

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

DAVID SANTOS MARCO ANTONIO

**Processos celulares e moleculares no desenvolvimento do
sistema visual em operárias e zangões de
*Apis mellifera***

Ribeirão Preto – SP
2012

DAVID SANTOS MARCO ANTONIO

**Processos celulares e moleculares no desenvolvimento do
sistema visual em operárias e zangões de
*Apis mellifera***

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo como parte dos requisitos para obten-
ção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Klaus H. Hartfelder

Ribeirão Preto – SP
2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Marco Antonio, David Santos

Processos celulares e moleculares no desenvolvimento do sistema visual em operárias e zangões de *Apis mellifera*. Ribeirão Preto, 2012.

80 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Klaus Hartmann Hartfelder.

1. Lóbulo Óptico. 2. Olho Composto. 3. *Apis mellifera*.
4. Genética do Olho. 5. Insetos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

David Santos Marco Antonio

Processos Celulares e Moleculares no Desenvolvimento do Sistema Visual em Operárias e Zangões de *Apis mellifera*

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Genética

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Agradecimentos

- À minha companheira Paola Fernanda Fedatto pela amizade, amor, paciência e suporte que têm sido fundamentais na minha vida.
- Ao professor Klaus Hartfelder pela dedicação, apoio. Pelas discussões científicas e críticas construtivas que foram e são essenciais ao meu desenvolvimento profissional e pessoal. Por ter acreditado no meu potencial.
- À minha família sempre me apoiando.
- Às professoras Zilá Luz Paulino Simões e Márcia M. Gentile Bitondi pelo acolhimento, suporte e amizade.
- À técnica Vani Maria A. Corrêa pela grande ajuda em histologia e pelo acolhimento.
- Ao técnico Luiz Aguiar pela ajuda no apiário.
- Aos pós-graduandos Mônica, Sergio, Carolina e Fernanda pelas discussões na parte de Biologia celular e molecular.
- Aos pós-graduandos Francis e Anete pela disponibilidade e paciência nas análises de bioinformática e real-time.
- Às pós-graduandas Karina Guidugli e Adriana Mendes Nascimento pelas discussões científicas e pela disponibilidade em ajudar.
- Aos pós-graduandos Alexandre Cristino e ao professor Roberto Barchuk, pelas discussões sobre evolução, bioinformática e genômica.
- Às técnicas Vera Lúcia Figueiredo e Marcela A. Bezerra Laure que me orientaram nas dissecções. Ao Pedro P. Prado pela ajuda no servidor
- Aos professores Ademilson Espencer E. Soares, Lionel S. Gonçalves e David de Jong pela ajuda e amizade.
- Às amigas de laboratório Mipsi e Tatiana
- Ao professor Ricardo Ramos e seus alunos pelas discussões sobre o gene *roughest*.
- Aos pós-graduandos Angelika e Hans pelo auxílio e discussões e traduções
- Aos amigos Rogério, Michelle Manfrin, Thiago Francó, Fernanda S., Gesline, Ivan, Umberto, Omar, Rodrigo, Weider, Ana Durvalina, Michelle P., Moysés, Paulo Emílio, Vanessa, Amanda, Tatiana, Liliana, Paulinho e Robertinho pela grande amizade.
- Ao Departamento de Genética e Biologia Celular e Molecular e Bioagentes patogênicos pela infra-estrutura oferecida.
- Agradeço a Deus por tudo.
- Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Resumo

Marco Antonio, D. S. Processos celulares e moleculares no desenvolvimento do sistema visual em operárias e zangões de *Apis mellifera*.

Mecanismos que regem o desenvolvimento do olho composto e lóbulo óptico tem sido amplamente estudados em *Drosophila melanogaster* onde a retina é formada a partir de um disco imaginal anexado com o cérebro e os lóbulos ópticos a partir do primórdio óptico externo. Através de histologia comparativa e análise de expressão gênica no desenvolvimento do sistema visual em *Apis mellifera* nós procuramos elucidar questões sobre plasticidade do desenvolvimento subjacente a fortes diferenças sexo- e casta-específico no olho assim como contribuir com aspectos evo-devo. O desenvolvimento dos lóbulos ópticos ocorre por dobramento neuroepitelial a partir de um centro de diferenciação no cérebro larval. Deste centro, a medula, lamina e lóbula surgem ao mesmo tempo em operárias e zangões. Dois passos marcam a diferenciação da lâmina (i) sua origem a partir da diferenciação de neuroblastos da camada mais externa da medula, isso coincidindo com o primeiro pico de expressão de *roughest*, e (ii) 24 horas mais tarde o aparecimento dos omatídeos hexagonais coincidindo com o segundo pico de expressão de *roughest*. Com a inclusão de genes candidatos relacionados com o desenvolvimento do olho e lóbulos ópticos em insetos [*small optic lobe (sol)*, *eyes absent (eya)*, *minibrain (mnb)*, *sine oculis (so)*, *embryonic lethal*, *abnormal vision (elav)* e *epidermal growth factor receptor (egfr)*] nós encontramos distintos picos de expressão para *sol*, *eya*, *mnb* e *so* em níveis de transcritos e tempo de aparição do pico diferindo entre operárias e zangões. Enquanto estes quatro genes mostraram relativa sincronia durante o desenvolvimento em zangões, o mesmo não ocorreu em operárias. Além disso, em operárias *sol* é muito mais expresso na pré-pupa do que em zangões. Ambos os sexo mostraram padrões muito similares de expressão de *elav*, exceto por um atraso em zangões. Em contraste, a expressão de *egfr* ocorre antes em zangões. Durante a fase chave no desenvolvimento do sistema visual, uma análise global do transcriptoma, por meio de micro-arranjos mostrou vários genes relacionados com ciclo celular entre os diferencialmente expressos. Em conclusão, a relação entre tempo e eventos morfológicos com os padrões de expressão gênica revelou diferenças possivelmente relacionadas com mecanismos subjacentes ao desenvolvimento do sistema visual altamente dimórfico de *Apis mellifera*.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, olho composto, lóbulo óptico, zangão, expressão gênica diferencial.

Abstract

Marco Antonio, D. S. Molecular and cellular processes during visual system development in workers and drones of *Apis mellifera*.

Developmental mechanisms governing compound eye development in insects have been broadly studied in *Drosophila melanogaster*, where the retina is formed from an imaginal disc attached to the larval brain. However little is known about eye development in other insects, most of which do not have such imaginal eye discs. Through a comparative histological and gene expression analysis of eye development in the honey bee, *Apis mellifera*, we intended to elucidate questions about developmental plasticity underlying the marked sex and caste-specific differences in eye size, as well as to contribute to evo-devo aspects. Optic lobe development occurs by neuroepithelial folding initiating from a differentiation center in the larval brain. From this center, the medula, lamina and lobula arise at the same time in drones and workers. Two steps mark the differentiation of the lamina (i) its origin from neuroblasts differentiating in the outer layer of the medula, this coinciding with the first peak of *roughest* expression during the feeding stage of the fifth larval instar, and (ii) 24 hours later, the appearance of hexagonal ommatidia, coinciding with a second peak in *roughest* expression. Upon including further candidate genes related to insect eye development [*small optic lobe (sol)*, *eyes absent (eya)*, *minibrain (mnb)*, *sine oculis (so)*, *embryonic lethal*, *abnormal vision (elav)* and *epidermal growth factor receptor (egfr)*] we found distinct expression peaks for *sol*, *eya*, *mnb* and *so*, with timing and relative transcript levels differing between drones and workers. Whereas these four genes showed a relatively synchronous pattern of expression in drones in the fifth larval instar, this was not so in workers. Furthermore, in prepupae *sol* was higher expressed in workers than the other three genes, and also in comparison to drones. Both sexes showed a strikingly similar expression pattern for *elav*, except for some delay in drones. In contrast, *egfr* expression was found to occur earlier in drones. Through a global transcriptom analysis, done at a key step of larval development, several genes were revealed as differentially expressed, many of these regulating cell cycle steps. In conclusion, the relationship in the timing of morphological events with gene expression patterns revealed differences possibly related to mechanisms underlying development of the highly dimorphic compound eye in the honey bee.

Key words: *Apis mellifera*, compound eye, optic lobe, drone, differential gene expression.

Sumário

Introdução	9
A abelha <i>Apis mellifera</i>	9
Desenvolvimento e ciclo de vida	10
Determinação de castas	11
O genoma de <i>Apis mellifera</i>	13
Genética do desenvolvimento do sistema visual	14
Desenvolvimento do sistema visual: Análise por PCR em tempo real.....	15
Objetivos.....	17
Objetivos Específicos:	17
Material e Métodos	18
Abelhas	18
Produção e classificação de zangões	18
Análise histológica	22
Extração de RNA do lóbulo óptico e cérebro.....	22
Síntese da primeira fita de cDNA.....	23
Métodos computacionais.....	24
Sistema operacional, linguagens de programação e programas	24
Base de dados de sequencias gênicas	25
Construção da tabela de proteínas associadas ao termo Gene Ontology “Eye Development”	25
Busca da região promotora de genes associados ao termo “Eye Development” GO.....	25
Análise <u>in silico</u> dos genes candidatos	26
Anotação dos genes candidatos e desenho de primers	26
Normalização dos perfis de cDNA.....	27
Reação em cadeia da polimerase (PCR semi-quantitativo).....	28

PCR quantitativa (Real Time – PCR)	28
Extração e preparo de RNA para micro-arranjos	29
Síntese de aRNA (Amino Allyl RNA)	30
Integridade do RNA para microArray	32
Preparo e hibridação das lâminas de microArray	32
Análise Estatística de dados do MicroArray.....	33
Resultados	34
Análise do desenvolvimento através de cortes seriais.	34
Perfil de transcrição de genes candidatos para o desenvolvimento diferencial do lóbulo óptico	41
Perfil transcricional de genes chaves no desenvolvimento	46
Predição de genes participantes do desenvolvimento dos lóbulos ópticos e retina.....	49
Análise da expressão diferencial do genoma de <i>Apis mellifera</i> por meio de micro-arranjos	50
Análise de Enriquecimento de dados do microarray	53
Análise computacional das regiões reguladoras dos genes diferencialmente expressos.....	60
Discussão	64
O centro de diferenciação	65
A lóbula e a medula	66
A lâmina e a retina	67
Aspectos moleculares durante a fase de tecelagem de casulo.....	70
Conclusões.....	72
Referências bibliográficas.....	73
Anexos.....	80

Introdução

A abelha *Apis mellifera*

Sociedades avançadas de insetos são caracterizadas pela sobreposição de gerações, onde descendentes (membros da casta operária) permanecem no ninho e contribuem para o sucesso reprodutivo de seus parentes (casta reprodutiva) ao custo de sua própria reprodução (Winston, 1987). O parente materno (rainha) é altamente adaptado para produção e postura de ovos. A rainha é, usualmente, maior e possui sobrevida de até dois anos enquanto as outras castas vivem bem menos.

Apis mellifera possui uma combinação de características e cooperação social de forma raramente vista no reino animal. É uma vasta fonte de estudos devido aos vários níveis de adaptação que expressa enriquecido pelos benefícios econômicos que traz. A abelha melífera tem sido objeto de estudo de diferentes perspectivas como as de: apicultores, biólogos, ecologistas, estudiosos de comportamento e médicos interessados em reações alérgicas, e todos contribuíram imensamente para o entendimento da biologia deste inseto (Snodgrass, 1956).

Dentro do ninho pode-se ter uma idéia do porque este inseto tem fascinado o homem durante tanto tempo. A infra-estrutura do ninho, primorosamente uniforme e funcional, é composta por cera e própolis produzida pelas operárias e construída por série uniforme de células hexagonais. O favo serve de substrato para as mais diversas interações entre os membros, a cria, estocagem de alimento e centro de mensagem. Em relação às atividades da colônia, ele provê rico cenário de interações sociais e divisão de trabalho tanto em relação às castas como em relação a cada indivíduo (Winston, 1987).

Abelhas melíferas possuem três tipos de membros na colônia: rainhas, operárias e zangões, cada um com suas próprias especializações e lugar na sociedade das abelhas. Uma única rainha na colônia reina sobre o ninho, cercada de operárias do qual ela recebe rica alimentação necessária para desenvolver suas atividades. Seu corpo alongado esconde um ovário superdesenvolvido o qual a transforma em extraordinária máquina de oviposição, capaz de botar milhares de ovos em um só dia. O comportamento calmo da rainha contrasta com seus poderosos feromônios, sinais químicos que agem nas operárias e controlam alguns dos seus comportamentos e provê parte das características sociais das abelhas (Winston, 1987).

Outro membro desta sociedade são os zangões, zelados e alimentados pelas operárias apesar de possuírem apenas uma função: reprodução, na qual eles morrem logo em seguida. Para tanto eles possuem uma maquinaria especialmente adaptada para isso: olhos grandes,

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

