mooseker, M.S., 2000.Localization of unconventional myosins V and VI in neuronal growth cones. J Neurobiol. 15;42 (3):370-82.

Sutton, R.B.; Fasshauer, D.; Jahn, R.; Brunger, A.T.,1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4. Nature 395:347.

Titus, M.A.; Kuspa, A.; Loomis, W.F., 1994. Discovery of myosin genes by physical mapping in *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9446-50

Tabb, J.S.; Molyneux, B.J.; Cohen, D.L; Kuznetsov, S.A.; Langford, G.M., 1998. Transport of ER vesicle on actina filaments in nerurons by myosin V. J. *Cell Sci*. 11:3221-3234.

Takagishi, Y., 1996.The *dilute-letal* (d^l) gene attacks a Ca^{++} store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice**.** Neurosc. Letters, Vol. 215,169-172,

Tan, S.E.;Liang, K.C.,1996. Spatial learning alters hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rats. *Brain Res 711:* 234-240,

Ting, A.E.; Scheller, R.H., 1995. Insight into the molecular mechanisms of synaptic vesicle docking and fusion. Cold Spring Harb Symp Quant Biol.;60:361-9.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. atl. Acad. Sci*. USA 76: 4350-4.

Trimble, W.S.; Cowan, D.M.; Scheller, R.H., 1988. VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. Proc Natl Acad Sci USA 85:4538-4542.

Tully, T., 1996 Discovery of genes involved with learning and memory: An experimental synthesis of Hirschian and Benzerian perspectives. Proc Natl Acad Sci USA 93: 13460-13467.

Ultsch, A.; Schuster, C.M.; Laube, B.; Betz, H,; Schmitt, B., 1993.Glutamate receptors of *Drosophila melanogaster*. Primary structure of a putative NMDA receptor protein expressed in the head of the adult fly. FEBS Lett;324:171–7.

Ungar, D.; Hughson, F. M., 2003. SNARE Protein Structure and Function. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19:493–517.

Ungermann, C.; Von Mollard, G.F.; Jensen, O.N.; Margolis, N.; Stevens, T.H.; Wickner, W., 1999. Three v-SNAREs and two t-SNAREs, present in a pentameric cis-SNARE complex on isolated vacuoles, are essential for homotypic fusion. .CellBiol. 28:1435–4 Vamp/Synaptobrevin. Biochemical and Biophysical Res. Com. 280, 988-991.

Völkner, M.; Lenz-Bohme, B.; Betz, H.; Schmitt, B., 2000. Novel CNS glutamate receptor subunit genes of Drosophila melanogaster. J Neurochem;75:1791– 9.

Wikström, M. A.; Matthews, P.; Roberts, D.; Collingridge, G.L; Bortolotto, Z.A.,2003. Parallel kinase cascades are involved in the induction of LTP at hippocampal CA1 synapses. Neuropharmacology 45 (2003) 828–836.

Whiteheart, S.W.; Matveeva, E.A., 2004. Multiple binding proteins suggest diverse functions for the N-ethylmaleimide sensitive factor.J Struct Biol.;146(1-2):32-43. Review. PMID: 15037235.

Whitfield, C. W.; Band, M. R.; Bonaldo, M. F.; Kumar, C. G.; Liu, L.; Pardinas, J. R.; Robertson, H. M.; Soares, B.; Robinson, G. E., 2002. Annotated Expressed Sequence Tags and cDNA. Microarrays for Studies of Brain and Behavior in the Honey Bee. Genome Research, Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 1088-9051/01,

Wolfman, C.; Fin, C.; Dias, M., 1994. Intrahippocampal or intraamygdala infusion of KN-62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, causes retrograde amnesia in the rat. *Behav Neural Biol 61:* 203-205.

Xue, M.; Zhang, B., 2002. Do SNARE proteins confer specificity for vesicle fusion? Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 15; 99 (21): 13359–13361

Yin, J.C.P.; Tully, T.,1996.CREB and the formation of long-term memory. *Curr Opin Neurobiol 6:* 264-268.

Yoshida, S.; Yasuda, A.; Kawazato, H.; Sakai, K.; Shimada, T.; Takeshita, M.; Yuasa, S.; Kobayashi, T.; Watanabe, S.; Okuyama, H., 1997. Synaptic vesicle ultrastructural changes in the rat hippocampus induced by a combination of alpha-linolenate deficiency and a learning task. J. Neurochem.; 68 (3) :1261-8. PMID: 9048773

Yoshimura, M.; Cooper, D.M.F.,1993. Type-specific stimulation of adenylcyclase by protein kinase C. *J Biol Chem 268:* 4607.

Zhang, S. W.; Lehrer, M.; Srinivasan, M. V., 1999. Honeybee Memory: Navigation by Associative grouping and recall of visual stimuli. Neurobiology of learning and memory 72, 180–201

Zhao, W.Q.; Polya, G.M.; Wang, B.H.,1995 Inhibitors of cAMP-dependent protein kinase impair long-term memory formation in day-old chicks. *Neurobiol Learn Mem. 64:* 106-118.

Zhao, L. P.; Koslovsky, J. S.; Reinhard, J.; Bahler, M.; Witt, A. E.; Provance, D. W.; Mercer, J. A., 1996. Cloning and characterzation of myr6, an unconventional myosin of the dilute/myosinV family. Proc. Natl. Acad. Sci.93: 10826-31.

Zhuo, M.; H. Y.; Schultz, C., 1994. Role of guanyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. Nature 368: 635-639.

4.CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

IMUNODETECÇÃO em FRAÇÕES PROTÉICAS de CÉREBRO DE ABELHA *Apis mellifera* de PROTEÍNAS ASSOCIADAS A VESÍCULAS SINÁPTICAS, MIOSINA-V e CA2+/CALMODULINA QUINASE II (CaMKII).

RESUMO

A neuroplasticidade e a capacidade de aprendizagem estão diretamente relacionadas a neurotransmissão, envolvendo eventos pré e pós sinápticos. Estudos neurobiológicos em abelhas *A. mellifera* revelam, uma plasticidade neural simples e eficiente envolvida em processos de aprendizado e memória. No presente estudo, por meio de *immnublottings*, proteínas SNAREs , um motor molecular , a miosina-V, e , CaMKII são identificadas em frações protéicas de cérebro desta abelha, incluindo para sintaxina e CaMKII as castas, zangão e rainha. Com o objetivo de estabelecer comparações entre a imunoreatividade relativa de cada anticorpo, foram feitas preparações semelhantes para cérebro de coelho, rato, e pintainho. Além das frações H,S1,P1,S2,P2, fez-se a fração enriquecida em membrana de vesículas P2TX, para abelha, coelho, rato e pintainho, nas quais o anticorpo anti-miosina-V foi sondado. Em adição, frações protéicas de regiões do cérebro da abelha foram testadas, com os anticorpos anti-clatrina e anti-CaMKII. Assim, a imunoreatividade aos anticorpos gerados em vertebrados, mostra que em himenóptero, existe uma identificação de regiões conservadas. Essa ortologia sugere um compartilhamento dos princípios básicos comuns com outros organismos, no transporte intracelular, tráfego de membranas, e, na transdução de sinal mediada por Ca++.

ABSTRACT

Neurotransmitter secretion and subsequent release, shares many features with constitutive membrane trafficking. Intracellular membrane fusion in eukaryotic cells involves a several family's proteins, including SNARES, Rabs, Sec1/Munc-18 (SM-proteins), and molecular motors in an evolutionary conserved machinery. Honeybee brain has been successfully used as a neurobiology model to investigate memory, learning and behavior. In the current work, through the techniques Western blot and immunohistochemistry, SNAREs proteins, myosin-V, and, CaMKII are identified in protein fractions and tissue of honeybee worker's brain *(Apis mellifera)*. By immunoblotting, using specific antibodies: syntaxin and CaMKII was probed in the casts drone and queen; for the brain fractions H and S1 of worker bee, rabbit and rat, the CaMKII antibody was tested; the brain fractions H, S1, P1, S2, P2, and enriched membrane fraction P2TX, of worker bee, chicken, rabbit and rat was probed with antibody against myosin-Vfor comparison betweenyours respective immunoreactivity. In addition, honeybee worker's brain regions fractions were tested with antibodies Clathrin and CaMKII. Indeed, the immunoreactivity for the antibodies raised against vertebrates, showed conserved regions in hymenoptera. This orthology suggests that many of the proteins important for transmitter release have homologs involved in intracellular vesicle transport, and all forms of vesicle trafficking share common basic principles with others organisms.

INTRODUÇÃO

Há mais de uma década inúmeros estudos neurobiológicos têm como alvo o cérebro da abelha *A. mellifera*. Por apresentar um complexo repertório comportamental, evidenciando capacidade de aprendizado e memorização, em um sistema nervoso paradoxalmente simples, as abelhas representam um atrativo objeto de investigação dos processos básicos de formação e evocação de memórias (Giurfa, 2003). Tais processos têm como base a comunicação neural, e, portanto, os inúmeros parceiros protéicos que participam tanto da via da exocitose quanto da endocitose. Os eventos pré-sinápticos envolvem uma série de etapas como transporte, fosforilação e desfosforilaçao, ancoragem e fusão de vesículas, dos quais fazem parte motores moleculares como a miosina V, proteínas quinases como a CaMKII, e, proteínas de vesículas e de membrana como as SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) (Ungar, 2003).

As proteínas SNAREs são descritas como uma maquinaria protéica envolvida no tráfego intracelular, catalisando a fusão de membranas (Ungar, 2003). A hipótese SNARE, postula que, toda vesícula de transporte contém proteínas específicas em sua superfície (v-Snares); as membranas alvo possuem parceiros protéicos correspondentes (t-Snares), e, proteínas citosólicas (família Séc/Munc e as Rab GTPases) participam da via da exocitose. Tais proteínas ao interagirem entre si conduzem aos eventos de fusão, controlados por uma rede complexa de interações proteínas-proteínas e proteínas-lipídios, permitindo assim a comunicação neuronal (Söllner et al., 1993). Sabe-se que a plasticidade sináptica está diretamente relacionada com a capacidade de aprendizagem, armazenamento e evocação de memórias. O tráfego vesicular em células eucarióticas é essencial para integração regulada de processos celulares diversos que atuam em compartimentos celulares distintos, garantindo sua manutenção.

A neurosecreção é mediada por um tráfego de membranas especializado que inclui a montagem e preenchimento de vesículas secretoras e seu transporte até a zona ativa da membrana. As vesículas sinápticas (VS) são organelas presentes em neurônios, cujo papel é a captação e armazenamento de neurotransmissores (Lin, 1997). No transporte de vesículas, atuam diversos motores moleculares, como as dineínas, cinesinas e miosinas, baseando-se em filamentos de actina e microtúbulos,

que compõem o citoesqueleto, movimentando-se de uma maneira dependente de ATP. Entre eles, destaca-se uma miosina não convencional, a miosina-V, um motor molecular baseado em actina. Convertendo a energia liberada pela hidrólise do ATP em trabalho mecânico, a miosina-V movimenta-se unidirecionalmente na direção mais (+) dos filamentos de actina, atuando no transporte das vesículas sinápticas em terminais nervosos de diversos organismos (Reck-Peterson et al., 2000). Em tecidos neurais a miosina-V foi encontrada em frações enriquecidas de sinaptossomos de cérebro de ratos (Mani et al.,1994). Prekeris & Terrian (1997), trabalhando com vesículas sinápticas isoladas, demonstraram que a miosina-V interage, via domínio cauda, com o complexo sinaptofisina/sinaptobrevina, que são proteínas integrantes da membrana destas vesículas. Posteriormente, foi observada a co-imunoprecipitação da miosina Va com sintaxina, proteína que faz parte zona ativa da membrana plasmática e também, a co-imunoprecipitação da miosina-V com a proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina (CaMKII), ambas proteínas importantes no transporte, ancoragem e fusão de vesículas sinápticas (Costa et al., 1999). Dados demonstrando a interação da miosina-V ao complexo sinaptofisina / sinaptobrevina reforçam seu papel de transporte de vesículas em terminais sinápticos (Ohyama et al., 2001) Outros estudos relacionam a miosina-V com o transporte de vesículas do retículo endoplasmático em axônios do sistema nervoso de lula; em extensões dendríticas de células de Purkinje e em vesículas derivadas do Golgi (Tabb et al., 1998; Takagishi, 1996; Evans et al., 1998; Miller & Sheetz, 2000; Langford, 2002).

Estudos de imunolocalização e imudetecção feitos em cérebro de *A. mellifera*, sondando formas larvais e adultas, mostram que a miosina-V, a DLC, e sinaptotagmina, uma proteína integrante do conjunto protéico SNARE, estão presentes em cérebro de abelha. Sendo que a miosina-V localiza-se preferencialmente nos lobos ópticos e corpos de cogumelo (Passos-Lima,2001: Peixoto, 2002). Em 2002, Silva et al., sondando fração enriquecida em sinaptosomas de cérebro de *A. mellifera*, observaram marcações para miosina-V, miosina-VI, sinaptofisina e clatrina em várias regiões. Porém, as células Kenyon dos corpos de cogumelo foram marcadas somente por miosina-V, sinaptofisina e clatrina. Sugerindo

assim, a associação destas proteínas de vesícula com a miosina-V, em áreas relatadas como centros de integração sensorial.

A CaMKII compreende uma família de enzimas com 28 isoformas similares, derivadas de quatro genes (α, β, γ e δ), a subunidade β é a forma predominante em cérebro (Lisman et al., 2002). Uma vez ativada a CaMKII não apenas fosforila outras proteínas, como também promove autofosforilação, o que lhe confere um tipo de memória molecular para autoregulação e atividade (Braun & Schulman, 1995). Inibidores de CaMKII induzem amnésia em ratos (Tan & Liang, 1996). Camundongos transgênicos knockout para CaMKII apresentam déficits de LTP e memória (Silva et al., 1992a,b), e camundongos com expressão localizada do transgene para CaMKII na camada CA3 do hipocampo apresentam prejuízos de memória (Mayford et al., 1996). Em Xenopus, estudos in vivo evidenciaram que as mudanças na fosforilação da CaMKII estão associadas especificamente com o processamento de estágios distintos de memória, que operam em regiões especificas do cérebro (Zhao et al.,1996). No cérebro da abelha *A. mellifera*, a proteína CaMKII foi purificada e caracterizada em três subunidades α, β e β′ de 52 kDa, 58 kDa e 60 kDa, respectivamente (Altfelder et al., 1991). A análise da expressão de genes de proteínas envolvidas na transdução de sinal mediados por cálcio no cérebro da abelha *A. mellifera*, por meio de hibridização *in situ* com sondas para CaMKII, revela que a CaMKII se expressa preferencialmente nas células Kenyon (neurônios intrínsecos) e corpos de cogumelo, sugerindo assim, que a função do cálcio intracelular na transdução de sinal aumenta a atividade das células Kenyon, em comparação com outros tipos celulares do cérebro de abelha (Kamikouchi et al., 2000).

Os eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória incluem, inicialmente, a ativação de receptores glutamatérgicos e metabotrópicos, e a ativação de cascatas bioquímicas nos neurônios.O seqüênciamento de genes que codificam estes receptores tem revelado que são altamente conservados em insetos (Ultsch et al., 1993, Parmentier et al., 1996, Völkner et al., 2000, GenBank AAP94623) e, a imunoreatividade ao glutamato tem sido detectada em cérebro de insetos, incluindo o da abelha (Bicker, 1999; Bicker et al., 1988; Sinakevitch et al.,

2001). Estudos farmacológicos envolvendo a inibição e posterior estímulo de receptores glutamatérgicos e de NMDA, constataram variações nas memórias de curta e longa duração em abelhas *A. mellifera* (Si et al., 2004). Portanto, em insetos estes dados apóiam a noção de que a transmissão glutamatérgica é parte integrante da memória em abelhas.

Muitos dos substratos da CaMKII já foram identificados, incluindo tubulina, MAP2, proteína tau, sinapsina, caseína, myosin light chains, e miosina V(Reck-Peterson et al., 2000). Portanto, a CaMKII atua na via pré-sináptica e pós-sináptica de uma maneira fundamental em várias etapas, promovendo a liberação das VS ancoradas ao citoesqueleto e ativando por fosforilação a miosina-V. Esta então, liga-se a um parceiro protéico presente na membrana das VS (sinaptobrevina-VAMP), promovendo seu transporte até a zona ativa da membrana no terminal sináptico. Durante esta etapa várias proteínas de membrana de vesícula, citosólicas e de membrana plasmática atuam em um conjunto (SNAREs) (Karcher et al., 2001; Reck-Peterson et al., 2000; Ungar, 2003). Desta forma, a CaMKII, miosina-V e proteínas SNAREs atuando nas várias etapas da via da exocitose juntamente com outros parceiros protéicos, formam um conjunto essencial à comunicação neuronal.

A presença de proteínas associadas ao citoesqueleto, como a miosina V, proteínas que fazem parte da hipótese SNARE (sintaxina, Snap-25, munc18, clatrina e sinaptofisina), e CaMKII, em frações de cérebro de abelha, coelho, rato e pintainho, sugerem que possuem regiões comuns conservadas em vertebrado e invertebrado. Porém, outros estudos serão necessários para determinar se essas proteínas mantêm também conservadas suas funções, e que talvez por isso, compartilhem os princípios básicos comuns ao transporte intracelular, tráfego de membranas e à transdução de sinal mediada por Ca++.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico e Homogeneização

Abelhas zangão, rainha, operária nutridora e operária campeira *Apis mellifera* foram capturadas no Jardim Experimental da Universidade Federal de Uberlândia, e também fornecidas pelo Apiário Girassol, de Uberlândia-MG.

Para dissecação, as abelhas foram anestesiadas com algodão embebido em clorofórmio e, a seguir, fixadas em placa de Petri contendo parafina com o auxílio de alfinetes entomológicos. Uma quantidade de tampão Tris-salina (TBS), suficiente para cobrir o material, foi utilizada para manter o material em condições fisiológicas. O cérebro foi removido com o auxílio de instrumental adequado (pinças e tesoura oftalmológica), previamente esterilizado. As abelhas foram dissecadas no plano sagital mediano e o reconhecimento inicial da estrutura envolvida neste trabalho, foi realizado mediante consulta de trabalhos de SNOODGRAS (1956). Imediatamente após a dissecação, o material foi imerso em nitrogênio líquido e armazenado em microtubos no ultrafreezer à –80º C.

Foram utilizados 10g de cérebro de pintainho, coelho e rato, que foram homogeneizados separadamente, em 50 mL de tampão de extração para cada (Hepes 40 mM pH 7.7, EDTA 10 mM, ATP 5 mM, DTT 2 mM e inibidores de proteases: aprotinina 2.0 μg/mL, PMSF 0.5 mM e benzamidina 1 mM), utilizando um homogeneizador com hélices de inox (Omni mixer 2000). Os passos seguintes foram realizados a 4° C, e o precipitado ressuspenso com o auxílio de um homogeneizador tipo potter com pistilo de vidro. Com o mesmo tampão, 120 cérebros de abelha foram homogeneizados em duas séries de 30 segundos cada, utilizando o homogeneizador Omini-Mixer com microsonda.

O homogeneizado total foi centrifugado a 40.000 g por 40 minutos à 4ºC (Hitachi rotor 27) e o precipitado ressuspenso, em vários passos para a obtenção de S1, P1, S2, P2, P2TX, respectivamente.

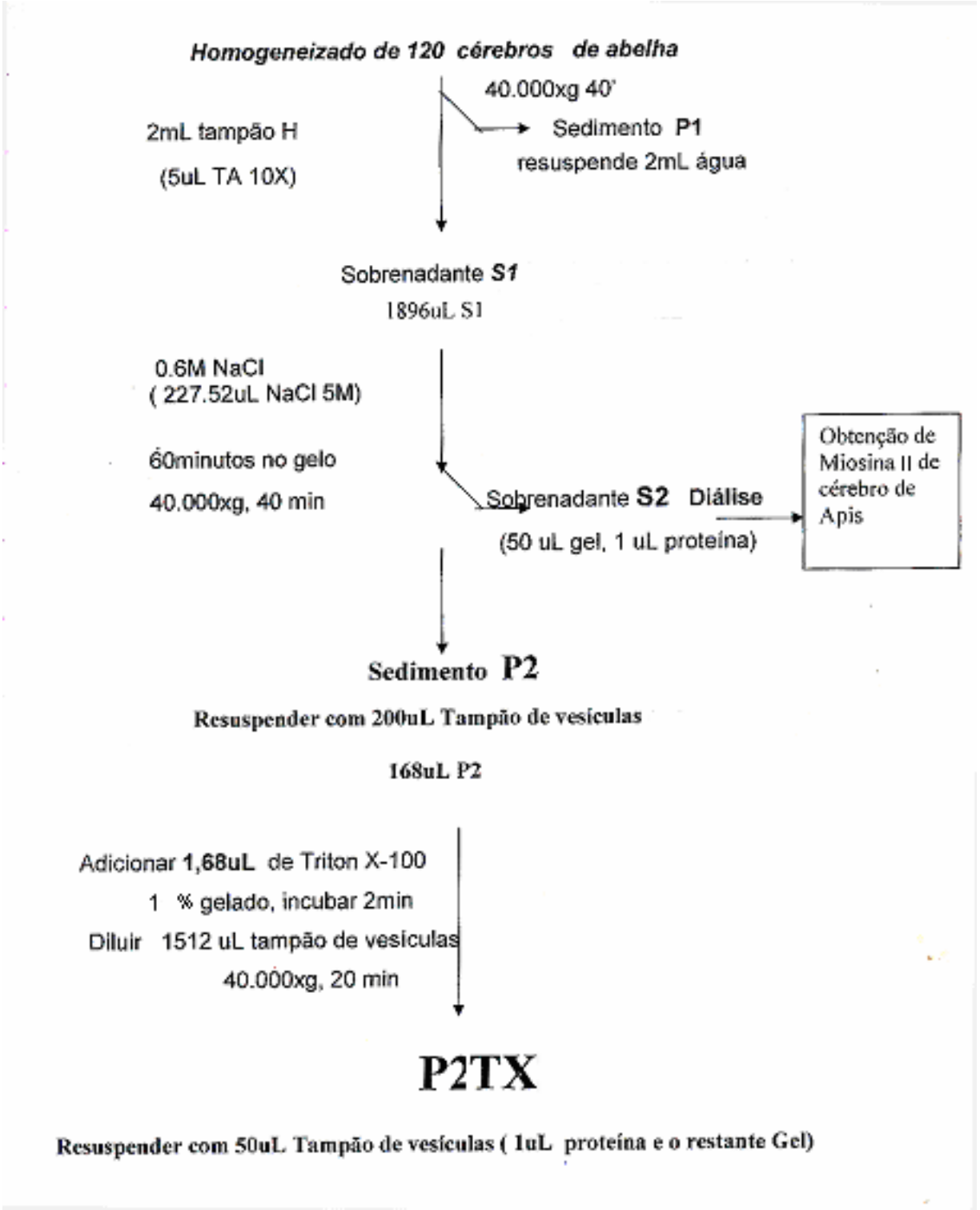
Após as centrifugações, às amostras adicionou-se TA [10X] (SDS 75%, sacarose 20%, β - mercaptoetanol 19%, 11 mM EGTA-K e bromofenol blue 0.25%) na proporção de 100μL de amostra para 10 μL de TA [10X], retirando-se também, 5

μL do homogeneizado para a dosagem de proteína. Essas amostras, por sua vez, foram fervidas a 100°C por 02 minutos e armazenadas a -20°C.

Fração P2TX

A fração P2TX foi obtida pelo protocolo de ensaio de motilidade descrito por Evans e colaboradores (1998) modificado. O volume de sobrenadante (S1) foi mensurado, e a ele adicionada uma solução de NaCl 5 M para a concentração final de 0,6 M. Após 30 minutos em gelo, o S1 foi centrifugado a 40.000 g por 40 minutos. Para cérebro de pintainha, coelho e rato, resuspendeu-se a fração P2 em 8 mL de tampão de vesículas (Hepes 25 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, KCl 50 mM, DTT 2 mM e inibidores de proteases: PMSF 0,5 mM, Aprotinina 2,0 μg/mL e Benzamidina 1 mM). A seguir, incubou-se a fração com 0,1% Triton X-100 gelado por 2 minutos. Diluiu-se esta fração em 9 volumes do tampão de vesícula e centrifugou-se a 40.000 g por 20 minutos. O *pellet* foi então lavado 2 vezes com tampão de vesículas e ressuspenso em 2 mL do mesmo tampão, obtendo-se a fraçâo P2TX.
Para a obtenção de fração enriquecida em vesículas, utilizou-se cérebros de coelho, rato, pintainho e abelha, separando as frações no decorrer das fases de desenvolvimento. Assim, a cada etapa de centrifugação do processo, foram retiradas alíquotas de sobrenadantes (S) e precipitados (P), resultando nas frações H, S1, P1, S2, P2 e P2TX de cada animal. A mesma quantidade de proteína total (20μg/μl) das amostras foi aplicada em SDS-PAGE, coradas com solução de Comassie Blue, ou transferidas para filtro de nitrocelulose por *Western blot*. Obteve-se assim, para cada indivíduo, um filtro de nitrocelulose com todas as frações, que posteriormente foram testadas com anti-miosina-V.

Para cérebro de abelha utilizaram-se volumes reduzidos, sendo 2 mL de homogeneizado, ressuspendendo P2 em 200 μL de tampão de vesículas, adicionando Triton X-100 0,1%, diluindo 10 vezes com tampão de vesículas. Centrifugou-se, em seguida lavou-se e a fração P2TX, que em seguida, foi ressuspensa em 50 μL de tampão de vesículas, como mostrado no esquema que se segue.


Homogeneizado de 120 cérebros de abelha
40.000xg 40'
2mL tampão H
(5uL TA 10X)
Sedimento P1
resuspende 2mL água
Sobrenadante S1
1896uL S1
0.6M NaCl
(227.52uL NaCl 5M)
60minutos no gelo
40.000xg, 40 min
Sobrenadante S2 Diálise
(50 uL gel, 1 uL proteína)
Obtenção de Miosina II de cérebro de Apis
Sedimento P2
Resuspender com 200uL Tampão de vesículas
168uL P2
Adicionar 1,68uL de Triton X-100
1 % gelado, incubar 2min
Diluir 1512 uL tampão de vesículas
40.000xg, 20 min
P2TX
Resuspender com 50uL Tampão de vesículas (1uL proteína e o restante Gel)

Dosagem de proteína e Eletroforese

A concentração de proteína total de cada amostra foi determinada utilizando-se como padrão a concentração protéica de BSA, pelo método BSA-BRADFORD (BRADFORD, 1976). As determinações foram feitas em duplicatas e a absorbância medida a 595 nm. Através de uma curva-padrão de BSA a concentração final de proteína total em μg/μL foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos a partir da curva-padrão, utilizando-se o programa EXCEL (Microsoft Office 2000). Em seguida, as amostras fervidas a 100ºC foram aplicadas em gel de poliacrilamida em condição desnaturante em SDS por eletroforese.

Para eletroforese (SDS-PAGE) utilizou-se o sistema de tampão descontínuo descrito por LAEMMLI & FAVRE (1973), através de géis com gradiente de acrilamida de 5 a 16% no gel de separação e 3% no gel de empilhamento. A eletroforese foi realizada com tampão eletrodo (100 mM Tris, 7.8 mM EDTA, 770 mM glicina, SDS 3% pH 8.3) e corrente constante de 35 mA. Amostras contendo 20 μg/μL de proteínas foram aplicadas em cada gel *lane* e, após a corrida, o gel foi corado em solução corante (Coomassie Brilhant Blue R250 0,125%(m/v), metanol 50% (v/v) e ácido acético 9%(v/v) por 1 hora e descorado em solução descorante (metanol 5%(v/v) e ácido acético 9%(v/v). O padrão de massa molecular relativa (MW) usado, foi adquirido da Sigma, SDS-7B-Sigma: α2 macroglobulina (180 kDa), β-galactosidase de *E. coli* (116 kDa), frutose 6 fosfato (84 kDa), piruvato quinase (58 kDa), fumarase (48.5 kDa), lactato desidrogenase (36.5 kDa) e triosefosfato isomerase (26.6 kDa).

Western blot

As amostras separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em corrente constante de 80 mA *overnight*, utilizando-se tampão eletroblot (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina e metanol 40%(v/v). Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau 0,2% (Ponceau 0.2% em ácido tricloroacético 3%), em seguida, bloqueadas com solução de bloqueio [leite desnatado 5%, TBS acrescido de Tween 20 (TBS-T) e azida sódica 0,03%] por 4 horas, e, foram lavadas em TBS-T, 03 vezes de 05 minutos cada. A seguir, aplicou-se o anticorpo primário diluído em TBS-T e acrescido de azida sódica 0,03%, de 4 a 12 horas, conforme o anticorpo em teste, sob agitação. As membranas foram lavadas em TBS-T, 03 vezes de 05 minutos cada, e incubadas com anticorpo secundário (anti-rabbit ou anti-mouse) conjugado com fosfatase alcalina, diluído em TBS-T de 1 a 4 horas. A reatividade dos anticorpos foi detectada pelo sistema cromogênico NBT/BCIP, segundo o protocolo do fabricante (PROMEGA). Sendo que, em câmara escura, as membranas foram incubadas com solução de detecção por no máximo, 10 minutos.

Anticorpos

O anticorpo anti-miosina-V foi obtido por meio da imunização de coelhos (*Oryctogalus cuniculus*), utilizando como antígeno o domínio cabeça da cadeia pesada da miosina, cuja proteína de fusão foi isolada por SDS-PAGE, seguido por eletroeluição. Este anticorpo foi purificado utilizando-se cromatografia de afinidade, em uma coluna contendo o domínio cabeça expresso em fusão com a proteína ligante de maltose acoplada à Sepharose (Espindola et al., 2000) e foi utilizado na diluição de 1:2000.

O anticorpo monoclonal gerado contra a subunidade α da CaMKII de camundongo (60kDa) foi adquirido do *Tranduction Laboratories* (produto nº c31620, clone 38, Lexington, KY), e, foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante, na diluição de 1:1000.

Os anticorpos monoclonais gerados contra snap25 (25 kDa) (Chapman et al., 1995); munc18 (68kDa) (Hata & Südhof, 1995); e clatrina (180 kDa) (Liu et al., 1995) de lisados de cérebro de rato (produtos S35020, M32320, C43820; clones 20, 31 e 23, respectivamente), foram também adquiridos do *Tranduction Laboratories* (Lexington, KY), e usados na diluição de 1:1000.

O anticorpo monoclonal contra sintaxina de camundongo (35 kDa) (Barnstable, 1988), foi adquirido da *Sigma* (Saint Louis, Missouri, USA), e usado na diluição de 1:1000.

O anticorpo monoclonal anti-sinaptofisina (38kDa) (Johnston & Südhof, 1999) da *Calbiochem* (Horny, ON, Canadá) foi gentilmente cedido pelo laboratório do Prof. Dr. Roy Larson (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), e também utilizado na diluição de 1:1000.

Foram utilizados anticorpos secundários anti-lgG de coelho e de camundongo conjugados com fosfatase alcalina, obtidos da *Promega* (Madison, USA), diluídos 1:7500.

RESULTADOS

IDENTIFICAÇÃO DE SNAREs, MIOSINA-V E CaMKII NO CÉREBRO DE ABELHA

As diferentes castas da abelha *Apis mellifera* foram investigadas para imunodetecção, no sistema nervoso, de proteínas de vesícula sináptica, miosina-V e CaMKII. Estas proteínas foram separadas em SDS-PAGE a partir da fração S1 obtida do homogeneizado de cérebro e transferidas do gel de eletroforese para filtro de nitrocelulose. Estes filtros foram sondados com os anticorpos para estas proteínas e os polipeptídeos do cérebro da abelha operária, rainha e zangão imunoreativos estão mostrados na Figura 1.

Os anticorpos testados contra clatrina, miosina-V e snap-25, apresentaram reatividade acentuada, enquanto que os testes com anti-CaMKII, anti-sinaptofisina, anti-sintaxina e anti-munc-18, mostraram reatividade menos acentuada. As frações S1 de cérebro de abelha sondadas com anti-sintaxina e anti-CaMKII revelaram imunorreatividade mais acentuada para zangão comparado com o teste para rainha, para ambos anticorpos.

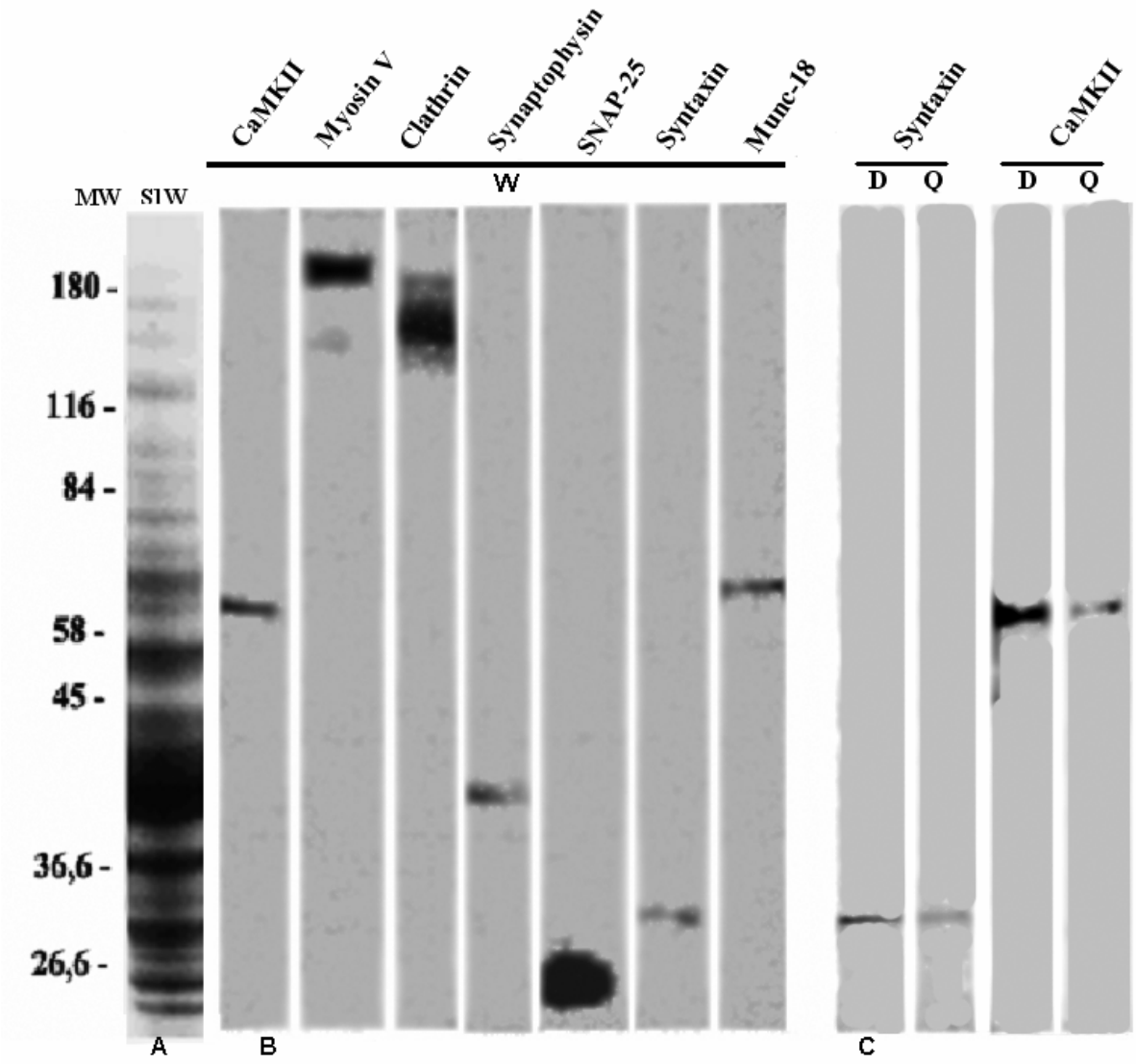


Figura 1: **SNAREs, CaMKII e miosina-V, estão presentes em fração protéica de cérebro de *Apis mellifera***. (A): Perfil eletroforético mostrado através de SDS-PAGE da amostra (20µg/µl de proteína por *lane*) de fração sobrenadante1 de 30 cérebros de abelha operária (SW1), ao lado está indicada a massa molecular relativa (MW). (B): *Immunoblotting* mostrando a reatividade dos polipeptídeos das frações S1W contra os anticorpos das proteínas CaMKII , miosina-V , e proteínas SNAREs (clatrina, sinaptofisina, SNAP-25. sintaxina e mun-18). (C): *Western blot* da fração sobrenadante1 de indivíduo de zangão (D) e de rainha (Q) revelando imunomarcações contra anti-sintaxina e anti-CaMKII.

DETECÇÃO DE MIOSINA-V E CaMKII EM FRAÇÕES DE CÉREBRO DE COELHO, RATO E ABELHA

A fim de analisar se os resultados que mostraram polipeptídios imunoreativos aos anticorpos anti-miosina-V e anti-CaMKII no cérebro de abelha poderiam ser comparados àqueles encontrados em cérebro de mamíferos, utilizou-se preparações semelhantes de homogeneizado total (H) e fração solúvel sobrenadante (S1). Na primeira, cérebros de coelho, rato e abelha foram homogeneizados, obtendo-se a fração H e, após centrifugação a fração S1. As amostras foram submetidas à sondagem com os anticorpos já mencionados, respectivamente. Para miosina-V em fração H, observou-se acentuada reação cruzada com um polipeptídeo de 190 kDa nos cérebros de coelho e rato, e, em abelha, a marcação apresentou-se em banda mais tênue. Portanto, a imunomarcação revelou-se menos intensa nas duas frações testadas para cérebro de abelha quando comparadas com coelho e rato. Comparando as frações de cérebro de abelha com as de coelho e rato, a banda imunomarcada no cérebro da abelha, migrou na mesma posição que a de coelho e rato, correspondente à cadeia pesada da miosina-V. Com relação ao perfil eletroforético, este indica uma concentração relativa semelhante ou até maior para H e S1 de cérebro de abelha. Além disso, os imunoblots mostram bandas marcadas com polipeptídios que migram abaixo da cadeia pesada da miosina-V, correspondentes aos prováveis fragmentos de proteólise durante o processo de preparação das amostras.

O anticorpo anti-CaMKII testado nas mesmas frações, apresentou maior reatividade para a fração H de cérebro de coelho, em relação à fração H dos cérebros de rato e abelha. A análise de CaMKII mostrou a marcação principal de um polipeptídio que migra com uma Mr de 60 kDa, correspondente à sua subunidade alfa. Interessante notar que as bandas estão na mesma posição em H e S1, embora as marcações nas frações S1 de cérebro de rato e abelha tenham sido mais intensas do que em H, e, a fração de cérebro de coelho manteve-se com o mesmo padrão de marcação (Figura 2.I.).

Nos *immunoblottings* de S1, o anticorpo anti-miosina-V se ligou a uma banda única com migração equivalente à massa molecular da cadeia pesada da miosina-V

em SDS-PAGE. Assim como na fração H, em S1 de frações de cérebro de coelho e rato também se observou bandas mais intensas que em cérebro de abelha. Testando a mesma fração (S1) com anti-CaMKII, observaram-se reações cruzadas em duas bandas de cérebro de coelho, sendo uma fraca e outra de maior intensidade, e, em cérebro de rato e abelha, bandas definidas. Estas imunomarcações apareceram de forma linear, na mesma altura, evidenciando o reconhecimento de um polipeptídio de Mr próximo à esperada para proteína alvo, como mostrado na Figura 2.II.

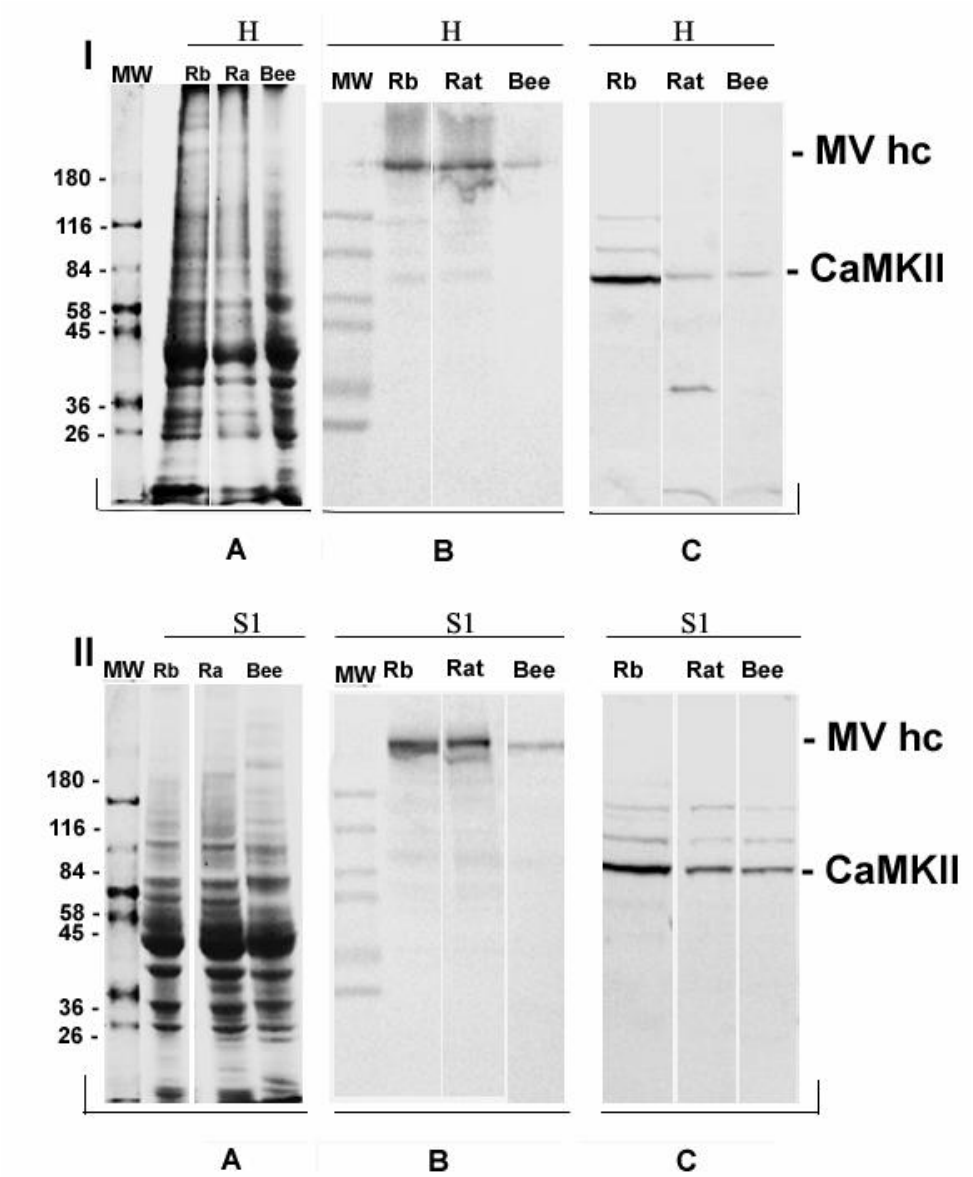


Figura 2: **Detecção de miosina-V e CaMKII em extratos protéicos de cérebro de coelho, rato e abelha**. IA - SDS-PAGE mostrando perfil eletroforético de homogeneizado (H) de cérebro de coelho (Rb), rato (Rat) e abelha (Bee). Massa molecular relativa (MW), padrão 7B-Sigma. IB – *Western blot* da fração H, sondada com o anticorpo anti-miosina V (α head), para os três organismos; IC – Imunoblot mostrando a reatividade do anticorpo anti-CaMKII com a fração H em coelho rato e abelha, respectivamente. IIA – SDS-PAGE da fração sobrenadante 1 (S1) de cérebro de coelho, rato e abelha, nessa ordem. IIB – Imunomarcações em S1 de coelho, rato e abelha para o anticorpo anti-miosina V e a fração mencionada. IIC – *Immunoblotting* da o anticorpo CaMKII (subunidade α) e a fração S1 de coelho, rato e abelha.

IMUNODETECÇÃO de MIOSINA-V EM FRAÇÃO P2TX

Analisando o *imunoblotting* da fração de cérebro de abelha, observaram-se bandas fracas em H, S1 e S2, e praticamente inexistentes em P1, no entanto em P2 e P2TX, a reatividade apareceu sob forma de bandas acentuadas (Figura 3A).

Para cérebro de pintainho, com exceção de S2, a imunomarcação destacou bandas distintas em todas as frações. O *imunoblotting* de amostras de cérebro de coelho apresentou bandas nítidas em todas as amostras, destacando-se em P2 e P2TX que apresentaram intensa marcação. Para cérebro de rato, a reação cruzada apareceu em bandas intensas em todas as frações, apresentando um grau de reatividade maior em P2 e P2TX (Figura 3A).

Portanto, a reatividade entre o anticorpo anti-miosina-V e as frações de cérebro analisadas, apresentou-se em todos os *imunoblottings* sob forma de banda disposta linearmente na mesma altura, indicando o reconhecimento de um polipeptídio de Mr 190 kDa, em comparação com o padrão usado. Observou-se ainda que, em todos os organismos, as frações P2 e P2TX mostraram um grau de reatividade maior em relação às outras frações.

Sondando apenas a fração P2TX de cérebro de abelha com anti-CaMKII, obteve-se como resultado uma marcação bem definida em banda única na posição equivalente à da subunidade α da CaMKII, como mostra a (Figura 3B).

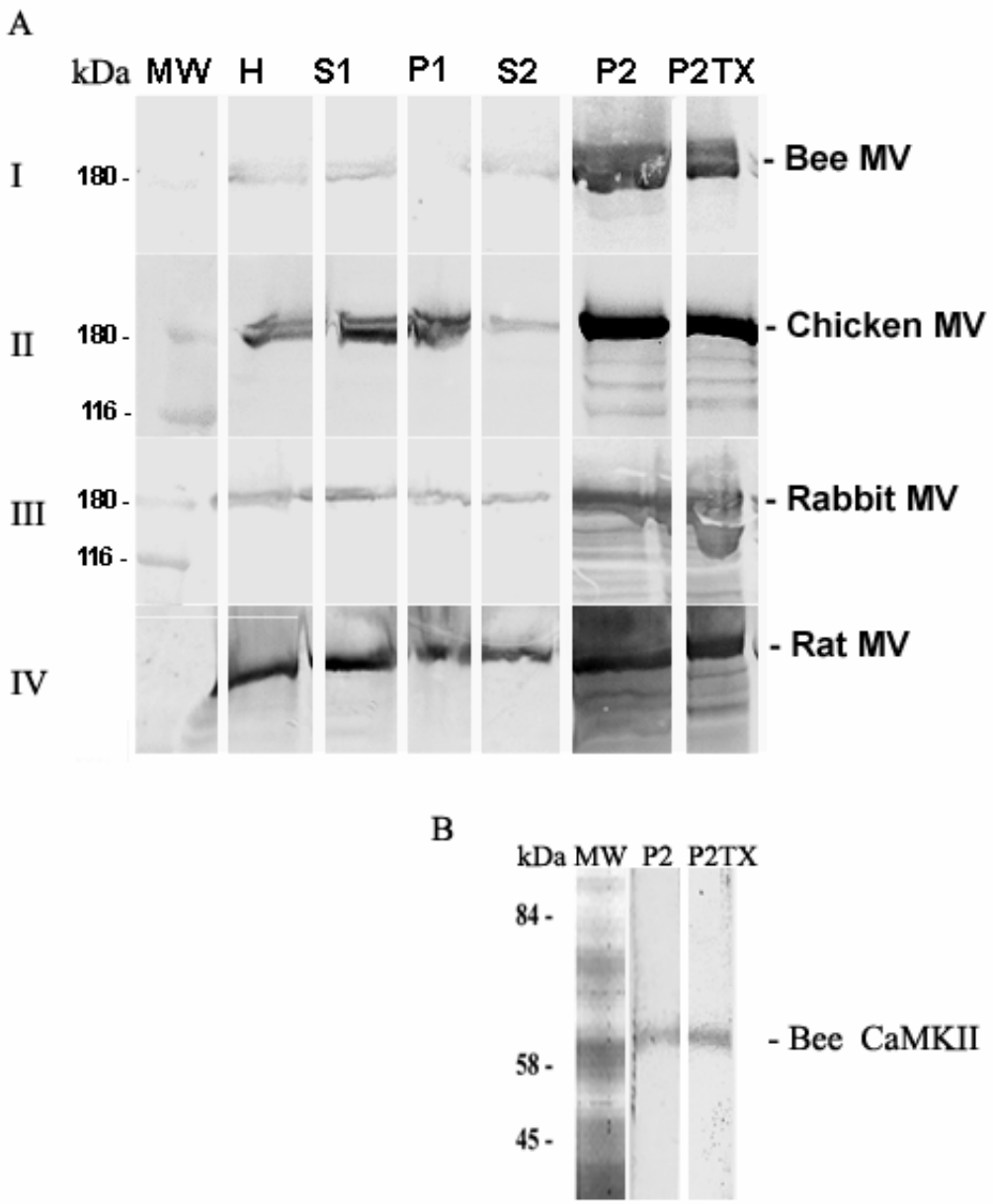


Figura 3: ***Immunoblotting*** **comparando a reatividade das frações de cérebro de abelha (bee), pintainho (chicken), coelho (rabbit) e rato (rat).** IA – *Immunoblotting* das frações homogeneizado (H), sobrenadante 1(S1), sedimentada (P1), das frações S2 e P2 obtidas após incubação de S1 com NaCl 0,6 M, e, da fração sedimentada P2TX obtida após tratamento da fração P2 com Triton X-100, de cérebro de abelha (AI), pintainho (AII), coelho (AIII) e rato (AIV), sondados com anti-miosina-V. B – *Imunoblot* das frações P2 e P2TX de cérebro de abelha testado com anti-CaMKII.

EXPRESSÃO DE MIOSINA-V, CLATRINA E CaMKII NAS REGIÕES DO CÉREBRO DE ABELHA

Frações das regiões do cérebro da abelha *A. mellifera* testadas com o anticorpo anti-clatrina, a reação cruzada mostrou-se em bandas acentuadas no lobos ópticos, ocelos e glândulas hipofaringeais, intensas nos lobos antenais, e fracas nos corpos de cogumelo. Para CaMKII, as imunomarcações apresentaram-se em bandas pouco definidas em todas as regiões, com exceção dos corpos de cogumelo, onde parecem ter melhor reatividade mostrando uma banda mais intensa (Figura 4).

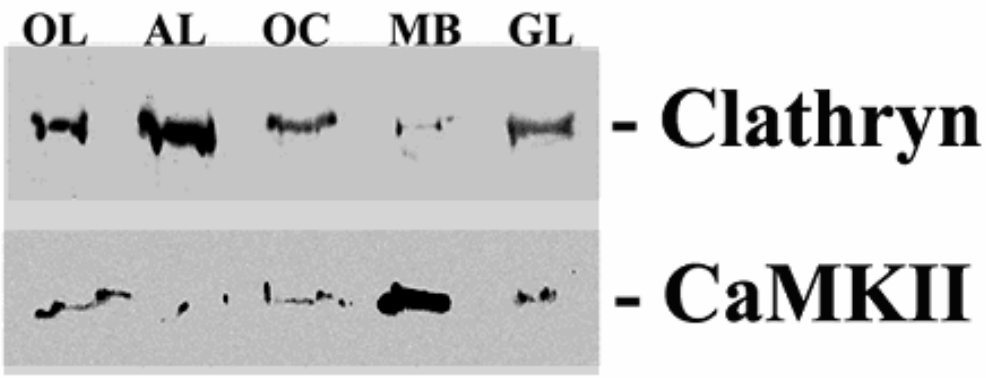


Figura 4**: Comparação da expressão clatrina e CaMKII em frações de regiões de cérebro de Apis mellifera**: *Immunoblotting* de Clatrina e CaMKII nas regiões do lobo óptico(OL), lobo antenal(AL), ocelos(OC), corpos de cogumelo(MB) e glândula(GL), mostrando sua expressão.

DISCUSSÃO

As variações no grau de similaridade existente entre as proteínas investigadas neste estudo indicam que sua expressão em cérebro de abelha e em outros organismos pode ser observada por meio da imunodetecção por *Western blot*. Dados bioquímicos utilizando anticorpos contra miosinas e dineína de vertebrados revelaram a presença destas proteínas motoras no cérebro de abelha. Estes mesmos anticorpos foram eficazes para imunolocalizar a miosina-V nos corpos de cogumelo do cérebro desta abelha (Espindola et al., 2004). Análises de transcritos da *A. mellifera* têm demonstrado a expressão diferencial de diversas proteínas tais como as ribossomais, hexamerinas, enzimas metabólicas, receptor de IP3 e proteína quinase II dependente de Ca2+/calmodulina (CaMKII) (Kamikouchi et al., 2000; Evans & Wheeler, 2001). Estas últimas, preferencialmente encontradas na região do dos corpos de cogumelo de cérebro de abelhas, envolvidas em transdução de sinais. As abelhas com sua capacidade de aprendizagem fornecem um modelo satisfatório para o estudo dos mecanismos básicos de formação de memória (Menzel & Müller, 1996). Os processos de memória e aprendizado na abelha *A. mellifera* envolvem vias de transdução de sinal acopladas com a dinâmica do citoesqueleto e motores moleculares. O presente trabalho mostra que anticorpos são ferramentas eficientes na sondagem de proteínas SNAREs, miosina-V e CaMKII, envolvidas em transdução de sinal e motilidade celular no cérebro da abelha *A. mellifera*.

Essas proteínas estão envolvidas com tráfego celular de vesículas sinápticas e neurotransmissão. O tráfego vesicular em células eucarióticas é essencial para integração regulada de processos celulares diversos que atuam em compartimentos celulares distintos garantindo sua manutenção. Estes mecanismos envolvem uma série de etapas como transporte, fosforilação e desfosforilação, ancoragem e fusão, dos quais fazem parte motores moleculares como a miosina-V, proteínas quinases como a CaMKII, e, proteínas de vesículas e de membrana como as SNAREs (Ungar et al., 2003)

As proteínas chamadas SNAREs fazem parte de uma maquinaria altamente conservada envolvida no tráfego de membranas, estando presentes desde leveduras a vertebrados (Ungar et al., 2003). Entre elas está, munc 18 uma proteína neuronal da família Séc/Munc (SM), substrato da PKC, que interage formando um complexo

com a sintaxina. Séc é a nomenclatura usada para membros da família SM em leveduras, em invertebrados usa-se Unc, e, em vertebrados Munc. Em *Caenorhabtidis elegans e Drosophila melanogaster* suas isoformas apresentam-se como Unc-18 e Unc-13, em mamíferos como munc-18, e, em abelha como Unc-5 (Hata et al., 1993; Dulubova et al., 1999). A isoforma Unc-5 apresenta um grau de similaridade maior com a isoforma presente em *R. novergicus* (35.06 % / 399 aa), do que com *D. melanogaster* (23.55 % / 245 aa) (Tabela 1).

Identificou-se também em S1 de cérebro de abelha, SNAP-25, uma proteína que atua juntamente com a sintaxina na formação dos complexos protéicos SNAREs nos terminais pré-sinapticos (Ungar et al., 2003). O grau de similaridade apresentado pela seqüência em abelha, varia desde 34.59% em levedura, cerca de 67% em ratos e camundongos (*R. novergicus e M. musculus*), até 82.84% em *D. melanogaster*, de (Tabela 1). Uma das mais importantes SNAREs é a proteína de membrana sintaxina, uma proteína conservada, com inúmeras isoformas em muitos organismos, sendo peça fundamental no processo regulado da exocitose. As sondagens em S1 de cérebro de abelha operária, zangão e rainha, mostram que nos dois primeiros, a reatividade ao anticorpo é mais acentuada que em rainha (Figura 1). Em abelha a sintaxina apresenta uma isoforma que possui um grau de similaridade maior com seres humanos e ratos (48%) do que com outros invertebrados (Tabela 1). Outra proteína identificada foi a clatrina, uma proteína que participa da reciclagem de vesículas no processo de endocitose (Brodin et al., 2000). Esta proteína foi previamente identificada juntamente com miosina V e miosina VI em frações de sinaptosomas de cérebro de abelha (Silva et al., 2002). A seqüência presente em abelha para clatrina, apresenta um alto grau de similaridade entre vertebrados e invertebrados, pois em *D. melanogaster* é de 89.81%, em *H. sapiens* e *R. novergicus* é de 84.91%, e, em *C. elegans* 66.45% (Tabela 1). O anticorpo anti-clatrina foi usado na sondagem das frações de regiões do cérebro de abelha, e, observou-se que, apesar da quantidade de proteína aplicada no gel ter sido a mesma, houve uma marcação mais intensa no lobo antenal, isto sugere que clatrina possa ser um alvo interessante para estudos no lobo antenal do cérebro de abelha (Figura 4).

A miosina-V foi detectada e localizada em cérebro de abelhas utilizando-se um anticorpo contra o seu domínio motor. Estudos sobre imunodetecção de miosina V em cérebro de abelha com anticorpo tanto para os domínios cabeça e cauda de miosina-V reconheceram esta proteína em frações de gânglio nervoso e cérebro de duas espécies de abelhas, *Melípona scutellaris e A. mellifera* (Espindola et al., 2004). Os *immunoblottings* dos gânglios cerebrais de 50 pré-pupas de *M. scutellaris* quando dissecados e homogeneizados em tampão de purificação de miosina-Va, revelaram a presença de actina, das miosinas II, V e VI, bem como DIC-74KDa e DLC8/PIN (Peixoto, 2002). Isto sugere que no estágio larval de desenvolvimento das abelhas o gânglio cerebral expressa um amplo repertório de motores moleculares com prováveis implicações para o transporte de vesículas, dinâmica do citoesqueleto e transdução de sinal.

Uma fração microssomal (P2) de vesículas, obtida durante a purificação de miosina-Va de cérebro de pintainho (Cheney et al., 1993) foi também obtida do cérebro de abelha, revelando a imunodetecção de miosina-V. A fração P2 contém miosina-Va associada ao citoesqueleto de actina e também fragmentos de membranas do Golgi, mitocôndria, retículo endoplasmático e membranas de vesículas sinápticas (Evans et al., 1998). O tratamento da fração P2 com detergente Triton X-100 a 0.1% a frio resultou na obtenção de uma fração enriquecida em miosina V e vesículas (P2TX). No estudo de Evans et al. (1998), verificou-se que, quando esse detergente é adicionado à um extrato protéico, resulta na solubilização de componentes insolúveis como o citoesqueleto, e componentes como as proteínas integrais das membranas, e também que, a fração P2TX, estava enriquecida em miosina V cerca de 7 vezes mais que em fração P2 e ainda detectando por *imunoblotting* CaMKII, sintaxina e sinaptotagmina. A preparação de P2TX de pintainho também mostra por meio imunodetecção, a presença de miosina V, miosina-VI e P150 ^{Glued} , sintaxina e sinaptotagmina nos extratos protéicos de cérebro (Evangelista, 2000). Portanto, a preparação de P2TX pode ser um interessante modelo para estudos de propriedades das vesículas sinápticas associadas ao citoesqueleto e à transdução de sinal.

A investigação de miosina-V em frações H (homogeneizado) e S1(sobrenadante 1), de cérebro de coelho, rato e abelha mostrou que, em todas as frações testadas, o anticorpo anti-miosina V reconhece um polipeptídio de 190 kDa com intensidade variada de entre as espécies e frações (Figura 2). Comparando as diferentes frações dos cérebros de coelho, rato, e abelha, verificou-se que essas marcações, apresentam-se mais intensas para as frações do cérebro de coelho e rato do que para cérebro de abelha. Embora o seqüênciamento completo da miosina-V em abelha esteja atualmente em andamento, analisando o grau de similaridade de 46.89% - 204aa para *H. sapiens* registrada para uma seqüência candidata a miosina-V de abelha (Tabela 1), considera-se provável que o anticorpo reconhece porções comuns desta proteína em abelha e vertebrados. As miosinas da classe V são proteínas motoras associadas aos filamentos de actina e estão envolvidas no transporte intracelular de vesículas e organelas. Estas miosinas apresentam uma ampla distribuição filogenética e são apontadas como as primeiras miosinas que surgiram na evolução dos eucariotos (Vale, 2003)

Também, utilizando-se dos anticorpos para domínio cabeça e diferentes domínios da cauda de miosina-V, foi possível mostrar sua expressão em vários tipos celulares de ave, mamíferos e de alguns invertebrados (Langford & Molyneaux, 1998; Hasson et al., 1997; Evans et al., 1997; Espreáfico et al., 1992; Espindola et al., 2000; Suter et al., 2000) . Uma possível caracterização bioquímica da miosina V de cérebro de abelha foi demonstrada através de ensaios de solubilidade na presença de ATP, sua co-sedimentação com actina, sua presença na fração P2 precipitada por alta força iônica a partir do sobrenadante e sua associação com membranas em frações de sinaptossomas, sugerindo que, as propriedades bioquímicas da miosina-V de cérebro de galinha são conservadas em abelha (Passos-Lima, 2001; Peixoto, 2002; Silva et al., 2002, Espindola et al., 2004).

Sondando com anti-miosina-V as frações homogeneizado (H), sobrenadante 1(S1), sedimentada (P1), as frações S2 e P2 obtidas após incubação de S1 com NaCl 0,6 M, e, a fração sedimentada P2TX obtida após tratamento da fração P2 com Triton X-100, de cérebro de abelha, pintainho, coelho e rato, observa-se a reatividade nos *imunoblottings* sob forma de banda disposta linearmente com a mesma

mobilidade eletroforética, indicando o reconhecimento de um polipeptídio de Mr 190 kDa, em comparação com o padrão usado (Figura 3). E ainda, que em todos os organismos, as frações P2 e P2TX mostraram um grau de reatividade maior em relação às outras frações.

Para o anticorpo anti-CaMKII, analisando o *immunoblotting* obtido, observa-se o reconhecimento de um polipeptídio de Mr aproximada de 60 kDa, confirmando dados de que nesta fração, além da miosina V , a CaMKII está presente (Evans et al.,1998). Na fração P2TX de cérebro de rato e de galinha, a miosina-V foi descrita associada a vesículas sinápticas, exercendo um papel de transporte das mesmas, o que sugere que sua atividade seja regulada tanto pelas proteínas ligadas à membrana das vesículas, como pela fosforilação exercida pela CaMKII (Evans et al.,1998; Karcher et al., 2001)

Sabe-se que estes insetos têm um amplo repertório comportamental indicando capacidade de memorização e aprendizado (Giurfa et al.,2003). Por meio da análise dos *immunoblotting* obtidos de CaMKII em fração S1 de cérebro de *A. mellifera* (operária, zangão e rainha), verifica-se o reconhecimento de um polipeptídio de massa relativa de 60 kDa, utilizando o anticorpo monoclonal para a subunidade α da CaMKII de vertebrados. Os *immunoblotting* revelam uma maior marcação de CaMKII em cérebro de operária e zangão e aparecendo com menos intensidade no cérebro de rainha (Figura 1). Utilizando o mesmo anticorpo, na mesma concentração, obtive-se marcações nas frações H e S1 de cérebro de abelha, coelho e rato (Figura2). A CaMKII compreende uma família de enzimas com 28 isoformas similares, derivadas de quatro genes (α, β, γ e δ), a subunidade β é a forma predominante em cérebro (Lisman et al. 2002). Em tecido nervoso de abelha, Altfelder et al., 1991, identificaram duas subunidades β-52 kDa, β'-60 kDa. Assim, o anticorpo de camundongo dirigido contra a subunidade α da CaMKII de abelha, coelho e rato, reconhece seqüências similares em frações protéicas no cérebro desses animais. Esses dados são consistentes com o grau de similaridade apresentado pela seqüência da subunidade α da CaMKII de abelha *A. mellifera* com outros organismos, assim temos, *D. melanogaste*r (86.56% / 439 aa), *M. musculus* (74.18% 426 aa), *H. sapiens* (73.47 % / 426 aa), *R. Norvegicus* (70.23 % / 438 aa), *C.*

Elegans (67.13 % / 425 aa), *S. cerevisiae* (59.23%/412aa), *A. thaliana* (50.80 % / 421 aa*), E.Coli* (36.39%/410aa) (Tabela 1).

Para CaMKII, dados *de immunoblotting* das frações S1 das regiões do cérebro de abelha correspondentes ao lobo óptico, lobo antenal, ocelos, corpos em forma de cogumelo além das glândulas, revelam que sob as mesmas condições para todas as amostras, existe uma marcação mais acentuada nos corpos em forma de cogumelo (Figura 4). Estudo imunohistoquímico no cérebro de abelha *A. mellifera* (Passos-Lima, 2001) utilizando o anticorpo contra o domínio cabeça de miosina-V revelou a imunolocalização de miosina-V em três regiões principais do cérebro da abelha, os corpos em forma de cogumelo, nas células tipo Kenyon, o lobo óptico e o lobo antenal. A miosina V também foi detectada na região da retina dos olhos compostos de abelha *A. mellifera*. A presença de miosina V nestas regiões coincide com a localização de proteínas envolvidas na transdução de sinal (Cammarota et al., 2002) e também com a expressão de receptores para glutamato e acetilcolina (Bliss & Collingridge, 1993). Além disso, os estudos que analisaram a expressão de genes para proteínas envolvidas na transdução de sinal mediados por cálcio no cérebro desta abelha, através do isolamento de fragmentos de cDNA que codificam homólogos de CaMKII e PKC, verificaram por meio de hibridização *in situ*, que a CaMKII se expressava preferencialmente nas células Kenyon (neurônios intrínsecos) e corpos em forma de cogumelo. Assim, a função do cálcio intracelular na transdução de sinal aumentaria a atividade das células Kenyon, em comparação com outros tipos celulares do cérebro de abelha (Kamikouchi et al., 2000). Esses dados abrem perspectivas para estudos futuros sobre o possível envolvimento de miosina-V nos processos de transdução de sinal, comunicação e plasticidade sináptica em regiões específicas do cérebro destes insetos.

Em terminais nervosos de ratos, estudos mostraram que há uma interação intrínseca entre vesículas sinápticas e miosina V (Evans et al.,1998). Interagem também, na mesma região, a sinaptofisina, sinaptobrevina e miosina-V (Prekerris e Terrian, 1997; Ohyama et al., 2001). Estudos revelam a interação entre a sinapsina e CaMKII (Bennett et al., 1993), CaMKII e miosina- V(Costa et al., 1999; Karcher et al., 2001), e, CaMKII e sintaxina, que uma vez fosforilada, libera Munc18 e recruta

Snap-25 e sinaptotagmina (Ohyama et al., 2002). Todos estes mecanismos, além de outros não citados, implicam em uma interação de fundamental importância ao processo regulado de exocitose.

Nossos resultados mostram a presença de proteínas associadas ao citoesqueleto, como a miosina V, proteínas que fazem parte da hipótese SNARE (sintaxina, Snap-25, Munc18, clatrina e sinaptofisina), e CaMKII, em frações de cérebro de abelha, coelho e rato. Utilizando dados que revelam o grau de similaridade da maioria das proteínas em questão de *A. mellifera* em relação a outros organismos, podemos sugerir que em abelhas, estas apresentam moléculas ortólogas, ou seja, com regiões conservadas, visto seu reconhecimento nos *immunoblotting* analisados. Assim, sugere-se que estas proteínas mantenham também conservadas suas funções, e talvez por isso, compartilhem os princípios básicos comuns ao transporte intracelular, tráfego de membranas, e, à transdução de sinal mediada por Ca++. Atualmente, a abelha é alvo de inúmeros estudos, servindo como modelo na determinação dos níveis de complexidade das funções cognitivas, cuja base é a plasticidade neural. No entanto, estamos apenas no ínício do entendimento das complexas variações comportamentais destes notáveis insetos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altfelder, K.; Muller, I.; Menzel, R., 1991. Ca^{2+}/ Calmodulin and Ca^{2+}/ Phospholipid-dependent protein Kinase in the neural tissue of the honeybee *Apis mellifera*. Insect Biochem. Vol. 21, Nº 5, pp. 479-486.

Bennett, M.K.;Scheller, R.H.,1993. The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. Proc Natl Acad Sci USA ,90:2559-2563.

Bicker, G.; Schäfer S.; Ottersen O.P.; Storm-Mathisen J., 1988. Glutamate-like immunoreactivity in identified neuronal populations of insect nervous systems. J Neurosci; 8:2108– 22.

Bicker, G., 1999. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. Microsc Res Tech; 45:174– 83.

Bliss, T.V.P. & Collingridge, G.L,1993. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature, 361:* 31-39.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgr. quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Braun, A. P.;Schulman H.,1995. The Multifunctional Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase: From Form to Function. Annual Review of Physiology. Vol.57:417-445.

Brodin, L.; Löw, P.; Shupliakov, O. 2000. Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. Current Opinion in Neurobiology, 10:312–3200959-4388/00.

Cammarota, M.; Bevilaqua, L. R.M.; Viola, H.; Kerr, D. S.; Reichmann, B.; Teixeira V.; Bulla M.; Izquierdo I.; Medina J.H., 2002. Participation of CaMKII in Neuronal Plasticity and Memory Formation. Cellular and Molecular Neurobiology, Vol. 22, Nº. 3 Review.

Clapham, D.E., 1995. Calcium signaling. Cell 80:259–268.

Cheney, R.E.; O'Shea, M.K.; Heuser, J.E.,;Coelho, M.V.; Wolenski, J.S., 1993a. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. Cell 75:13-23

Costa, M.C.; Mani F.; Santoro, W.; Espreáfico, E.; Larson, R.E., 1999. Brain Myosin-V, a Calmodulin-carrying Myosin, Binds toCalmodulin-dependent Protein Kinase II and Activates Its Kinase. The journal of biological biochemystri Vol. 274, No. 22, pp. 15811–15819.

Dulubova, I.; Sugita, S.; Hill, S.; Hosaka, M.; Fernandez, I.; Südhof, T.C.; Rizo, J., 1999. A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. The EMBO Journal Vol.18, pp. 4372-4382.

Espindola, F.S. Espreáfico, E.M.; Coelho, M.V.; Martins, A.R.; Costa, F.R.; Mooseker, M.S.; Larson R.E.,1992. Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin. J Cell Biol. 118(2):359-68.

Espindola, F.S.; Suter, D.M.; Partata, L.B.; Cao, T.; Wolenski, J.S.; Cheney R.E.; King, S.M.; Mooseker, M.S., 2000.The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN.Cell Motil Cytoskeleton. 47(4):269-81.

Espindola, F.S.; Silva M. F. R.; Santos P. M.; Peixoto, P.M.V.; Santos A.A.D., 2004a. Isolation of synaptosomes from *Apis mellifera* brain and identification of myosins V and VI and clathrin. Bioscience.

Espreáfico, E.M.; Cheney, R.E.; Matteoli M.; Nascimento A.A.; De Camilli P.V.; Larson, R.E.; Mooseker, M.S., 1992.Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. J Cell Biol. 119(6):1541-57.

Evans , L.L.; Hammer, J.; Bridgman, P.C.,1997. Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from dilute-lethal neurons. J. Cell Science 110,439-449.

Evans L. L.; Lee, A. J.; Bridgman, P. C.; Mooseker, M. S., 1998. Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport.Journal of Cell Science 111, 2055-2066.

Evans J.D., Wheeler D.E., 2001.Expression profiles during honeybee caste determination.Genome Biol.2(1):Research0001.

Giurfa, M., 2003. Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. Current Opinion in Neurobiology 2003, 13:726–735

Hanson, P.I.; Schulman, H., 1992. Inhibitory autophosphorylation of multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase analyzed by site-directed mutagenesis.J Biol Chem. 267(24):17216-24.

Hasson, T.; Gillespie, J.A.; Garcia, R.B.; MacDonald, Y. Zhao.; Yee, A.G.; Mooseker M.S.; Corey, D.P., 1997. Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J. Cell Biol.* 137 1287–1307.

Hata, Y., Slaughter, C.A., Sudhof, T.C., 1993. Synaptic vesicle fusion complex contains unc18 homologue bound to syntaxin. Nature 366:347–51

Johnston, P.A.; Südhof, T.C., 1989. The Multisubunit Structure of Synaptophysin. The Journal of Biological Chemistry by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.Vol. 265, Nº. 15, p. 886-946.

Kamikouchi, A.; Takeuchi, H.; Sawata, M.; Ohashi, K.; Natori, S.; Kubo, T., 1998. Preferential expression of the gene for a putative inositol 1,4,5-trisphosphate receptor homologue in the mushroom bodies of the brain of the worker honeybee *Apis mellifera* L.Biochem Biophys Res Commun.;242(1):181-6.

Kamikouchi,.A.; Takeuchi, H.; Sawata, M.; Natori, S.; Kubo, T., 2000. Concentrated expression of Ca2+/ calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in the mushroom bodies of the brain of the honeybee *Apis mellifera* L.J Comp Neurol. 417(4):501-10.

Kamikouchi, A.; Morioka, M.; Kubo, T., 2004. Identification of honeybee antennal protein/ genes expressed in a sex-and/ or caste selective manner. Zoological Science 21:53-62.

Karcher, R. L.; Roland, J. T.; Zappacosta, F.; Huddleston, M. J.; Annan, R. S.; Carr, S. A.; Gelfand, V. I., 2001. Cell Cycle Regulation of Myosin-V byCalcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II.ScienceVol. 293 17.

Laemmli, U.K. & Favre M., 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4 *J. Mol. Biol.* 80: 575-599.

Langford, G.M.; Molyneaux, B.J., 1998.Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects.Brain Res Brain Res. Rev. 28(1-2):1-8. Review.

Langford, G.M., 2002. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. Traffic.3 (12):859-65. Review.

Lin, R. C.; Scheller, R. H., 1997.Structural Organization of the Synaptic Exocytosis Core Complex. Neuron, Vol. 19, 1087–1094.

Lin, R.C.; Scheller, R.H., 2000. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16:19–49.

Lisman, J.; Schulman, H.; Cline, H., 2002.The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. Nat Rev Neurosci. (3):175-90.

Mani, F.; Espreáfico, E.M.; Larson, R.E., 1994. Myosin-V is present in synaptosomes from rat cerebral cortex. Braz J Med Biol Res. (11):2639-43.

Mayford, M.; Bach, M.E.; Huang, Y.Y., 1996. Control of memory formation through regulation of a CaMKII transgene. *Science 274:* 1678-1683.

Menzel, R. & Müller, U., 1996. Learning and memory in honeybees: From behavior to neural substrates. Annu. Rev. Neurosci. 19: 379–404.

Menzel, R., 2001. Searching for the Memory Trace in a Mini-Brain,the Honeybee. Learn Mem, 8:53-62.

Miller, K.E.; Sheetz, M.P., 2000.Characterization of myosin V binding to brain vesicles. J Biol Chem, Issue 4, 2598-2606.

Molyneaux, B.J.; Mulcahey, M.K.; Stafford, P.; Langford, G.M., 2000. Sequence and phylogenetic analysis of squid myosin-V: a vesicle motor in nerve cells. Cell Motil Cytoskeleton. 46(2):108-15.

Müller, U., 2002. Learning in honeybees: from molecules to behaviour .REVIEW. Zoology 105 (2002): 313–320

Ohyama, A.;Komiya, Y.; Igarashi, M., 2001.Globular Tail of Myosin-V is bound to vamp/synaptobrevin. Biochem Biophys Res Commun.2;280(4):988-91.

Ohyama, A.; Hosaka, K.; Komiya, Y.; Akagawa, K.; Yamauchi, E.; Taniguchi, H.; Sasagawa, N.; Kumakura, K.; Mochida, S.; Yamauchi, T.; Igarashi M., 2002. Regulation of exocytosis through Ca2_/ATP-dependent binding of autophosphory lated $Ca2^{+}$/calmodulin-activated protein kinase II to syntaxin 1A. The Journal of Neuroscience. 22(9):3342–3351.

Oleskevich, S.; Clements, J.D.; Srinivasan, M.V.J., 1997. Long-term synaptic plasticity inthe honeybee. J Neurophysiol. 78(1):528-32 .

Parmentier, M.L.; Pin, J.P.; Bockaert, J.; Grau, Y., 1996.Cloning and functional expression of a Drosophila metabotropic glutamate receptor expressed in the embryonic CNS. J Neurosci;16:6687– 94.

Passos-Lima, A. B., (2001) Análise bioquímica e imunohistoquímica de dineína, miosina-V e VI no cérebro das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona Scutellaris*. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG.

Peixoto, P. M.V.; Passos, A. B. L.; Mendes, C. T.; Gonçalves, S. M.; Colleto, A. S.; Pellizon, C. H.; Espreáfico, E. E. M.; Santos, A. A. D.; Espindola, F. S., 2000. Myosin-V identification and localization in nervous tissues of *Apis mellifera* and *Melipona scutellaris*. In: Proceedings of Ithe I International Symposium on Myosin V and II Ibero American Forum on the Cytoskeleton. Paraty –RJ.UNIRIO.

Peixoto, P. M. V., 2002. Localização de miosina-V e cadeia leve de dineína em diferentes regiões do cérebro de *Apis mellifera*. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG.

Prekerris, R.; Terrian, D.M.,1997. Brain Myosin-V is a sinaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca^{++}-dependente interaction with the sinaptobrevin sinaptophisin complex . *J. Cell Biol*.,137: 1589-1601.

Reck-Peterson, S. L.; Provance, W.Jr.; Mercer, J. A.; Mooseker, M.S., 2000. Class V myosins. Biochimica et Biophysica Acta 1496 36-51.Review.

Roesler, J.; Quevedo, J., 2002. Review. Revista de Psiquiatria Clínica, nº 4, vol.25, edição Internet.

Si, A.; Helliwell, P.; Maleszka, R., 2004. Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memoryin the honeybee (*Apis mellifera*). Pharmacology, Bio chemistry and Behavior 77 191–197.

Silva, A.J.; Stevens, C.F.; Tonegawa, S.; Wong, Y.,1992a. Deficient hippocampal long-term potentiation in a-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. Science 257: 201-206.

Silva, A.J.; Paylor, R.; Wehner, J.M.; Tonegawa, S., 1992b. Impaired spatial learning in -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science 257:* 206-210.

Silva, M.F.R.; Calabria, L. K.; Teixeira, R.R.; Santos, A. A. D.; Martins, A. R.; Espíndola, F. S.,2002. Myosin V and VI localization in brain tissue and synaptosomes fractions of honeybee *Apis mellifera*.Molecular Biology of the cell. Vol.13, 457a.

Sinakevitch, I.; Farris, S.M.; Strausfeld, N.J, 2001. Taurine-aspartate and glutamate like immunoreactivity identifies chemically distinct subdivisions of Kenyon cells in the cockroach mushroom body. J Comp Neurol;439:352–67.

Snodgrass, R. E., 1956. Anatomy of the honey bee. Comstock Publishing Associates, New York, 334p.

Söllner, T.; Whiteheart, S.W.; Brunner, M.; Erdjument-Bromage, H.; Geromanos, S.; Tempst, P.; Rothman, J.E., 1993.SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature, 362(6418):318-24.

Südhof, T.C.,1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein–protein interactions. Nature , 375:645-653.

Suter, D.M.; Espindola, F.S.; Lin, C.H.; Forscher, P.; Mooseker, M.S., 2000.Localization of unconventional myosins V and VI in neuronal growth cones. J Neurobiol. 15;42 (3):370-82.

Tabb, J.S.; Molyneux, B.J.; Cohen, D.L; Kuznetsov, S.A.; Langford, G.M., 1998. Transport of ER vesicle on actina filaments in nerurons by myosin V. J. *Cell Sci*. 11:3221-3234.

Takagishi, Y., 1996.The *dilute-letal* (d^l) gene attacks a Ca^{++} store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice**.** Neurosc. Letters, Vol. 215,169-172,

Tan, S.E.;Liang, K.C.,1996. Spatial learning alters hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rats. *Brain Res 711:* 234-240,

Ultsch, A.; Schuster, C.M.; Laube, B.; Betz, H,; Schmitt, B., 1993.Glutamate receptors of *Drosophila melanogaster*. Primary structure of a putative NMDA receptor protein expressed in the head of the adult fly. FEBS Lett;324:171–7.

Ungar, D.; Hughson, F. M., 2003. SNARE Protein Structure and Function. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19:493–517.

Vale, R. D., 2003. The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport. Cell, Vol. 112, 467–480. Cell Press.Review.

Völkner, M.; Lenz-Bohme, B.; Betz, H.; Schmitt, B., 2000. Novel CNS glutamate receptor subunit genes of Drosophila melanogaster. J Neurochem;75:1791– 9.

Wolfman, C.; Fin, C.; Dias, M., 1994. Intrahippocampal or intraamygdala infusion of KN-62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, causes retrograde amnesia in the rat. *Behav Neural Biol 61:* 203-205.

Zhao, L. P.; Koslovsky, J. S.; Reinhard, J.; Bahler, M.; Witt, A. E.; Provance, D. W.; Mercer, J. A., 1996. Cloning and characterzation of myr6, an unconventional myosin of the dilute/myosinV family. Proc. Natl. Acad. Sci.93: 10826-31.

CONCLUSÃO GERAL

- Analisando os resultados obtidos, verifica-se a presença de proteínas associadas ao citoesqueleto, como a miosina-V, proteínas que fazem parte da hipótese SNARE (sintaxina, Snap-25, munc18, clatrina e sinaptofisina), e CaMKII, em frações de cérebro de abelha.

- As frações adicionais de coelho, rato e pintainho, serviram como base para comparações.

- Utilizando dados que revelam o grau de similaridade da maioria das proteínas em questão de *A. mellifera* em relação a outros organismos, pode-se sugerir que em abelhas, estas apresentam moléculas ortólogas, ou seja, com regiões conservadas, visto seu reconhecimento nos *immunoblotting* analisados.

- Assim, sugere-se que estas proteínas mantenham também conservadas suas funções, e talvez por isso, compartilhem os princípios básicos comuns ao transporte intracelular, tráfego de membranas, e, à transdução de sinal mediada por Ca++.