Universidade de São Paulo

Ribeirão Preto

Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Dissertação de Mestrado

**PROCESSOS CELULARES NO DESENVOLVIMENTO DO
OLHO COMPOSTO DE *APIS MELLIFERA***

Aluno: David Santos Marco Antonio

Orientador: Klaus Hartmann Hartfelder

Ribeirão Preto – abril de 2008

Universidade de São Paulo

Ribeirão Preto

Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Dissertação de Mestrado

**PROCESSOS CELULARES NO DESENVOLVIMENTO DO
OLHO COMPOSTO DE *APIS MELLIFERA***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Klaus H. Hartfelder

Ribeirão Preto – abril de 2008

Agradecimentos

- Agradeço a Deus por tudo.
- À minha família pelo apoio, dedicação e por todo o amor.
- Ao professor Klaus Hartfelder pela dedicação, apoio. Pelas discussões científicas e críticas construtivas que foram e são essenciais ao meu desenvolvimento profissional e pessoal.
- À minha companheira Paola Fernanda Fedatto pela amizade, amor, paciência e suporte que têm sido fundamentais na minha vida.
- 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 e Sergio 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.
- Aos técnicos Adelino Penatti e Jairo de Souza por compartilhar toda experiência em apicultura.
- 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 e genômica.
- Às técnicas Vera Lúcia Figueiredo e Marcela A. Bezerra Laure que me orientaram nas dissecções. Ao Pedro P. Prado pela ajuda na parte computacional.
- Aos professores Ademilson Espencer E. Soares, Lionel S. Gonçalves e David de Jong pela ajuda e amizade.
- Às amigas de laboratório Fernanda e Mipsi

- Ao professor Ricardo Ramos e seus alunos pelas discussões sobre o gene *roughest*.
- Aos pós-graduandos Angelika e Hans pelo auxílio e discussões.
- Aos amigos Rogério, Michelle Manfrin, Thiago Francó, Fernanda S., Gesline, Ivan, Umberto, Omar, Rodrigo, Weider, Ana Durvalina, Michelle P., Moysés, Paulo Emílio, Ana Paulo, Marina, 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.
- À CAPES e FAEPA pelo auxílio financeiro.

RESUMO

PROCESSOS CELULARES NO DESENVOLVIMENTO DO OLHO COMPOSTO DE *APIS MELLIFERA*

Os processos que regem o desenvolvimento dos olhos compostos em insetos têm sido amplamente estudados em *Drosophila melanogaster* onde estes se originam a partir de discos imaginais. Pouco se sabe, porém, sobre o desenvolvimento do lóbulo óptico e da retina em outros insetos que, na sua grande maioria, não possuem discos imaginais de olhos separados do sistema nervoso central. Neste sentido, a análise comparada do desenvolvimento dos olhos de *Apis mellifera* pode contribuir não somente para aspectos evo-devo entre as grandes famílias dos insetos holometábolos, quanto pode elucidar questões de plasticidade de desenvolvimento pois os olhos compostos apresentam fortes características sexo e casta-específicas.

Com o objetivo primário de elucidar os padrões de divisão e diferenciação celular durante o desenvolvimento do olho em *A. mellifera* realizamos análises histológicas e de imunomarcação durante o desenvolvimento pós-embrionário, juntamente com análise de expressão do gene *roughest* em tempo real. Para imunomarcação utilizamos o anticorpo anti-fosfo-histona H3 fosforilada que marca células em fase M do ciclo celular. Foram analisadas larvas operárias entre o terceiro instar larval (L3) até pupas de olho branco, rosa e marrom, com foco sobre o quinto instar larval que fica subdividida em fase de alimentação e crescimento (L5F), fases de tecelagem de casulo (L5S) e pre-pupa (PP).

O desenvolvimento do lóbulo óptico em *Apis mellifera* ocorre por dobramento neuroepitelial, a partir de um centro de diferenciação, sequencialmente gerando as camadas neurais do lóbulo óptico (lóbula, medula e lâmina). A lâmina (última a surgir)

apresentou-se com desenvolvimento mais lento e em duas fases antes da metamorfose: a primeira fase é o seu surgimento no começo do quinto instar larval acompanhando o primeiro pico de expressão de *roughest* e a segunda fase ocorre durante a tecelagem de casulo com o desenvolvimento do córtex acompanhando o segundo pico de expressão de *roughest*. Ainda durante o segundo pico de expressão de *roughest* os rabdômeros da retina começam a ficar visíveis, assim como os feixes axonais. Estes porém estarão completamente formados somente após a metamorfose..

O desenvolvimento completo da lâmina, lóbula e medula e da retina ocorre somente após a metamorfose. Durante a fase pupal as estruturas do lóbulo óptico estão prontas, porém na retina observa-se ainda gradual pigmentação, encurtamento dos feixes axonais e alongamento dos rabdômeros até atingirem o seu comprimento final logo antes da emergência.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, *roughest*, olho composto, lóbulo óptico, retina.

ABSTRACT

CELULAR PROCESSES DURING COMPOUND EYE DEVELOPMENT OF *APIS MELLIFERA*

The processes that drive compound eye development in insects have been broadly studied in *Drosophila melanogaster* in which they arise from imaginal discs. Little is known about optic lobe and retina development in other insects, most of which do not have imaginal eye discs attached to the nervous system. For this reason, a comparative analysis of eye development in the honey bee, *Apis mellifera*, not only contributes to evo-devo aspects comparing the major families of holometabolous insects, but also may elucidate questions about developmental plasticity because the compound eyes of the honeybee show strong sex and caste-specific differences.

Since our primary objective was to elucidate the pattern of cellular differentiation and division during eye development we performed histological and immunolabelling analyses during the postembryonic stages of development, concomitant with a real-time analysis of *roughest* gene expression. For the immunolabelling experiments we used an anti-phospho-histone H3 antibody that labels cells in M phase. We analyzed eye development in worker larvae starting with the third instar until white, pink and brown-eyed pupae, paying special attention to the fifth instar which was subdivided into feeding phase (L5F), cocoon spinning phase (L5S) and prepupae (PP).

Optic Lobe development in *Apis mellifera* occurs by neuroepithelial folding initiating from a differentiation center, in the larval brain. This center sequentially produces the neural layers of the optic lobe (medulla, lobula and lamina). Development of the lamina, which is the last layer to be formed, takes more time and happens in two steps before metamorphosis. The first step is emergence at the beginning of the fifth larval instar coinciding with the first peak of *roughest* gene expression. The second step

occurs during the cocoon spinning phase and is marked by its inner differentiation, again accompanied by a second peak of *roughest* expression. During this second peak of *roughest* expression the rabdomers in the retina become visible. These, however, complete their development only during the pupal stage.

The development of the lamina, lobula and medulla is not complete until after metamorphosis, even though these optic lobe structures are structurally defined already at the beginning of the pupal phase. Retinal development in this phase is marked by gradual pigmentation, axonal bundle shortening and rabdomer elongation, which reach their final size just prior to emergence of the bees from their brood cells.

Key words: *Apis mellifera*, *roughest*, *compound eye*, *optic lobe*, *retina*.

1 – INTRODUÇÃO.....	11
1.1 - O olho composto.....	13
1.1.1 - O olho composto de <i>Apis mellifera</i> e o seu desenvolvimento.....	14
1.1.2 - O desenvolvimento dos olhos compostos em insetos - <i>Drosophila melanogaster</i> e <i>Manduca sexta</i> como modelos	16
1.2 – O gene <i>roughest</i>	20
2. - OBJETIVOS	21
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 - Abelhas.....	22
3.2 - Imunodeteção de células em mitose (imunofluorescência)	23
3.3 - Análise Histológica.....	23
3.4 - Extração de RNA do lóbulo óptico e cérebro	24
3.5 - Síntese da primeira fita de cDNA e PCR	25
3.6 – Análise <i>in silico</i> do gene <i>roughest</i>	26
3.6.1 - Anotação do gene <i>roughest</i> e desenho de primers.....	26
3.7 - Normalização dos perfis de cDNA	27
3.8 - Reação em cadeia da polimerase (PCR semi-quantitativo).....	27
3.9 - PCR quantitativa (Real Time – PCR)	29
3.10 – Clonagem e sequenciamento parcial do gene <i>roughest</i> de <i>Apis mellifera</i>	30
3.10.1 - Preparo das células quimiocompetentes.....	30
3.10.2 – Transformação das células competentes e clonagem.....	30
3.10.3 – Sequenciamento.....	31
4 - RESULTADOS	33
4.1 - Desenvolvimento do lóbulo óptico e do olho	33
4.2 - O gene <i>roughest</i>	42
4.2.1. Análises <i>in silico</i> do ortólogo <i>roughest</i> de <i>Apis mellifera</i>	42
4.3 - Análises por RT-PCR do gene <i>roughest</i>	44
4.3.1 - Análises por RT-PCR semi-quantitativa	44
4.3.2 - Análises por RT-PCR quantitativa do gene <i>roughest</i>	48
5 – DISCUSSÃO.....	50
5.1 – Desenvolvimento do Lóbulo Óptico	50
5.2 -Desenvolvimento da Retina	52
5.3 – Aspectos moleculares do desenvolvimento do sistema visual - a proteína <i>Roughest</i>	54

6 – CONCLUSÕES.....	57
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 – Introdução

Abelhas melíferas tem sido objeto de grande interesse por parte do homem há centenas de anos. Não apenas pela fonte de mel, mas também pela notável divisão de trabalho pelas diferentes castas que compõem uma colônia (Hartfelder & Engels, 1998). *Apis mellifera* é um raro exemplo de inseto manejado (embora não domesticado) e há muitos anos utilizado para obtenção de cera, mel, própolis e pólen e, na agricultura, como importante polinizador. Têm grande capacidade de aprendizado associativo e formação de memória baseado em informações olfativas e visuais (Menzel, 2001) o que o torna um intrigante modelo para pesquisas em neurobiologia e etologia.

As abelhas do gênero *Apis* (ordem Hymenoptera) são caracterizadas como insetos eussociais devido às interações entre cria e adulto e sua tremenda habilidade de regular suas funções como uma colônia de indivíduos de acordo com eventos dentro e fora do ninho. Tais relações expressam aspectos únicos da sociedade das abelhas (Winston, 1987). Uma das características é a presença de castas fenotipicamente distintas o que garante uma alta eficiência na divisão de trabalhos dentro da colônia. Além dos dois fenótipos do sexo feminino há também o sexo masculino, denominado zangão que há pouca participação nas atividades da colônia, pois tem como função quase única o acasalamento com as novas rainhas durante o vôo de acasalamento.

A determinação e a diferenciação destes três fenótipos inicia-se na fase embrionária quando inicia a cascata de expressão gênica ligada à determinação de sexo. A determinação do sexo é baseada em um sistema de haplo-diploidia. A rainha põe ovos nos alvéolos dos favos e estes ovos quando fertilizados originarão fêmeas e quando não fertilizados geram zangões por partenogênese arrenótoca. A determinação de sexo inicia com o gene *complementary sex determiner* (*csd*) recentemente descrito e funcionalmente caracterizado (Beye et al., 2003). Este gene ocupa a posição de entrada na cascata gênica de determinação de sexo que influencia sobre a expressão de isoformas alternativas do gene *doublesex* (*dsx*) anotado no recentemente sequenciado genoma de *Apis mellifera* (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>), e que por sua vez regulam o padrão de expressão de genes estruturais ligados a processos de diferenciação sexo-específico durante as fases larvais e na metamorfose.

Igual a qualquer inseto holometábola *Apis mellifera* passa por três fases pós-embrionárias: larva, pupa e adulto. Ao completar a embriogênese dentro de aproximadamente três dias eclode uma larva que passa por cinco estágios larvais antes de entrar em metamorfose. Na metamorfose o inseto atinge sua forma adulta. Durante os quatro

primeiros estágios larvais o peso corporal e diâmetro da cápsula cefálica aumenta marcadamente. Estes estágios são percorridos em torno de 90 horas após eclosão do ovo. O quinto estágio larval é mais longo e, convencionalmente, é subdividido em 9 subfases marcados por eventos claramente distintos (Rachinsky et al., 1990). São estes: fases de alimentação (LF1-3), fases de tecelagem de casulo (LS1-3) e fases pré-pupais (PP1-3) caracterizadas pela gradual apólise e aparecimento de constrição entre o tórax e o abdômem. O período pupal é subdividido em sete fases. Olhos vão gradualmente adquirindo pigmentação durante as quatro primeiras fases seguido por gradual pigmentação do corpo nas três fases finais atingindo o seu grau máximo logo antes da eclosão do adulto (Michelette & Soares, 1993; Nelson, 1924; Myser, 1954). O desenvolvimento larval e pupal é regido pelo sistema endócrino e tem sido bem caracterizado nestes aspectos para as castas do sexo feminino (Rachinsky et al., 1990).

A determinação das castas em *Apis mellifera* é baseada em um sistema trofogênico, isto é, a qualidade e quantidade de alimento que uma larva do sexo feminino recebe das operárias determina o seu desenvolvimento em rainha ou operária. Este programa de alimentação diferencial resulta em uma resposta distinta do sistema endócrino (Hartfelder e Engels, 1998) que tem como consequência o desenvolvimento casta-específico dos órgãos internos, especialmente dos ovários (Schmidt-Capella e Hartfelder, 1998, 2002), e das estruturas externas.

Durante o desenvolvimento pós-embriônico das castas de *Apis mellifera* observa-se diferenças nos títulos de hormônio juvenil e de ecdisteróides (Hartfelder & Engels, 1998). Tais hormônios atuam em associação com neurohormônios e proteínas receptoras para regular a transcrição de genes alvos o que resulta em respostas coordenadas tecido-específicas (Evans & Wheeler, 2000; Cristino et al., 2006; Barchuk et al., 2007). A influência de hormônio juvenil no desenvolvimento do olho foi evidenciada pela má formação induzida pelo tratamento com análogos do mesmo hormônio (Zdarek & Haragim, 1974; Rembold, 1976).

Na mariposa *Manduca sexta* o final da neurogênese do gânglio óptico externo (medula e lâmina) foi correlacionado com o aumento de ecdisteróides pupais. Aplicação de análogo de hormônio juvenil antes da ocorrência do pico de aumento pupal suprime o desenvolvimento do gânglio óptico externo (Monsma & Booker, 1996 b). Tais resultados evidenciam a importância dos títulos hormonais no desenvolvimento das diversas estruturas.

1.1 - O olho composto

A natureza repetitiva da arquitetura do olho composto, com grande número de omatídeos, separa os olhos compostos de todos os outros tipos de olhos encontrados no reino animal. Os mecanismos atuantes no desenvolvimento do olho composto podem ser divididos em três categorias: os que estabelecem o mosaico omatideal, os que determinam a arquitetura do omatídeo e aqueles que modificam o *design* do omatídeo de acordo com a posição no olho. Tais mecanismos são a chave para a grande adaptabilidade do olho composto (Nilsson e Kelber, 2007).

Provavelmente esses mecanismos estão presentes em diversos outros táxons. Insetos e crustáceos possuem omatídios similares com pequeno número de células constantes em cada grupo (Harzsch *et al.* 2005). Entre miriápodos e caranguejos as principais diferenças são células maiores e de número variado. Fora do grupo dos artrópodes os olhos compostos são raros com apenas alguns casos entre mexilhões e poliquetas.

Entre os Artrópodes, olhos compostos existem em xiphosuras, alguns centípodas, diplópodos, insetos e crustáceos. Com mais de 250 milhões de anos os trilobitas são os primeiros animais conhecidos a possuírem olhos compostos (Clarkson *et al.* 2006). Pouco se sabe dos trilobitas a respeito das estruturas embaixo da cutícula não possibilitando servir como boa base de comparação, porém possuem olhos compostos com padrão convencional de facetas de lentes externas de forma parecida com os insetos modernos. Alguns trilobitas mais recentes possuíam facetas extremamente mais largas com espaços entre elas indicando resolução espacial em cada omatídeo (Clarkson *et al.* 2006). Uma arquitetura semelhante pode ser visto em quelicerados como os olhos secundários em aranhas os quais podem ser considerados derivados de omatídeos de olho composto de ancestrais marinhos (Harzsch *et al.* 2005). É intrigante que quelicerados mudaram para omatídeos tipo câmera os quais são raros em insetos e crustáceos.

Os números de omatídeos em crustáceos e os olhos compostos em insetos possuem características únicas. Há uma grande variedade de tipos de células altamente específicas, mas um número fixo e pequeno de cada tipo (Paulus, 2000). Um plano básico de duas células pigmentares primárias, quatro células cone e oito receptores se aplicam em ambos: crustáceos e insetos. A ocorrência de outros números de receptores não é incomum e há alguns grupos taxonômicos com números diferentes de células cone, porém dentro de cada espécie o número é constante. Ainda há outros tipos de células

pigmentares que variam em número e tipo entre os diferentes grupos de insetos e crustáceos. Entre insetos e crustáceos o omatídeo difere principalmente pela constituição de duas células distais no omatídeo (Nilsson e Kelber, 2007).

1.1.1 - O olho composto de *Apis mellifera* e o seu desenvolvimento

Por ser uma estrutura de suma importância na vida adulta dos insetos holometábolos o olho das abelhas tem sido estudado em grande detalhe quanto às funções do sistema visual (Autrum e Zwehl 1964; Menzel e Mercer, 1987; Lehrer, 1994). O olho composto em operária de *Apis mellifera* possui cerca de 5000 omatídeos (Ribi *et al.* 1989) e são cobertos externamente por uma cutícula córnea. Os omatídeos situam-se juntos na retina, mas são separados e opticamente isolados por células pigmentares intervenientes. Os omatídeos se afinam e convergem em direção à camada externa do lóbulo óptico. A superfície da córnea é diferenciada em facetas hexagonais correspondentes aos terminais externos do omatídeo. As margens estreitas das facetas são opacas, porém em áreas centrais são transparentes e constituem as lentes dos omatídeos. A superfície do olho composto é coberta com cerdas não ramificadas surgindo das margens das facetas (Snodgrass, 1956).

Em seção vertical de um omatídeo a lente é vista como sendo um prisma alongado apenas levemente convexo nas superfícies externa e interna. Logo abaixo da lente está o cone cristalino, tão longo quanto à lente, com o ápice diretamente para dentro. O cone é formado por quatro células na qual o citoplasma converteu-se em substância hialina transparente em ordem de transmitir a luz das lentes. As células cones são envolvidas por duas células córneas pigmentares. Nos estágios imaturos dos insetos as células cone secretam nova lente a cada muda. Estas células, nos insetos com olhos compostos, migram para perto do cone e secretam a nova lente em cada muda.

Um fascículo de oito, em alguns casos nove, células delgadas proximal ao cone constitui a parte sensível à luz do omatídeo as quais juntas constituem a retínula. As células da retínula são as células ópticas sensíveis; seus terminais internos produzem nervos retinais que penetram à membrana basal do olho e se estendem até o lobo óptico. No eixo da retínula está o longo rabdômero formado pelas superfícies internas opostas das células retinais. Todo o omatídeo é envolvido por células pigmentares (Snodgrass, 1956; Varela e Porter, 1969; Eisen e Youssef, 1980).

Boa parte dos estudos têm sido realizados sobre o olho composto das operárias, devido a sua grande importância nos processos de forrageamento, enquanto os olhos dos zangões e da rainha têm recebido atenção bem menor (Myser, 1954; Eisen e Youssef, 1980; Snodgrass, 1956). A grande diferença em tamanho dos olhos é um fato reconhecido de longa data (Ribi *et al.*, 1989). Uma operária tem cerca de 4000 a 5000 omatídeos em cada olho de acordo com o número de facetas. Já um zangão chega a ter entre 7000 a 8000 omatídeos. Análises comparadas do olho composto de rainhas, operárias e zangões revelaram também distribuição característica dos omatídeos de diâmetro maior e menor dentro do olho (Ribi *et al.*, 1989). A prevalência de omatídeos de diâmetro menor - e, portanto de resolução espacial maior - no lado superior dos olhos grandes dos zangões - supostamente está relacionada à fixação da rainha dentro da área de congregação durante o vôo nupcial (Praagh *et al.*, 1980).

Surge, portanto a questão de como estas diferenças estruturais nos olhos compostos entre rainhas, operárias e zangões são estabelecidas durante o desenvolvimento pós-embrionário. Trata-se de processos de regulação sexo e casta-específicos que, portanto, envolvem tanto fatores genéticos (relacionados à determinação e diferenciação dos sexos) quanto nutricionais/endócrinos (relacionados à determinação e diferenciação das castas). Visto desta forma, os processos controladores do desenvolvimento do olho de abelhas são de grande interesse para programas de biologia do desenvolvimento direcionados e elucidar a interação de controle gênico e meio ambiente em plasticidade de desenvolvimento (West-Eberhard, 2003).

O desenvolvimento dos olhos compostos surge de um espessamento da ectoderme que recobre a superfície dos lóbulos ópticos da larva. De acordo com Phillips (1905) em uma larva recém eclodida, ainda não há células diferenciadas que formarão o olho. Os primórdios das células visuais permanecem indiferenciados até o terceiro instar larval, apesar do primórdio de olho ser visível nas laterais da cabeça (Phillips, 1905). Percorrendo a beira distal do primórdio do olho (estágios L1 e L2) as extremidades das células formam microvilosidades na superfície. Durante o terceiro e quarto estágios larvais ocorre a formação de agrupamentos pré-omatidiais. A formação dos agrupamentos progride da região posterior do olho para a anterior. No final da vida larval as células de tais grupos sofrem um rearranjo e se diferenciam em células da retina e acessórias (Eisen e Youssef, 1980). Os terminais internos destas células enviam processos nervosos para dentro dos lóbulos ópticos. Mais tarde as células da retina retiram-se da cutícula e células ao redor as circundam para formar as lentes pela conversão do citoplasma em

uma substância hialina. No final do estágio pupal o omatídio está formado (Snodgrass, 1956; Varela e Porter, 1969; Eisen e Youssef, 1980).

Seqüências similares têm sido observadas na formação de pré-omatídios em vários outros insetos. Aparentemente a formação de grupos precursores de omatídeos ocorre através de mecanismos parecidos em insetos holometábolos e hemimetábolos (Meinertzhagen, 1993). Uma vez que a formação de grupos ocorreu, as células pré-omatídias sofrem uma notável seqüência de mudanças morfológicas. Assim a morfogênese deve ocorrer como uma seqüência precisamente ordenada de eventos. Tal processo ordenado é exibido durante o desenvolvimento do olho composto em *A. mellifera* onde um epitélio não diferenciado sofre transformação gradual e se torna um arranjo de omatídeos hexagonais idênticos.

Enquanto se tem, desta forma, uma descrição razoavelmente detalhada do desenvolvimento do olho composto de *Apis mellifera*, principalmente pelo trabalho de Eisen e Youssef (1980), pouco se sabe sobre os processos moleculares e celulares e da sua integração com os processos de crescimento larval e a metamorfose que resultam na expressão de fenótipos de olhos tão divergentes entre os sexos e castas.

1.1.2 - O desenvolvimento dos olhos compostos em insetos - *Drosophila melanogaster* e *Manduca sexta* como modelos

Em *Drosophila*, o desenvolvimento do olho se dá através do disco imaginal associado ao sistema nervoso central e que contém uma parte que dará origem ao olho e outro que dará origem à antena (Campos-Ortega e Hartenstein, 1997). No início da vida larval, o disco consiste de uma monocamada de epitélio colunar. Células indiferenciadas proliferam sem padrão aparente. No final do segundo instar o epitélio do olho está regionalizado em domínios ventral e dorsal e a linha intermediária é sinalizada definindo o local onde se iniciará o sulco morfogenético. Este começa na margem posterior do campo do olho como resultado de precisa sinalização celular. O sulco varre todo o epitélio ocular no período de dois dias e deixa uma nova coluna de células precursoras omatídicas precisamente espaçadas (Ready *et al.*, 1976; Hsiung e Moses, 2002). Portanto, o padrão de formação dos omatídeos no disco imaginal envolve a progressão desta onda linear, o sulco morfogenético (Fig. 1).

A progressão do sulco requer um sinal difusível, a secreção da proteína Hedgehog, dos fotoreceptores previamente diferenciados. Pela indução do arranjo linear de

células em sofrer mitoses sincronizadas este sinal propõe o sulco morfogenético e resulta na expressão de fatores de transcrição (Treisman e Heberlein, 1998). Através de preciso sistema de sinalização molecular a expressão torna-se restrita a grupos de células que estarão destinados a se tornarem fotoreceptores e células do omatídeo (Hafen *et al.*, 1994). Assim, os padrões de formação celular no olho de *Drosophila* envolvem um complexo arranjo de sistemas de sinalização, os quais incluem agentes que promovem mitose e inibem ou promovem diferenciação celular (Stenkamp e Cameron, 2002).

Em *Drosophila* quase todas as estruturas adultas (exceto o sistema nervoso central, o intestino médio e as gônadas) desenvolvem a partir de discos imaginais e histoblastos abdominais, o que representa uma condição extremamente derivada quando comparado aos outros insetos holometábolos (Truman e Riddiford, 1999). Embora que o desenvolvimento do olho composto de *Drosophila* tem sido estudado em grande detalhe pode não ser o melhor modelo para entender o desenvolvimento do olho das abelhas melíferas, e que o desenvolvimento do olho no lepidóptero *Manduca sexta* se aproxima mais a estas.

Em *Manduca* o olho adulto surge de um pequeno grupo de células epiteliais na cápsula da cabeça da larva, o campo morfogenético, que se assemelha a um disco imaginal (Monsma e Booker, 1996; Allee *et al.*, 2006) - porém não constitui um disco imaginal em termos conceituais, pois as células respondem a ecdisteróides desde o primeiro instar larval. No início do último instar larval da mariposa já é possível distinguir células do primórdio de olho adulto, de aparência colunar, das células epiteliais adjacentes, de aparência cuboidal, e pela posição perto dos *stemmata* larvais. Logo após a ecdise para o último instar larval a lâmina de células epidérmicas no primórdio de olho se destaca da cutícula e dobra-se para dentro. Isto causa a formação de uma crista espessa no local do campo morfogenético (Allee *et al.*, 2006). Este está firmemente aderido a uma cutícula que cobre a superfície apical. Na superfície basal encontra-se uma difusa e fina rede de traquéias e a hemolinfa do sistema circulatório aberto.

Figura 1. Modelo de desenvolvimento do olho composto em *Drosophila melanogaster*. **A)** Esquema de um omatídeo em corte longitudinal com suas células componentes. Corte apical evidencia as células pigmentares, da cerda e célula cone. No corte mais basal é possível visualizar os oito receptores que formam o rabdômero. **B)** Esquema do processo de diferenciação dos omatídeos através do sulco morfogenético progressivo durante seis estágios do desenvolvimento. O sulco percorre o disco imaginal na direção pósterio-anterior onde os clusters são recrutados e sofrem diferenciação com o tempo. Adaptado de Wolff e Ready (1993) e Octacílio-Silva (2008).

Assim que o campo morfogenético começa a aumentar um sulco aparece no decorrer do eixo dorso-ventral. Duas zonas estreitas de células pré-mitóticas surgem ante-

riormente e posteriormente ao sulco. Surpreendentemente este é um padrão de atividade mitótica similar ao visto em *Drosophila*, no qual o sulco dorso-ventral percorre o disco imaginal com dispersa atividade mitótica anterior ao sulco e uma estreita banda de atividade mitótica sincronizada posterior a ele (Ready *et al.*, 1976; Monsma e Booker, 1996). O sulco e as duas zonas de atividade mitótica migram na direção anterior através do epitélio do olho pupal produzido pelo campo morfogenético. Posterior ao sulco as células se conformam em arranjos hexagonais e estes agrupamentos parecem ser os precursores da retina e células associadas.

O controle endócrino sobre a formação do olho em *Manduca* foi abordado em dois trabalhos que mostram que ecdisteróides tem papel fundamental na proliferação celular no lobo óptico (Champlin e Truman, 1998a) durante a metamorfose o que corresponde à variação do título deste hormônio na hemolinfa (Warren e Gilbert, 1986). Associado ao este programa hormonal da metamorfose foi observado uma diminuição na expressão do gene *broad* (*complexo Broad*) no epitélio do disco do olho (Allee *et al.*, 2006). Hormônio juvenil aparentemente não afeta o desenvolvimento deste epitélio nas fases larvais iniciais, mas foi observado de reprimir o desenvolvimento do disco quando explantes do epitélio do último instar larval foram cultivados *in vitro* (Allee *et al.*, 2006).

Desde que o estado nutricional é um aspecto importante na iniciação da metamorfose em insetos analisou-se também o papel deste fator no desenvolvimento do disco do olho de *Manduca sexta*. Notou-se que o estado alimentar está relacionado ao perfil temporal da expressão de *broad* o que constitui um evento de reprogramação do desenvolvimento larval para pupal. Porém, o fato que o hormônio juvenil não exerce o mesmo papel na diferenciação do disco do olho quando comparado a epiderme do qual é derivado - sugere que outros fatores podem estar envolvidos no controle do crescimento e diferenciação do disco do olho.

Nota-se que os modelos conceituais sobre o controle dos eventos da metamorfose têm passado por uma modificação com o foco recente sobre as vias de sinalização de insulina e a sua integração com o sistema endócrino clássico (Colombani *et al.*, 2005; Mirth *et al.* 2005). De ponto de vista do desenvolvimento do olho nas abelhas tais considerações sobre o papel do estado nutricional são de suma importância uma vez que a alimentação diferencial das larvas é o fator indutor da diferenciação das castas.

1.2 – O gene *roughest*

O loco *roughest-irregular chiasm C* (*rst-irreC*) é um importante componente do sistema de sinalização durante o desenvolvimento do olho. Este gene codifica uma proteína necessária para a projeção correta das fibras visuais no quiasma óptico do gânglio óptico em *Drosophila* e correta organização e diferenciação omatidial (Boschert *et al*, 1990; Wolff e Ready, 1991; Ramos *et al*, 1993; Schneider *et al*, 1995; Reiter *et al*, 1996). Em *Drosophila*, a proteína Roughest apresenta cinco domínios extracelulares do tipo imunoglobulina, os quais apresentam similaridade com domínios de diferentes proteínas de vertebrados. Na porção intracelular há uma região rica em glutaminas formando o domínio “opa-like” relacionado, em humanos, com importantes doenças neurodegenerativas como Huntington e Kennedy (Machado *et al*, 2002).

A expressão desta proteína é essencial para o alinhamento das células interomáticas que antecede a onda de apoptose no início da vida pupal. A perda desta função *rst-irreC* acarreta em quase total falha do programa de morte celular em remover células supérfluas que desorganizam a retina, as quais se diferenciam em células pigmentares dando ao olho uma aparência de “rugoso” (Wolff e Ready, 1991). Portanto, alelos mutantes do *locus roughest* afetam o sistema visual tanto na formação do olho composto como no desenvolvimento do lobo óptico (Boschert *et al*, 1990; Ramos *et al*, 1993; Reiter *et al*, 1996; Araújo *et al*, 2003).

2. - Objetivos

O objetivo primário do projeto é elucidar os padrões de divisão e diferenciação celular durante o desenvolvimento do olho em operárias de *A. mellifera*. A descrição detalhada de eventos celulares servirá, futuramente, como padrão para análises comparativas em zangões e rainhas, abordando questões de plasticidade no desenvolvimento dos olhos de abelhas.

Um segundo objetivo é de iniciar análises sobre vias de sinalização no desenvolvimento do olho. Uma vez que as vias de sinalização no desenvolvimento do disco imaginal do olho têm sido delineados em grande detalhe em *Drosophila*, e que se encontra agora a informação genômica disponível para *Apis mellifera*, será possível identificar genes candidatos para estudos moleculares aprofundados. Um dos candidatos é o loco *roughest* cuja função em *Drosophila* e que se mostrou de suma importância no delineamento correto dos omatídeos.

Portanto definimos como objetivos específicos do trabalho:

- 1 - Descrever o processo de formação do campo morfogenético no início da vida larval em operárias, por métodos histológicos convencionais.
- 2 - Determinar os padrões de proliferação celular através de marcador da fase M do ciclo mitótico e relacioná-los com eventos endócrinos já conhecidos
- 3 - Anotar o ortólogo do gene *roughest* de *Drosophila melanogaster* no genoma de *Apis mellifera* e estudar a sua expressão no desenvolvimento de olho de abelhas.

3 - Material e Métodos

3.1 - Abelhas

No presente trabalho foram utilizadas abelhas operárias da espécie *Apis mellifera* de diferentes estágios do desenvolvimento obtidas por métodos convencionais de apicultura no Apiário Experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP).

As larvas de diferentes fases de desenvolvimento pós-embrionário (L₃, L₄, L₅F₁, L₅F₂, L₅F₃, L₅S₁, L₅S₂, L₅S₃, PP₁, PP₂, PP₃, pupa de olho branco, rosa e marrom foram coletadas em favos selecionados utilizando-se pinças e colocando-as em placa de Petri contendo papel filtro umedecido. Em seguida, as larvas foram classificadas baseando-se no seu peso, tamanho da cápsula cefálica e morfologia (Michelette & Soares, 1993; Myser, 1954; Nelson, 1924; Winston, 1987). Como critério de seleção para a fase de tecelagem de casulo (Spinning S) observou-se a gradual esvaziamento do conteúdo intestinal em larvas em células recentemente operculadas. Para a pré-pupa observou-se a segmentação da cabeça e tórax, o alargamento dos olhos, o progresso da apólise, a visualização do intestino e a reabsorção do líquido exuvial (Tab 1). As pupas foram classificadas de acordo com a pigmentação do olho, tórax e abdômem. Após o reconhecimento da fase as larvas e pupas foram imediatamente dissecadas e fixadas.

Tabela 1. Fases do desenvolvimento larval de operárias de *Apis mellifera* (Michelette & Soares, 1993)

Fase		Sigla	Características (Operária)
L3			Peso 1,5 – 4,45 mg
L4			4,8 – 24,8 mg
L5	F (alimentação) – célula aberta	F1	27 – 41 mg
		F2	54 – 90 mg
		F3	107 – 115 mg
	S (spinning) – tece- lagem do casulo	S1	Intestino cheio
		S2	Intestino metade vazio
		S3	Intestino completamente vazio
	Pré-Pupa	PP1 PP2 PP3	Medida Tíbio-Tarsal 1,2 – 1,44 mm 1,8 – 2,0 mm cutícula opaca

3.2 - Imunodeteção de células em mitose (imunofluorescência)

Larvas de operárias foram dissecadas em salina Ringer (NaCl 80mM, KCl 5mM e CaCl 2H₂O 2mM) e tiveram os cérebros removidos. Os mesmos foram fixados em paraformaldeído 4% diluído em PBS (100mM; pH 7,4; NaCl 0,9%) *overnight* à 4°C. Em seguida foram colocados em PBS (100mM; pH 7,4; NaCl 0,9%) 3 vezes de 5 minutos cada para lavagem. Após a lavagem o material foi permeabilizado em PBS (100mM; pH 7,4; NaCl 0,9%) contendo 2% Triton X-100 por 1 hora à temperatura ambiente, e novamente lavados em PBS duas vezes por 5 minutos cada.

Os cérebros e lóbulos ópticos foram incubados em solução PBS-BSA (100mM; pH 7,4; NaCl 0,9%; contendo 1% BSA) por 1 hora à temperatura ambiente para o bloqueio de sítios inespecíficos. Logo após o material foi lavado duas vezes em PBS e incubados com anticorpo anti-histona 3 fosforilada (H3) (Upstate) 10µg/ml em PBS-BSA *overnight* à 4°C. As amostras foram lavadas 3 vezes de 5 minutos cada em PBS e incubadas no escuro com anticorpo secundário IgG anti-rabbit conjugado com Cy3 (Sigma) 1:100 em PBS-BSA por 4 horas à temperatura ambiente.

Antes da montagem das lâminas em glicerol e n-propilgalato (glicerol 90%; n-propilgalato 3%; PBS 100mM) o cérebro e lóbulos ópticos foram lavados três vezes de 15 minutos cada em PBS e mantidos no escuro. Em seguida as lâminas foram analisadas em microscopia lasers confocal – Sistema Leica TCS-SP2 (Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos).

3.3 - Análise Histológica

Após a classificação da fase do desenvolvimento as larvas e pupas tiveram a cápsula cefálica removida em salina Ringer e esta foi rapidamente colocada em solução fixadora Bouin (ácido pícrico saturado, formol (35%) e ácido acético na proporção de 15:5:1, respectivamente) por 4 horas em temperatura ambiente ou 4°C *overnight*. A remoção do fixador foi realizada em 3 lavagens de 30 minutos cada em PBS (100mM, 0,9% NaCl, pH 7,4) ou até que o ácido pícrico em excesso fosse retirado. A desidratação era realizada em bateria crescente de etanol: 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%. Cada passo durou 10 minutos e o último passo foi repetido duas vezes.

Para a diafanização, os lóbulos ópticos foram colocados em solução 1:1 de benzol e etanol por 15 minutos seguido de benzol absoluto três vezes de 15 minutos cada. Logo em seguida o material foi colocado em parafina derretida (62°) e após 1 hora foi

transferido para nova solução de parafina derretida pelo mesmo período. Após o material ter passado por vácuo em parafina derretida por 30 minutos, os blocos foram montados em forma laminada. Cortes seriais de 8µm foram montadas em lâminas pré-tratadas com poli-lisina (20% diluída em água destilada, imersão de 10 minutos e secagem a 60°C).

Para desparafinização as lâminas com os cortes foram colocadas em estufa a 80°C por 20 minutos, seguidos de três banhos sucessivos de xilol de 5 minutos cada e série decrescente de etanol 100%, 90%, 80%, 70%, 50% com 5 minutos cada. Os cortes foram mantidos em banho com água corrente por 10 minutos e a coloração foi realizada com hematoxilina e eosina por 2 minutos cada intercalado com um banho de água destilada. Os cortes foram rapidamente desidratados em etanol 90%, 95% e duas vezes em etanol 100% e levados para solução xilol/etanol 1:1 (5 minutos de duração em cada passo) seguidos por três banhos de xilol e finalmente montagem da lamínula com Entellan (Merck).

As lâminas foram analisadas em microscópio invertido Axiovert 35 (Zeiss) e as fotos obtidos em microscópio Olympus BX50 com câmera Nikon DX1200. O programa utilizado foi ACT-1 (Nikon V 2.63).

3.4 - Extração de RNA do lóbulo óptico e cérebro

Para a extração de RNA seguiu-se o protocolo de TRIzol (Invitrogen) para pequenas quantidades. Diferentes quantidades de lóbulos ópticos foram usadas dependendo da fase de desenvolvimento segundo tabela 2. Para cada fase do desenvolvimento foram realizadas extrações em triplicatas para maior representabilidade dos dados.

Os lóbulos ópticos dissecados em salina Ringer gelado foram rapidamente colocados em tubos Eppendorf (1,5 mL) contendo 500 µL de TRIzol e estocados em freezer -70°C.

As amostras estocadas a -70°C foram deixadas à temperatura ambiente por 5 min e homogeneizadas por aspiração repetida em seringas estéreis. Em seguida adicionou-se 200µL de clorofórmio e os tubos foram vigorosamente agitados por 15 segundos e novamente deixados por 3 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C e a fase superior foi transferida para novo tubo contendo 400µL de isopropanol com 5µg de glicogênio. Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas (12.000g, 4°C), o sobrenadante foi removido e ao pellet foi adicionado 800µL etanol 75% (em água

foi removido e ao pellet foi adicionado 800µL etanol 75% (em água deionizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1%) para lavagem. As amostras foram novamente centrifugadas a 7.500g por 5 minutos a 4°C e após remoção do sobrenadante o pellet de RNA foi secado em banho seco a 55°C por 5 minutos e, em seguida, dissolvido em 20µL de água livre de RNase.

Para eliminar possível contaminação com DNA as amostras foram tratadas com DNase livre de RNase (Promega) por 40 minutos a 37°C. A inativação da DNase se deu por incubação a 70°C por 15 minutos.

A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro (NanoDrop ND – 1000) após diluição apropriada das amostras em água e a leitura foi realizada a 260 e 280 nm.

Tabela 2. Quantidade de pares de lóbulos ópticos (L.O.) usados por amostra nas respectivas fases de desenvolvimento.

Fase	# de L.O.	Fase	# de L.O.
L3	30	LS3	16
L4	30	PP1	15
LF1	23	PP2	15
LF2	20	PP3	15
LF3	20	Pupa Branca (Pw)	4
LS1	18	Pupa Marrom (Pb)	4
LS2	16		

3.5 - Síntese da primeira fita de cDNA e PCR

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando transcriptase reversa ImProm-II (Promega). A partir de uma quantidade inicial de 2 a 3µg de RNA adicionou-se Oligo(dT)₁₂₋₁₈(Invitrogen) como inicializador da reação a qual seguiu as instruções da Promega. O volume final da reação foi 20 µL e seguiu as condições descritas na tabela 3.

Tabela 3. Reação de síntese da primeira fita de cDNA

<i>Anelamento</i>	25°C	5 minutos
<i>Extensão</i>	42°C	65 minutos
<i>Inativação</i>	70°C	15 minutos
<i>Conservação</i>	4°C	∞

3.6 – Análise in silico do gene *roughest*

Para definição estrutural de gene *roughest* foi utilizada a sequência codificadora completa da proteína *Roughest* de *Drosophila*. Para análise do ortólogo em *Apis mellifera* utilizou-se a versão 4.0 do genoma da abelha (*Honey Bee Genome Consortium*, 2006), as ferramentas do FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>) e algoritmos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul *et al.*, 1990) para anotação do gene *roughest*, proteína e sequências amplificadas. Para análise *in silico* do ortólogo *Apis mellifera roughest* e dos primers foi utilizado o programa Ártemis v9 para Windows (www.sanger.ac.uk) (Rutherford *et al.*, 2000)

3.6.1 - Anotação do gene *roughest* e desenho de primers

A sequência da proteína *Roughest* de *Drosophila* (número de acesso no *GenBank* NP_525058.2) foi utilizada para identificar uma sequência similar (Group 2.35, GB 11991-PA) presente no banco de dados de *Apis mellifera* versão 4.0 (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>) utilizando o algoritmo BLASTP e TBLASTN no site de anotação (<http://zulu.fmrp.usp.br/beelab>). A sequência nucleotídica CDS de *roughest* foi extraída e analisada por BLASTN contra o banco de dados não-redundante do NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para identificação de “mutual best hits” e localização de possíveis domínios conservados.

A sequência nucleotídica do grupo 2.35 e do ortólogo *roughest* (GB 11991-RA) foram utilizadas para detecção dos ORFs e montagem dos exons no programa Artemis v.9.0 (Rutherford *et al.*, 2000). Na anotação as sequências de aminoácidos foram alinhadas com a da proteína predita considerando a sequência consenso GT-AG para splicing de finalização e inicialização de exon (Breathnach & Chambon, 1981). Ao final, as sequências dos exons obtidas foram utilizadas para desenhar primers específicos.

Os primers foram desenhados utilizando-se os programas Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e Gene Runner v. 3.05. Foram desenhados primers (Tab. 4) para amplificação de exon inteiro e primers que anelavam a parte jusante de um exon com a parte montante do exon seguinte para controlar e detectar possível contaminação das amostras cDNA com DNA genômico.

Tabela 4. Primers específicos para o gene *roughest*

Primer	Sequência 5' - 3'	T.m.
Exon 6	F - 5' - ACG AGG ATT CGG AGC GAC AGG - 3'	62°C
	R - 5' - GGT GCC CGG ATG TAG ATG TTC G - 3'	62°C
Exon 5 - 6	F - 5' - AGT TCA GGC ACC AGC CGA TCT C - 3'	61°C
	R - 5' - CCT GTC GCT CCG AAT CCT CG - 3'	61°C
Exon 8 - 9	F - 5' - GCA TCA AAC AGC CAC GAC CGA G	63°C
	R - 5' - CGC CTT CAC GTC CGA CAG ATT G	63°C

3.7 - Normalização dos perfis de cDNA

Os perfis de cDNA de fita simples foram normalizados pelos genes de expressão quase constitutiva, tais como uma actina citoplasmática (número de acesso no Official_Gen_Set GB17861) e da proteína ribossomal RP49 (número de acesso GenBank AF 441189). Para *actina* os primers utilizados são: ACT-Forward 5' - TGC CAA CAC TGT CCT TTC TG - 3' e ACT-Reverse 5' - AGA ATT GAC CCA CCA ATC CA - 3'. Para RP49 os primers utilizados foram: RP49 - Forward - 5' CGT CAT ATG TTG CCA ACT GGT - 3' e RP49 Reverse 5' - TTG AGC ACG TTC AAC AAT GG - 3'. Ambos genes foram utilizados como normalizadores de PCR quantitativo e semiquantitativo e a temperatura de anelamento foi de 60°C.

3.8 - Reação em cadeia da polimerase (PCR semi-quantitativo)

Para amplificação de fragmentos do gene *roughest* foram preparadas reações de PCR a partir dos perfis de cDNA gerados para cada fase de desenvolvimento da abelha. Inicialmente montou-se em um tubo Eppendorf um “master mix” conforme descrito:

Tabela 5. Master mix para reação em cadeia da polimerase.

Água deionizada autoclavada	18,8 µL
Solução tampão para Taq polimerase	2,5 µL
Primer Reverse (0,4 pmol final)	1µL
Primer Forward (0,4 pmol final)	1µL
Taq Polimerase (5u/µL)	0,2 µL
cDNA	0,5 µL
dNTP (0,4µmM final)	1 µL

As ampliações foram realizadas em termociclador PTC-200 (MJ Research) nas seguintes condições:

- a) 95°C – 5 minutos
- b) 95°C – 1 minuto
- c) 57°C a 62°C – 30 segundos (dependendo da temperatura de anelamento de cada primer)
- d) 72°C – 30 segundos
- e) Repetição dos passos **b,c e d** (29 vezes para os genes roughest, actina e rp49)
- f) 72°C – 10 minutos

Para amplificação do fragmento de 130pb em todas as fases foi realizado um PCR touchdown sob as seguintes condições:

- a) 95°C – 5 minutos
- b) 95°C – 1 minuto
- c) 68°C – 62°C – 30 segundos
- d) 72°C – 30 segundos
- e) Repetição dos passos **b,c e d** (5 vezes para 68°C, 5 vezes para 66°C, 10 vezes para 64°C e 20 vezes para 62°C)
- f) 72°C – 10 minutos seguidos de resfriamento a 4°C por pelo menos 10 minutos.

Após a amplificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1%, tampão TBE (Tris 89mM, Ácido Bórico 89mM, EDTA 2mM, pH 8,0) e posteriormente corados em brometo de etídio (0,2µg/mL).

3.9 - PCR quantitativa (Real Time – PCR)

Para amplificação do gene *roughest* foram utilizados perfis de cDNA de cada fase do desenvolvimento da abelha detalhado na tabela 5. Dois genes controles endógenos foram utilizados o *rp49* e *actina* para normalização dos dados. A eficiência dos primers dos genes de controle, *actina*, *rp49*, e dos exon 6 e exons 8/9 do gene *roughest* foi verificada em reação quantitativa de PCR utilizando-se diluição 1:10 do cDNA e construção de curvas de regressão linear específicas para cada par de primer. Com o valor de Slope, fornecido pela curva, calculou-se a eficiência dos primers pela fórmula: $E=10^{(-1/\text{slope})}$. Os valores obtidos para *actina* foram de -3,55 de Slope, e correspondente $E = 1,91$; para o *RP49* foram de -3,36 para Slope e 1,98 para o E e finalmente para o primer Exon6 obteve-se -3,63 para Slope e 1,88 para E .

Para as análises por PCR quantitativa foi utilizado o protocolo do reagente *SYBR® Green* (Applied Biosystems). O volume da reação final foi de 20µL, contendo 10µL do “Master mix” *SYBR Green*, 0,8µL de cada primer (Forward e Reverse), 7,4µL de H₂O deionizada e autoclavada e 1µL de cDNA diluído 1:10. Para cada fase do desenvolvimento foram preparados três perfis de cDNA e de cada perfil foram montadas reações em triplicata para o gene alvo e para os genes controles. As reações foram realizadas em aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). A curva de dissociação foi analisada em cada reação e os valores relativos de expressão de *roughest* foram calculados conforme o procedimento C_T comparativo (Pfaffl, 2001).

Figura 2: PCR quantitativa, triplicatas biológicas e técnicas.

3.10 – Clonagem e sequenciamento parcial do gene *roughest* de *Apis mellifera*

3.10.1 - Preparo das células quimiocompetentes.

A partir de um tubo estoque contendo células bacterianas *E. coli* (DH5 α) estriou-se, com o auxílio de uma alça de platina, uma placa de petri contendo meio LB sólido e o crescimento ocorreu por 12 horas a 37°C. Após o crescimento uma colônia isolada foi escolhida e transferida para 50 mL de meio LB líquido e deixado para crescer a 37°C durante 4 h a 200 ciclos/min. As células foram assepticamente transferidas para tubos Falcon (50 mL), previamente resfriados, e deixados em gelo por 10 minutos.

As células foram recuperadas por centrifugação a 4.000 rpm por 10 min a 4°C (Sorvall GS3). O sobrenadante foi descartado e o pellet secado. O pellet foi ressuspensionado em CaCl₂ 0,1M (filtrado em filtro 0,22 μ m e autoclavado) e passado para o tubo seguinte até o todos os tubos fossem ressuspensionados. Em seguida as células foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C, ressuspensionadas em 2 mL de CaCl₂ 0,1M contendo 15% de glicerol, divididas em alíquotas de 250 μ L em tubos Eppendorf e estocadas a -80°C.

3.10.2 – Transformação das células competentes e clonagem.

Os fragmentos amplificados utilizando-se os primers Exon 6 do gene *roughest* foram excisados do gel de agarose e o DNA purificado com o kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE-Healthcare) de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida foi realizada a inserção do fragmento em plasmídio vetor pGEM T-easy (Promega) de acordo com protocolo do fabricante. Com uma alíquota de células DH5 α congelada (-80°C) realizou-se a transformação deixando os tubos no gelo por 30 min, 90 s a 42°C e novamente no gelo por 2 min. Foram adicionados 500 μ L de meio LB e levados a 37°C por 1 h. Após o crescimento das bactérias, 200 μ L da cultura foram espalhados em placa de petri com meio LB sólido contendo ampicilina (USB, 100 μ g/mL), X-Gal (5-Bromo-Cloro-3 indolyl-B-D-galactoside- USB, 40 μ g/mL) e IPTG (96 μ g/mL) de forma que apenas bactérias transformadas com os plasmídios poderiam se desenvolver. As placas foram mantidas a 37°C por 12 horas ou até que colônias brancas e azuis

fossem visualizadas. Após o crescimento uma colônia branca isolada foi repicada e transferida assepticamente para 5 mL de meio LB contendo ampicilina (100µg/mL) e deixada para crescer por 12 horas a 37°C sob agitação de 200 ciclos/min. A extração do DNA plasmidial foi realizada de acordo com instruções do fabricante (Kit GeneJet Plasmid Miniprep – Fermentas).

Para verificar a presença do inserto no plasmídio foi realizada a digestão com enzima de restrição *EcoR*I (8µL de plasmídio por 2 horas a 37°C) e o produto foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

3.10.3 – Seqüenciamento.

Os plasmídios que possuíam o inserto foram submetidos à reação de PCR com o mix Big Dye (Cycle Sequencing Terminator Kit v3.1 – Applied Biosystems). Os primers universais utilizados para o sequenciamento foram o M13 Forward (5´- CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3´) e Reverse (5´- CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3´) e a reação ocorreu de acordo com as seguintes condições:

Tabela 6. A) Master mix para reação de seqüenciamento. B) Condições da reação de PCR

A)

Big Dye Terminator	2 µL
Tampão	2 µL
Primer M13F ou M13 R	1 µL
DNA (plasmídial)	2 µL
H ₂ O	3 µL
Total	10 µL

B)

Ciclo		Tempo
96°C		5 minutos
96°C		1 minuto
24 X	50°C	30 segundos
	60°C	4 minutos
	4°C	∞

O DNA resultante da reação PCR foi transferido para novo tubo Eppendorf 1,5 mL e adicionado 40 µL de isopropanol 75%, agitado por 15 segundos no vortex e deixado à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida a reação foi centrifugada a 12.000g por 20 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 250 µL de isopropanol 75%, agitado em vortex por 5 segundos e novamente centrifugado a 12.000g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e os tubos foram deixados para secar em banho seco a 59°C.

Após o DNA ser ressuspendido em 12 µL “Template Suppression Reagent” (TSR) (ABI PRISM, Applied Biosystems) a solução foi agitada em vortex por 15 s e

transferida para tubos de seqüenciamento. A solução sofreu choque térmico a 95° por 2 min seguido de 2 min no gelo. Logo após a reação foi levada para seqüenciamento em seqüenciador de capilar ABI 310 (Applied Biosystems).

Os resultados obtidos foram submetidos a análise pelo algoritmo BLAST contra os bancos de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) e Official_Gene_Set (www.zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab/beelab/bioinfo_blast).

4 - Resultados

4.1 - Desenvolvimento do lóbulo óptico e do olho

Consideramos e definimos em nossas análises a região que originará o lóbulo óptico como centro de diferenciação por ter origem neuroepitelial e não disco imaginal do olho como em *Drosophila*. A região que irá formar o olho propriamente dito (retina) tem origem epitelial em *Apis* e aqui nós definimos como placóide.

Abelhas operárias de diferentes estágios do desenvolvimento pós-embrionário foram coletadas e tiveram a cápsula cefálica removida, embebida em parafina e cortes seriais corados com hematoxilina e eosina. A análise do desenvolvimento iniciou-se com o estágio larval 3.

Nesta fase o centro de diferenciação se apresenta muito indiferenciado, de formato discóide com uma camada celular espessa (Fig.3, A2 seta). Esta estrutura precursora do lóbulo óptico situa-se na parte superior frontal da cabeça e apresenta-se com relativamente poucas células em mitose (Fig.3, A1 cabeça de seta). A epiderme possui aspecto espesso ao redor da cápsula cefálica com acentuamento na região que, pela localização corresponde ao futuro placóide do olho.

No quarto instar larval percebe-se um achatamento do centro de diferenciação (seta) e um posicionamento para região mais lateral da cabeça. Com o achatamento é possível visualizar o aparecimento da lóbula (Fig.3 cabeça de seta) como região mais interna do centro de diferenciação e voltada em direção ao cérebro. Portanto a lóbula é a primeira estrutura a ser formada a partir do centro de diferenciação. A partir desse momento a lóbula irá se diferenciar de forma “distinta” do novo centro de diferenciação. Entre a lóbula e o centro de diferenciação já é possível visualizar a formação de axônios conectando ambos. A neurópila do protocérebro está delineada e atinge a lóbula. A camada mais externa do centro de diferenciação (seta) e a parte interna do mesmo (Fig.3 cabeça de seta) estão fortemente marcados pelo anticorpo anti histona3 fosforilado, indicando grande número de células em mitose sugerindo rápido crescimento e diferenciação. Em *Manduca* este processo de formação somente é visto durante a fase de alimentação onde ocorre proliferação maciça de células e início de comportamento de “wandering” (Monsma e Booker, 1996 a).

No começo do estágio de alimentação (L5F1) continua-se a observar elevado número de células em mitose (Fig. 4, A1). Comparado com o estágio anterior houve

uma redução da quantidade de células em fase M, porém nota-se que tais células concentram-se nas camadas mais externas do centro de diferenciação. Pelo corte em parafina percebe-se uma maior diferenciação do centro de diferenciação com o surgimento de nova camada, representando um novo processo, o qual irá permitir o surgimento da medula e lâmina (Fig. 4, A2 seta, B2 estrela e C2 seta). O espessamento da epiderme que recobre o futuro lóbulo óptico não se alterou desde o quarto instar larval.

Figura 3 Desenvolvimento do lóbulo óptico e olho em fases larvais iniciais **A)** Terceiro instar larval; A1- imunomarcção de cérebro e lóbulo óptico. Cabeça de seta mostra o centro de diferenciação com células em mitose. A2 - Corte histológico corado com H/E evidenciando o mesmo centro de diferenciação (seta) **.B)** Quarto instar larval; B1- A seta mostra a camada mais externa do centro de diferenciação do lóbulo óptico com grande número de células em divisão celular (nestas preparações de montagem total a epiderme foi removida). Cabeça de seta mostra o interior também com grande número de divisões celulares. B2 - Seta mostra o achatamento do disco (centro de diferenciação) e cabeça de seta mostra a lóbula. A epiderme sobre o lóbulo óptico é mais espessa do que a epiderme que recobre a parte dorsal do cérebro.

Figura 4 Desenvolvimento do lóbulo óptico e olho no início do quinto instar larval **A)** Fase de alimentação 1 (L5F1). A1- imunomarcacão de cérebro e centro de diferenciação (L.O.). Camada mais externa do futuro Lóbulo óptico com células em mitose (seta). A2 - Corte histológico mostrando a lâmina (seta). **B)** Fase de alimentação 2 (L5F2); B1- A Camada mais externa do centro de diferenciação com poucas células mitóticas (seta) e árvores traqueolares sobre centro de diferenciação (cabeça de seta). B2 - Seta mostra a lóbula, estrela mostra a lâmina ainda em desenvolvimento e a cabeça de seta evidencia a medula entre a lâmina e a lóbula. **C)** Fase de alimentação 3 (L5F3); C1 - Menor número de células em divisão na camada mais externa (seta). C2 - A lâmina continua a se desenvolver cobrindo a medula (seta).

Na segunda fase do estágio de alimentação (L5F2) observa-se que células em divisão estão espalhadas por todo o centro de diferenciação. Isso indica que o crescimento e/ou diferenciação não está ocorrendo em uma camada específica (Fig. 4.B), mas por toda a estrutura. Até o final da terceira fase da etapa de alimentação (L5F3) não ocorreram mais processos evidentes do desenvolvimento do lóbulo óptico como mostra a figura 4 - C. Durante a fase de alimentação é notável o aparecimento de uma estrutura que somente após a metamorfose irá originar a lâmina. Entre o final de L4 e o começo de L5F1 esta estrutura se desenvolve e aparentemente interrompe seu crescimento no decorrer do estágio de alimentação (Fig. 4. A2, B2 e C2). A imunomarcagem de células em mitose evidencia o desenvolvimento desta estrutura na figura 4 (A1, B1 e C1), onde se podem notar tais células concentradas na região da estrutura emergente e em seguida o padrão não é mantido. As células em divisão aparecem de modo difuso no centro de diferenciação e pela histologia percebe-se que a futura lâmina momentaneamente cessou o desenvolvimento. Ainda nesta fase percebe-se que a futura medula no centro de diferenciação está relativamente bem desenvolvida.

Após a fase de alimentação a larva entra na fase de tecelagem do casulo. Interessantemente, nesta fase o padrão de células em mitose na camada mais externa do centro de diferenciação é retomado (Fig. 5 A1, B1 e C1). Pela análise dos cortes em parafina é possível notar que o desenvolvimento da lâmina ainda é evidente (Fig. 5 A2, B2). Percebe-se, também, o surgimento de tecido neural na parte interior da futura lâmina (seta branca) coincidindo com o padrão de células em fase M. Projeções axonais são visíveis no final da fase de tecelagem de casulo (L5S3) (Fig. 5 C seta preta). As projeções axonais aparentemente estão saindo do placóide epidérmico em direção à lâmina e coincide com a formação de tecido neural dentro da futura lâmina. Esta observação está de acordo com processos de diferenciação de rabdômeros se formando no placóide. Padrão semelhante é visto em *Manduca* onde a geração do córtex da lâmina é iniciado com a chegada dos nervos aferentes retiniais na camada externa do lóbulo óptico (Monsma e Booker, 1996 a).

Figura 5: Desenvolvimento do lóbulo óptico e olho nomeio do quinto instar larval **A)** Fase de tecelagem do casulo; A1 (L5S1)- Imunomarcção evidenciando aumento de número de células em fase M (seta). A2 - Corte histológico evidenciando o desenvolvimento da lâmina (seta). **B)** Fase 2 de tecelagem do casulo (L5S2); B1- A seta mostra uma camada de células se separando na região mais interna em relação à lâmina. B2 - Pode-se notar que não há alterações significativas no desenvolvimento em relação aos estágios anteriores. **C)** Fase 3 de tecelagem do casulo (L5S3); C1 - Células em divisão na camada mais externa do centro de diferenciação (seta). C2 - Projeções axonais já são visíveis (seta). Rabdômeros estão se formando no placóide (cabeça de seta). Seta branca mostra o desenvolvimento de tecido neural.

Chegando ao final do quinto instar larval a larva entra no período pré-pupal que se caracteriza por profundas mudanças morfológicas como alargamento dos olhos e constrição entre tórax e abdômen (Snodgrass, 1956; Michelette & Soares 1993). Nesta fase, que precede a ecdise, ocorre a apólise da cutícula larval e a síntese da cutícula pupal. Nesta fase, a epiderme tem uma aparência enrugada e quebradiça.

Pela imunomarcacão com anti-histona 3 fosforilada é possível visualizar intensa marcação de células em fase M, principalmente na região da futura lâmina (Fig. 6 A1, B1, seta branca) que corrobora o alargamento dos olhos nesta fase. O processo de desenvolvimento da lâmina ainda está ocorrendo como mostra a figura 6 A2, B3 e C. Nota-se também que a cutícula nova e epiderme estão muito enrugadas. Os rabdômeros são visíveis (Fig. 6 A2) assim como os axônios (Fig. 6 C). A epiderme que cobre o centro de diferenciação mostra grande atividade mitótica (seta Figura 6 B2). Nesta preparação a epiderme foi parcialmente removida, da parte inferior, mas permaneceu sobre a parte superior do lóbulo óptico. Em relação à fase anterior é possível perceber um espessamento no córtex da futura lâmina (Fig. 6, A2 e B3). Esta estrutura, provavelmente, está sofrendo intensa diferenciação devido ao grande número de células em divisão e pela chegada de feixes axonais aferentes (Fig. 6, B1 e B2). Nota-se que a estrutura que originará a medula no centro de diferenciação possui aspecto globular já de grandes proporções em relação às outras estruturas mostrando que a medula é a segunda estrutura a ser formada no centro de diferenciação (Figs. 5 e 6).

Durante o desenvolvimento pupal percebe-se que ocorre uma compactação das estruturas internas do lóbulo óptico, com os feixes de axônios tornando-se mais curtos e a gradual perda do corpo gorduroso até a fase pupa de olho marrom (Pb) (Fig. 7 C). Junto com o encurtamento da distância entre retina e lâmina ocorre o alongamento dos rabdômeros que segue até atingir o comprimento final, observado no adulto recém-emergido. Ainda em pupa de olho marrom nota-se intensa pigmentação na retina (antigo placóide) a qual praticamente não se altera até o momento da eclosão. Nota-se que somente após a metamorfose a lâmina atingiu seu desenvolvimento completo cobrindo a medula e recebendo os feixes de axônios vindo da retina. Portanto a lâmina é a terceira e última estrutura do lóbulo óptico a ser formada. Durante as fases pupais não foi possível obter marcação de células em fase M provavelmente porque a cutícula encontra-se firmemente aderida na retina e essa impossibilita a penetração de anticorpos anti-histona 3 fosforilada.

Figura 6: Desenvolvimento do lóbulo óptico e olho no final do quinto instar larval. **A)** Pré-pupa 1 (PP1); A1 - Camada mais externa do centro de diferenciação com células em mitose (seta); A2 - Corte histológico evidenciando a lâmina (seta) e cutícula/epiderme com enrugamento (cabeça de seta). **B)** Pré-pupa 2 (PP2); B1 - Camada de células em mitose na lâmina (seta), cabeça de seta mostra outra camada de células abaixo da lâmina. B2 - Epiderme cobrindo o lóbulo óptico (seta) e projeções axonais indo dos rabdômeros para a lâmina (cabeça de seta). Pelo corte em parafina pode-se notar que não houve profundas alterações do desenvolvimento entre Pré-pupa 2 (B3) e C) das mesmas estruturas em Pré-pupa 3 (PP3).

Figura 7: Desenvolvimento do lóbulo óptico e olho nas fases pupais **A)** Pupa de olho branco (Pw). A1- Seta mostra a camada mais externa do Lóbulo Óptico (antigo centro de diferenciação) já formado (lâmina). A2 Corte histológico mostrando lâmina (La), Medula (Me) e Lóbula (Lo). **B)** Pupa de olho rosa (Pp). B1, B2 e B3 - Rabdômeros na retina (seta) e feixes de axônios em direção à lâmina (cabeça de seta). **C)** Pupa de olho marrom (Pb) mostrando a diminuição da distância entre retina e lâmina (seta branca) e aumento do comprimento dos rabdômeros (seta preta).

Após passar para fase pupal, a abelha externamente já atinge sua forma adulta tendo apenas o enrijecimento e escurecimento da cutícula até o nascimento, seguida pela expansão das asas (Truman, J.W., Riddiford, L.M. 1999). Entretanto, internamente ainda ocorrem grandes processos de reestruturação na musculatura, no trato intestinal e em outros órgãos essenciais para a vida adulta (Snodgrass, 1956). A figura 7 mostra o Lóbulo Óptico (antigo centro de diferenciação) com sua forma final após a metamorfose com todas estruturas já definidas no primeiro estágio pupal (Pw) (Fig. 7 A). Em comparação com o adulto (Fig. 8) pode-se notar nas fases Pw e Pp a presença de grande quantidade de células de corpo gorduroso entre a retina e lâmina (Fig. 7 A e B). Na mesma figura nota-se os feixes de axônios passando entre estas células (cabeça de seta B1 e B2).

Figura 8: Lóbulo óptico e olho em operária adulta **A1)** Corte horizontal mostrando o 1° e 2° quiasmas ópticos. **A2)** Corte transversal mostrando o Lóbulo Óptico formado. Corte histológico mostrando lâmina (La), Medula (Me) e Lóbula (Lo).

4.2 - O gene *roughest*

4.2.1. Análises *in silico* do ortólogo *roughest* de *Apis mellifera*

A sequência de proteína Roughest predita de *A. mellifera* (GB11991-PA) apresentou 65% de identidade e 78% de similaridade com a sequência de proteína Roughest de *Drosophila* e mostrou a existência dos cinco domínios conservados. Tais domínios estão relacionados à superfamília das imunoglobulinas denominado “IRM” (“irre recognition module”), que inclui *kin of irre* (Strünkelnberg *et al*, 2001) de *Drosophila melanogaster*, Nephrin (Kestilae *et al*, 1998) e Kirrel2 (Sun *et al*, 2003) de camundongo e humano. Tem sido observado que estas proteínas interagem de maneira homofílica ou heterofílica e estão relacionados com adesão e sinalização celular.

O gene *roughest* de *Apis mellifera* localiza-se no cromossomo 2 (Group 2.35 Amel v. 4.0), possui 11 exons e 10 íntrons, codifica um CDS de 2.322 nucleotídeos e cobre uma região genômica de 36.608 pares de bases. A anotação pela plataforma Artemis também permitiu identificar sítios consensos de splicing (5'-AG-GT-3') (Breathnach e Chambon, 1981) em todas as junções éxon-íntron-éxon.

Por análise com algoritmo RPSBLAST foram encontrados cinco domínios conservados no gene *roughest*. Os quatro primeiros domínios correspondem aos membros da super família de imunoglobulinas. O quinto é um domínio tipo molécula de adesão celular (CAM), típicas de moléculas de adesão de células neuronais (N-CAM L1), fasciclina II e da proteína Hemolina (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi). Esta família também inclui domínios receptores de ligantes extracelulares do fator de crescimento de fibroblastos II. Todos os domínios apresentam-se na parte extracelular da proteína com exceção do domínio Ig-CAM que constitui parte do componente transmembrana.

Por análise BLAST contra o banco de dados SwissProt o domínio transmembrana apresentou alta similaridade com Roughest de *Drosophila* e com IRRE-like de rato, humano e camundongo (todos com $E < 10^{-6}$). Em *Apis* o mesmo é composto por 96 aminoácidos. Aproximadamente 240 aminoácidos compõem o domínio intracelular de Roughest, ou seja, 40 aminoácidos maior do que em *Drosophila* (Boschert *et al*. 1990). Pela análise BLASTP verificou-se que o domínio intracelular possui baixo grau de similaridade com Roughest de *Drosophila* ($E = 0,35$) e observamos alinhamento significativo apenas com uma região de 22 aminoácidos com similaridade de 78% (Fig. 9).

A)

MTNVSPLASTVRPITTEVVYQ**RF**AI**EP**MDQ**TA**VIGSRVTLPCRVL**DQ**KGPIQW
TKDD**FGLG**AVRNL**TGY**ERYAMIG**SDE**EGDFSLHIYPVELEDDGTY**QC**QASPTN
 DGQPALRSRFAKLSVLVPPQ**KPKIL**QGD**FLIT**TEDREL**VIE**CVSVAGKPPAEITWI
DGLGNVLHRGIK**TTKEL**FDDGPLYTVK**SVLR**VMPRKDHDNTTFT**CQ**SQNAAD
RTPQNAKL**RV**EVR**YAP**KVSLRIR**SG**L**GKNG**RIVEGSEL**R**FKCRAEANPPNVEYR
WFINEK**KVIG**DY**TT**EMIIHNAT**RD**LHDAIV**KCE**VHNDVGK**SE**DTETLDITY**GP**Q
FRHQ**PIS**VETQY**GATE**ILQCDVDGN**PT**PEIRWYHEDSERQ**VAS**TPNISVVNHET
AGRY**FCKA**HVPGFQELMGYANIYIRAPPSIV**SQR**VQYVPDEGAVKVKCTAISVP
 KADSVVWSFAGREFNLSTNNTQFSVQEEYTVERVVSTVTLL**EP**STYFGDYNC
 TVTNSFGTDSV**II**KLTAHTLIPVDLQLIL**IIG**GLVVCVILIGV**II**LIL**QC**RDRIKQPR
 PR**TA**QTQETDMQETDSNADRYRES**DR**SSNLSDVKADIRAGSSVSNAESVTALD
 SEGE**GSTR**GVNALALAGPVNP**LG**YRYSADY**TE**PSFPPKNNDGSNNNGYVPYV
 DYTRDYM**PPT**TQGVGASRESLSRIPSGGILASKKIGLSSANLGGSTPQTTPAIDPR
 FSATYGNPYLRMSAAEQ**LR**HAPHTAVPGVTPAPPY**TQ**AMRMNSLNTLN**GAG**
 PQVSTMPANVCQIPRF

B)

Figura 9: Proteína Roughest de *Apis mellifera* com 774 aminoácidos preditos. Os domínios conservados imunoglobulina são mostrados em diferentes cores na sequência protéica (Laranja, Verde, Azul). O domínio transmembrana é mostrado em marrom e em vermelho está o domínio intracelular. B) Domínios imunoglobulina conservados da proteína Roughest (RPS-blast).

Figura 10: Gene *roughest* de *Apis mellifera* anotado pela plataforma Artemis (v.9.0) sobre o genoma Amel v. 4.0 (GB11991). Primers foram desenhados para domínios conservados no exon 6 e parte do exon 8 e 9. Barras acima dos exons, mostram os trechos amplificados pelos primers.

Ao realizar análises BLASTN da sequência CDS do gene *roughest* contra o genoma de *Apis* observamos alinhamento não somente com o *scaffold* genômico original (Group 2.35) mas também com uma segunda região genômica (GroupUn.1539) que apresenta alto grau de similaridade ($E = e^{-137}$) indicando alta similaridade. Porém, utili-

zando-se a ferramenta de anotação Artemis notamos que neste segundo grupo o gene *roughest* não está representado por completo. Consideramos que este segundo gene pode ser resultado de uma duplicação na qual se perderam os cinco primeiro exons, o que levaria a um encurtamento da região extracelular, caso este gene for expresso.

4.3 - Análises por RT-PCR do gene *roughest*

4.3.1 - Análises por RT-PCR semi-quantitativa

O gene *roughest* foi, inicialmente, anotado no programa Artemis v9.0 para identificação e montagem dos exons. Com a informação das seqüências de cada exon foi possível desenhar primers para análise da expressão durante o desenvolvimento larval e pupal em operárias. Os primers foram desenhados contra regiões não conservadas do gene para evitar anelamento e amplificação de outros genes, e.g. da superfamília IgG.

Nas análises iniciais de expressão utilizou-se o perfil de cDNA das fases L3 até pupa de olho branco (Pw) e pupa de olho marron (Pb). Nas reações de amplificação empregou-se o primer exon 6 que confirmou a presença de produtos de 130 pb do gene em todas estas fases (Fig. 11). Na fase Pb e possivelmente também em PP1 detectamos uma segunda banda de 500 pb (circulo).

Figura 11: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Reação de PCR touchdown ocorreu com 5 ciclos a 68°C (temperatura de anelamento) seguidos por 5 ciclos a 66°C, 10 ciclos a 64°C e finalmente 20 ciclos a 62°C utilizando o par de primers para exon 6.

Com finalidade de validar os fragmentos amplificados pelo primer Exon 6 as bandas foram excisadas do gel e inseridas em plasmídios (Fig. 12). Posteriormente os

fragmentos foram clonados (Fig. 12) e submetidos à reação de PCR para seqüenciamento com o mix Big Dye Terminator).

As seqüências obtidas foram submetidas à análise pelo algoritmo BLAST contra os bancos de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) e Official_Gene_Set (http://www.zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab/beelab/bioinfo_blast). A similaridade obtida para o fragmento de 130 pb foi superior a 99% para o gene GB11991-RA nas reações forward e reverse (Fig: 13 A e B respectivamente) confirmando a amplificação correta de parte do gene *roughest*. O fragmento de 500pb encontrado na fase pupa de olho marrom (Pb) (circulo vermelho Fig. 11) também foi seqüenciado e analisado nos mesmos banco de dados. As reações forward e reverse do fragmento de 500pb foram alinhadas com as reações forward e reverse do fragmento de 130pb (BLAST2seq) e verificou-se que há alinhamento apenas na região do primer. Em seguida verificou-se no banco de dados (Official_Gene_Set) que a seqüência de 500pb se alinha perfeitamente ($E= 0.0$) com o GB 14295-RA (Group 1.18) (Fig. 14). A seqüência do GB foi extraída e analisada por BLASTN contra o GenBank e verificou-se o alinhamento com o gene CG32019-RC de *Drosophila*, codificador de proteína de função molecular desconhecida (flybase.bio.indiana.edu/).

Figura 12: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Digestão de plasmídio com EcoR1 mostrando os fragmentos de 130pb e 500pb em duplicata e, acima, com 3Kb os vetores.

A)

```
>gnl|Amel_4.0|Group2.35
      Length = 916114

Score = 250 bits (126), Expect = 1e-65
Identities = 129/130 (99%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1      acgaggattcggagcgacaggtcgccagcacgccaacatcagcgtggtggtgaaccacg 60
             |||
Sbjct: 795339 acgaggattcggagcgacaggtcgccagcacgccaacatcagcgtggtggtgaaccacg 795398

Query: 61      aggcggccggcggtatattttgcaaggcgacgtaccgggtttccaggagttgatgggggt 120
             ||
Sbjct: 795399 agacggccggcggtatattttgcaaggcgacgtaccgggtttccaggagttgatgggggt 795458

Query: 121     acgcgaacat 130
             |||
Sbjct: 795459 acgcgaacat 795468
```

B)

```
>gnl|Amel_4.0|Group2.35
      Length = 916114

Score = 250 bits (126), Expect = 1e-65
Identities = 129/130 (99%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1      ggtgcccggtgtagatgttcggtaccccatcaactcctggaaacgggtacgtgcgcc 60
             |||
Sbjct: 795483 ggtgcccggtgtagatgttcggtaccccatcaactcctggaaacgggtacgtgcgcc 795424

Query: 61      ttgcaaaaataccgcccggccgctcgtggttcaccaccacgctgatgttggcgctgctg 120
             |||
Sbjct: 795423 ttgcaaaaataccgcccggccgctcgtggttcaccaccacgctgatgttggcgctgctg 795364

Query: 121     gcgacctgtc 130
             |||
Sbjct: 795363 gcgacctgtc 795354
```

Figura 13: Sequência do fragmento de 130pb obtido por amplificação com os primers Exon 6. (A) BLASTN com o produto de sequenciamento forward e (B) BLASTN com produto de sequenciamento reverse contra o banco de dados Official_Gene_Set 2 mostrando o alinhamento de 129 das 130 bases sequenciadas contra a sequência predita do exon 6 de *roughest*.

A)

```
>gnl|Amel|GB14295-RA
Length = 1218

Score = 692 bits (349), Expect = 0.0
Identities = 405/416 (97%), Gaps = 6/416 (1%)
Strand = Plus / Minus

Query: 11  ggagcgacaggtgggctttcaggtgtcaacctcctcgccatagccattttttggctcgg 70
      |||
Sbjct: 1169 ggagcgacaggtgggctttcaggtgtcaacctcctcgccataagccattttttggctcgg 1110

Query: 71  ccagagtgtatagtaataacgcataaagcaacgccatagccgccagtaaccaacaggcac 130
      |||
Sbjct: 1109 ccagagtgtatagtaataacgcataaagcaacgccatagccgccagtaaccaacaggcac 1050

Query: 131  gtaccagcgataataacactgnaataaccaatgatccactcggctctggcaccatgt 190
      |||
Sbjct: 1049 gtaccagcgataataacactg-aataaccaatgatccactcggctctggcaccatgt 991

Query: 191  tggctctgttgggtgattttttctcctggaaacggatttcggagttgggtggctctgcagggtg 250
      |||
Sbjct: 990  tggctctgttgggtgattttttctcctggaa-cggatttcggagttgggtggctctgcagggtg 932

Query: 251  gaagagggttctacgtcatctcctatagtaatatcagcacaaagcaagaaattctcttgag 310
      |||
Sbjct: 931  gaagagggttctacgtcatctcctatagtaatatcagcacaaagcaagaaattctcttgag 872

Query: 311  gacgcgaacctacagctcctgttccgtttccacagtcgcccccaattatttccggcccaag 370
      |||
Sbjct: 871  gacgcgaacctacagctcctgttccgtttccacagtcgcccccaattatttccgg-ccaag 813

Query: 371  tatctccattgnagaaaacgattggggcgccaaagtcaaatgtccggcaatttgta 426
      |||
Sbjct: 812  tatctccattgaa-aaacgatt-gggcg-caagtccagtcgcccccaatttgta 760
```

B)

```
>gnl|Amel|GB14295-RA
Length = 1218

Score = 729 bits (368), Expect = 0.0
Identities = 404/412 (98%), Gaps = 3/412 (0%)
Strand = Plus / Plus

Query: 15  agatgttcgaggctttctacaaattgcggacgatctgacttgcgccccaatgcgtttctc 74
      |||
Sbjct: 743  agatgttcgaggctttctacaaattgcggacgatctgacttgcgccccaatgcgtttctc 802

Query: 75  aatggagatacgtggccggaaaaataattggggcgactgtggaacggaaacaggagctgta 134
      |||
Sbjct: 803  aatggagatacgtggccggaaa-taattggggcgactgtggaacggaaacaggagctgta 861

Query: 135  ggttcgggtcctcaagaagaatttcgtgctgtgatattactataggagatgacgta 194
      |||
Sbjct: 862  ggttcgggtcctcaagaagaatttcgtgctgtgatattactataggagatgacgta 921

Query: 195  gaac-tcttccacctgcagagccaccaactcogaatcggttccaggagaaaaatcacca 253
      ||
Sbjct: 922  gagcctcttccacctgcagagccaccaactcogaatcggttccaggagaaaaatcacca 981

Query: 254  acagagccaaacatttggtgccagagccgagtgatcatattggttattcagtggttattatc 313
      |||
Sbjct: 982  acagagccaaacatttggtgccagagccgagtgatcatattggttattcagtggttattatc 1041

Query: 314  gctggtacgtgcctgttggtgttactggcggctatggcggttgctttatgcgtattactat 373
      |||
Sbjct: 1042 gctggtacgtgcctgttggtgttactggcggctatggcggttgctttatgcgtattactat 1101

Query: 374  cactctggcgagccaaaaaatggcctatggcga-gaagttgacacotgaaa 424
      |||
Sbjct: 1102 cactctggcgagccaaaaaatggcctatggcga-gaagttgacacotgaaa 1153
```

Figura 14: Sequência do fragmento de 500pb obtido por amplificação com os primers Exon 6. (A) BLASTN com produto de sequenciamento forward e (B) BLASTN com produto de sequenciamento reverse contra o banco de dados Official_Gene_Set 2 mostrando o alinhamento de 97% das bases sequenciadas Com fragmento do gene predito GB 14295-RA.

4.3.2 - Análises por RT-PCR quantitativa do gene *roughest*.

Para verificar os níveis relativos de mRNAs do gene *roughest* nas diferentes etapas do desenvolvimento pós-embrionário foi realizada a análise por qPCR dos perfis de cDNA dos lóbulos ópticos. Para tanto a eficiência dos primers foi testada em diferentes diluições (1:5, 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000) com um pool de cDNA, segundo a metodologia de Pfaffl (2001) e Livak & Schmittgen (2001).

Os primers para actina apresentaram coeficiente de correlação $R = 0,99$ e Slope $-3,553$ indicando uma eficiência (E) de $1,912$. Para rp49 o valor de R foi de $0,98$ com Slope de $-3,3636$ e $E = 1,98$. Finalmente para o par de primer Exon 6 obteve-se $R = 0,99$, $S = -3,6305$ e $E = 1,885$.

A quantificação dos transcritos se iniciou no 3º instar larval até o final do 5º instar, e na fase pupal utilizou-se cDNA de pupa de olho branco (Pw) e de olho marrom (Pb). A actina e o rp49 foram utilizados como controles endógenos para normalização dos valores C_T do gene *roughest*. Nestes cálculos subtraímos a média aritmética dos dois genes controle do C_T do gene em estudo, assim obtendo-se o valor ΔC_T . Para diminuição do erro estatístico foi calculada a média dos ΔC_{Ts} de todas as fases (Hellemans *et al*, 2007) e em seguida este valor foi usada como calibrador para o cálculo da expressão relativa ($\Delta \Delta C_T$). Diferenças em níveis de expressão são apresentados de acordo com metodologia de Livak & Schmittgen (2001) como valores $2^{-\Delta \Delta C_T}$.

Notamos dois picos de expressão acentuada de *roughest* durante o desenvolvimento pós-embrionário do lóbulo óptico. O primeiro pico ocorreu em L5F2 e outro em L5S1 e L5S2. Nota-se que durante a fase de alimentação (L5F2) a expressão relativa foi de cerca de 400 vezes maior que a média. Em L5S1 e L5S2 a expressão relativa foi de cerca de 180 e 240 vezes maior respectivamente. Nas fases L3 e L4 a expressão era inferior à média das fases analisadas. Nos estágios mais avançados de desenvolvimento também a expressão de *roughest* se manteve em níveis basais até a fase de pupa de olho marrom (Fig. 15).

Figura 15: Gráfico Box-Whiskers mostrando a expressão relativa do gene roughest em diferentes etapas do desenvolvimento pós-embrionário de operárias de *Apis mellifera*. Os limites superior e inferior representam os maiores e menores valores observados. O primeiro e terceiro quartis possuem valores semelhantes à media por isso são representados como uma linha. A metodologia utilizada para cálculo da eficiência dos primers foi segundo Pfaffl (2001) e a expressão relativa foi segundo Livak & Schmittgen (2001).

5 – Discussão

5.1 – Desenvolvimento do Lóbulo Óptico

O sistema visual de um inseto adulto consiste em retina (o olho propriamente dito), contendo células fotoreceptoras, e os lóbulos ópticos que compreendem três grandes gânglios: a lâmina, a medula e a lóbula. Inicialmente o primórdio óptico externo é composto por neuroblastos (NBs), precursores de neurônios que irão compor a lâmina e a medula (Meinertzhagen, 1993). As células fotoreceptoras em formação geram axônios aferentes que se estendem até os lóbulos ópticos. Dessa forma, o desenvolvimento dos gânglios óptico (lâmina, medula e lóbula) deve ser coordenado com o desenvolvimento da retina adulta.

Em *Manduca sexta* o primórdio óptico externo é o precursor da medula e da lâmina do sistema visual adulto. este corresponde ao centro de diferenciação em *Apis mellifera* que é visível já no 3º estágio larval (Fig. 3, A2). Porém, este centro de diferenciação possui provável surgimento neuroepidérmico (Fig. 3, A2) e apresentou-se com relativamente poucas células em mitose (Fig. 3, A1).

A lóbula, em *Manduca*, é formada por diferenciação de neuroblastos, porém a partir de uma segunda estrutura, o primórdio óptico interno (Monsma & Booker, 1996 a; Meinertzhagen, 1993). O primórdio da lóbula de *Apis* surge a partir do centro de diferenciação já no quarto instar larval (Fig. 3). Durante o desenvolvimento larval esta estrutura não apresenta profundas alterações (Figs. 4 e 5). No final do quinto instar larval a estrutura que formará a lóbula no centro de diferenciação apresenta-se em formato globular semelhante ao encontrado em adulto (Fig. 6). Após a metamorfose a lóbula está completamente formada e posicionada (Fig. 7, A2, B3 e C).

Em *Apis*, o aumento de divisões celulares começou a ocorrer já no 4º instar larval, ou seja, antes do último instar larval (Fig. 3, B1). No 4º instar observa-se o começo de diferenciação do centro de diferenciação pelo achatamento e posicionamento lateral, rente à cápsula cefálica e pelo grande número de células em mitose na camada externa (Fig. 3, B1 e B2). Também se observa processo de diferenciação no placóide da retina, que se torna espesso na região que recobre o lóbulo óptico.

Após o quarto instar observa-se o desenvolvimento de uma estrutura que começa a recobrir o centro de diferenciação a partir da margem anterior em direção à margem posterior (Figs. 4 a 8). Tal estrutura irá se diferenciar e originará a lâmina após sofrer metamorfose (Fig. 7). Segundo Varela (1970) a lâmina (primeira neurópila) é formada

pela convergência de axônios das células receptoras e neurônios de segunda ordem. Nesta estrutura são encontrados três tipos de axônios: (i) axônios laminares curtos terminando na parte superior da lâmina; (ii) axônios laminares longos terminando na parte inferior da lâmina; e (iii) axônios longos que atingem a medula (Varela, 1970; Ribi, 1979). Após deixar a lâmina, no adulto, os axônios cruzam a parte posterior da medula formando parte do primeiro quiasma óptico (Fig. 8). Da mesma forma acontece em *Drosophila* a formação do primeiro quiasma óptico (Meinertzhagen, 1993).

O começo da diferenciação da lâmina observamos a ocorrer no início do quinto instar larval (Fig. 4) e interessante foi justamente nesta fase que encontramos também o primeiro pico de expressão de *roughest* (Fig. 15). Tal fato correlaciona o desenvolvimento da estrutura com a possível função da proteína Roughest durante o desenvolvimento do lóbulo óptico em *Apis mellifera*. Os novos feixes de axônios que chegam à lâmina disparam o término da divisão celular e iniciam a diferenciação neural das células precursoras da lâmina. Huang e Kunes (1996) mostraram que a proteína Hedgehog expresso nos fotorreceptores é transportado ao longo dos axônios e serve de sinal indutivo de maturação na lâmina.

Durante o estágio de tecelagem de casulo em *Apis* percebe-se bem o desenvolvimento do córtex da futura lâmina e no estágio seguinte o córtex encontra-se ainda mais espesso. Coincidentemente é neste momento que está ocorrendo o segundo pico de expressão do gene *roughest* (Fig. 15) relacionando o desenvolvimento axonal e diferenciação da futura lâmina com a expressão do gene. Tal resultado é corroborado pelos estudos de Varela (1970) e Ribi (1979) que mostraram que a chegada de axônios está relacionado com o desenvolvimento da lâmina em *Apis*. Sabe-se que a proteína Roughest está presente neste local segundo estudos com hibridação *in situ* em *Drosophila* que mostraram intensa marcação nos discos imaginais e no princípio óptico externo (Ramos *et al.*, 1993). Outros estudos em *Manduca* mostraram que os axônios que chegam no princípio óptico externo (futuro lóbulo óptico) disparam divisões mitóticas controladas em células precursoras distintas, acompanhado de morte celular programada de neurônios na medula e lâmina, provocando sua diferenciação (Monsma & Booker, 1996 ab;). Desta forma, percebe-se que a expressão do gene *roughest* está intimamente relacionado com o desenvolvimento da lâmina. Tais resultados mostram a similaridade dos processos entre esses três insetos.

O desenvolvimento da lâmina só será completado após a metamorfose (Fig. 7). No estágio pré-pupal já é possível visualizar a lóbula e medula como estruturas quase

totalmente formadas. Aparentemente entre pré-pupa e pupa de olho branco tais estruturas somente sofrem um pequeno rearranjo (Figs. 6 e 7). Através do centro de diferenciação a primeira estrutura que começa a se diferenciar é a lóbula seguida da medula. A lâmina inicia seu processo de diferenciação e desenvolvimento em L5F1. Durante a fase de tecelagem de casulo e pré-pupa tal estrutura não recobre totalmente a futura medula, porém percebe-se o desenvolvimento de seu córtex. A lâmina é a terceira estrutura a se diferenciar, a partir do centro de diferenciação, e atinge seu desenvolvimento final somente após a metamorfose (Fig. 7). Em *Manduca* esses eventos estão correlacionados com o aumento do título de ecdisteróides que conduz o desenvolvimento adulto.

O término da gênese da medula e lâmina é marcado pela cessação de atividade mitótica no final do estágio pupal em *Manduca*. Na fase pré-pupal em *Apis* nota-se uma camada de células em mitose concentradas no placóide e poucas no centro de diferenciação (futuro lóbulo óptico) indicando provável processo de diferenciação na retina (Fig 6, A1, B1 e B2). Durante as fases pupais não foi possível realizar ensaio com imunomarcacão devido a cutícula estar fortemente ligada à retina e impossibilitar a passagem de anticorpos.

5.2 -Desenvolvimento da Retina

A retina forma um arranjo de células altamente ordenado de unidades omatidiaais repetidas (Ready et al., 1976). O sistema visual de um inseto adulto consiste em retina (o olho propriamente dito), contendo células fotoreceptoras, e os lóbulos ópticos que compreendem três grandes gânglios: a lâmina, a medula e a lóbula. A retina forma um arranjo de células altamente ordenado de unidades omatidiaais repetidas (Ready et al., 1976). Cada unidade retinal (com oito a nove células fotossensoriais), dentro do omatídio, projeta feixes axonais em direção aos lóbulos ópticos formando sinapses na lâmina e, eventualmente, na medula. Neurônios da lâmina por sua vez projetam axônios para dentro da medula e esta projeta para a lóbula (Horridge, 1965).

A retina é gerada a partir de células epiteliais. Células epiteliais também compoem os discos imaginais em dípteros e centros de diferenciação em lepidópteros (Monsma & Booker, 1996). Diferentemente de *Drosophila melanogaster*, porém o olho de *Manduca sexta*, surge de um pequeno grupo de células epidérmicas na cápsula encefálica a partir do último instar larval, a qual exibe uma morfologia típica chamada de centro

de diferenciação (Monsma e Booker, 1996; Champlin e Truman, 1998b; MacWhinnie *et al.*, 2005). Durante a fase de alimentação e começo da fase de “wandering”, no último instar larval em *Manduca*, observou-se um aumento massivo de células em mitose. O centro de diferenciação, que originará o olho, aumenta e o padrão de atividade mitótica é similar ao encontrado no disco imaginal de *Drosophila* (Monsma e Booker, 1996).

Até o terceiro instar em *Apis* a epiderme lateral da cápsula cefálica ainda se apresenta como uma camada sem evidente diferenciação (Fig. 3, A2). Durante o quarto instar larval, porém a camada epitelial nas laterais da cápsula cefálica forma uma estrutura espessa apresentando um placóide, do qual irá surgir o olho propriamente dito (retina com os omatídeos e feixes axonais).

O desenvolvimento do placóide em *Apis* que começou no quarto instar larval e evidenciado pelo aumento da espessura do mesmo na epiderme (Fig. 3, B2). Tal espessamento do placóide se mantém constante até a fase de tecelagem de casulo onde já é possível visualizar os feixes de axônios saindo do mesmo em direção à futura lâmina (Fig. 5). O desenvolvimento completo do olho a partir do placóide só ocorre após a metamorfose, contudo em L5S3 já é possível visualizar os rabdômeros e os feixes axonais (Fig. 5, C2 cabeça de seta e seta). Conforme Eisen & Youssef (1980) a reorganização das células que irão formar os clusters pré-omatidiais começa a ocorrer no final do terceiro e começo do quarto instar larval. No começo do quinto instar as células dos clusters omatidiais estão se arranjando e se diferenciando para formar o omatídio completo, porém somente é possível visualizar o rabdômero completo no começo da fase pupal (Fig. 7).

Na parte proximal de cada retínula ocorre o estreitamento de células tipo III para formar axônios (Eisen & Youssef, 1980). Os axônios das nove células retinais se encontram e se estendem perifericamente no omatídio, perfuram a membrana basal, atingindo a lâmina. Os feixes axonais constituindo o nervo óptico de cada rabdômero perfuram a membrana basal e forma sinapses com neurônios de segunda ordem na lâmina (Varela & Porter, 1969). No começo do estágio pupal ocorre o alongamento e distanciamento dos rabdômeros entre si o qual irá durar até momentos antes do nascimento (Eisen & Youssef, 1980).

Durante o quinto instar, que é caracterizado pelo começo do desenvolvimento do rabdômero na epiderme, ocorrem os picos de expressão de *roughest* com relação temporal distinta ao processo de diferenciação do rabdômero e com a formação das projeções axonais do placóide em direção à futura lâmina. A lâmina ainda não está totalmente

desenvolvida na fase pré-pupal a qual irá finalizar seu desenvolvimento somente após a metamorfose (Fig. 6, B3, C e Fig. 7).

5.3 – Aspectos moleculares do desenvolvimento do sistema visual - a proteína Roughest

O sistema visual de insetos é um atrativo modelo para o entendimento de processos de desenvolvimento, especialmente de formação de padrões (*patterning*). Sabe-se que muitos dos fatores e mecanismos que regem estes processos são conservados e compartilhados com vertebrados como as proteínas regulatórias (Eyeless/Pax-6, sine oculis/Six3), componentes de tradução de sinais (Notch/Delta) e proteínas de adesão celular (irreC-rst/Dm-GRASP). Isso evidencia, em termos moleculares, planos básicos de construção de estruturas amplamente diversas no reino animal (Gaul & Cutforth, 1997).

Em *Drosophila*, as células precursoras dos lóbulos ópticos formam um placóide na parte posterior da cabeça na ectoderme embrionária. Este placóide se invagina e eventualmente se funde com o cérebro embrionário (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997). Parte do controle deste processo é realizado pelas moléculas Wingless (Wg) e Decapentaplegic (Dpp) que atuam na regulação e proliferação dos precursores dos lóbulos ópticos e sua decorrente diferenciação (Gaul & Cutforth, 1997). Na fase larval a lâmina e medula são formadas a partir de uma estrutura em formato de ferradura conhecida como centro de proliferação onde as mesmas moléculas atuam de forma decisiva. Se as moléculas Wg e Dpp forem removidas neste momento os precursores da lâmina e da medula falham em assumir seus destinos (Meinertzhagen, 1993; Gaul e Cutforth, 1997).

Durante o último estágio larval em *Drosophila* as estruturas do olho começam a se diferenciar. No disco imaginal do olho a sequência de montagem dos omatídeos é iniciada na parte posterior para a parte anterior após passagem do sulco morfogenético. Os fotorreceptores em diferenciação no sulco morfogenético secretam a proteína Hedgehog (Hh) a qual, provavelmente, dispara a diferenciação nas células anteriores perpetuando o sulco (Gaul & Cutforth, 1997). Na lâmina em desenvolvimento a diferenciação depende diretamente dos sinais das fibras retiniais em desenvolvimento e, portanto, o seu desenvolvimento está estritamente ligado com a diferenciação da retina.

Para o correto estabelecimento da conectividade neuronal e, portanto, no desenvolvimento do lóbulo óptico, a proteína Roughest possui função ímpar. Também conhecida como irregular chiasm C-roughest ou irreC-rst, ela está diretamente ligada ao direcionamento axonal. Segundo Ramos *et al.* (1993) o produto do gene irreC-rst é requerido em pelo menos três lugares independentes: durante o desenvolvimento da retina e em diferentes populações celulares envolvidas na formação do primeiro e segundo quiasma óptico. A proteína Roughest predita em *Apis* apresentou similaridade de 78% com Roughest de *Drosophila*, possuindo os cinco domínios imunoglobulinas conservados o que reflete sua importância durante o desenvolvimento nestas duas espécies. Em uma análise mais detalhada verificamos que a proteína Roughest de *Apis* possui domínio citoplasmático com 40 amino ácidos mais estendido comparado com *Drosophila* (Figs. 9 e 10). Em *Apis* ela apresenta-se com 11 éxons gerando uma proteína de 774 amino ácidos enquanto em *Drosophila* tal possui 10 amino ácidos a menos. Em ambos insetos a proteína Roughest possui cinco domínios imunoglobulina sendo um transmembrana.

A expressão desta proteína é essencial para o alinhamento das células interomáticas que antecede a onda de apoptose no início da vida pupal. A perda desta função *rst-irreC* acarreta quase total falha do programa de morte celular em remover células supérfluas que desorganizam a retina, as quais se diferenciam em células pigmentares dando ao olho uma aparência de “rugoso” (Wolff e Ready, 1991; Araújo *et al.*, 2003).

Em *Apis* tratamento com análogo de hormônio juvenil piriproxifeno durante a fase pré-pupal provocou mudanças no padrão de formação do olho composto. Segundo Boleli *et al.* (2001) o tratamento com piriproxifeno logo antes da metamorfose debilitou o processo de pigmentação e provocou um desarranjo estrutural. Na parte anterior e posterior do olho (faixa não pigmentada e pigmentada respectivamente) o tratamento provocou o aparecimento de vales e elevações que não são observadas nas regiões posteriores do olho. Em ambas regiões, as facetas omatidiais não eram reconhecíveis levando à degeneração dos mesmos.

Pela comparação com os títulos hormonais (Fig. 16, barras) nota-se que a expressão do gene *roughest* ocorre em momentos com baixos títulos de ecdisteróides e de hormônio juvenil em *Apis*. Diferentemente, em *Drosophila* notou-se um aumento de expressão de *roughest* entre 25% e 32% de desenvolvimento pupal (Octacílio-Silva S, 2008), logo no começo de aumento do título de ecdisona Sliter *et al.* (1987). Em ambas espécies a expressão de *roughest* ocorreu em baixos títulos de hormônio juvenil (Fig. 16). Sabe-se que o produto do gene *roughest* também atua coordenando no mecanismo

de morte celular programada. Portanto, provavelmente os efeitos provocados pela aplicação de análogo de hormônio juvenil podem estar ligados com o desarranjo da expressão de *roughest*, dentre outros genes, levando ao fenótipo rugoso observado.

Figura 16: Títulos hormonais (ecdisteróides e hormônio juvenil) em desenvolvimento pos-embrionário de *Drosophila melanogaster* e *Apis mellifera*. As barras na linha inferior mostram a relação temporal com a expressão do gene *roughest*. Os títulos hormonais de *Drosophila* foram obtidos de Sliter *et al.* (1987) e Bownes e Rembold (1987). Títulos hormonais de *Apis* foram adaptados de Hartfelder e Engels (1998).

6 – Conclusões

Verificou-se que o desenvolvimento do lóbulo óptico em *Apis* ocorre por dobramento neuroepitelial a partir de um centro de diferenciação. Este irá originar seqüencialmente a lóbula, a medula e mais tarde, a lâmina.

A lâmina apresentou desenvolvimento mais lento caracterizado por duas fases. A primeira fase ocorre no começo do quinto instar acompanhando o primeiro pico de expressão de *roughest*. A segunda fase (desenvolvimento do córtex) ocorre durante a fase de tecelagem de casulo junto com o segundo pico de expressão de *roughest*. O desenvolvimento completo da lâmina, assim como da lóbula e medula, somente finaliza após a metamorfose.

O presente trabalho apresenta-se como “pedra fundamental” para o desenvolvimento de estudos que visam o esclarecimento desta estrutura sensorial em abelhas. Uma provável continuação será o estudo da expressão diferencial de genes do desenvolvimento do olho composto envolvendo abelhas operárias, rainhas e zangões de *Apis mellífera*. Com isso surge uma intrigante questão: Quais são os padrões moleculares que fazem com que os olhos de zangões sejam maiores e as de rainhas menores do que os de operárias?

Alguns genes candidatos para o estudo são: *sine oculis*, *dachshund*, *eye absent*, *eyeless*, *mini-brain*, *hedgehog* e *irreC-rst*. Tais genes são uma fonte de informações que podem auxiliar a desvendar o padrão molecular de desenvolvimento do olho composto nas castas fêmeas (rainha e operária) e em zangões.

7 - Referências bibliográficas

- Allee, P. J., Pelletier C. L., Fergusson E. K., Champlin D. T, (2006). Early events in adult eye development of the moth, *Manduca sexta*. J. Insect Physiol. 52: 450-460.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410.
- Araújo, H., Machado, L. C. H., Octacílio-Silva, S., Mizutani, M., Silva, M. J. F., Ramos, R. G. P. (2003). Requirement of the *roughest* gene for differentiation and time of death of interommatidial cells during pupal stages of *Drosophila* compound eye development. Mech Dev 120: 537-547.
- Autrum, H., Zwehl, V. V. (1964). Die spektrale Empfindlichkeit einzelner Sehzellen des Bienenauges. Z. vergl. Physiol. 48 :357-384.
- Barchuk, A. R., Cristino, A. S., Kucharski, R., Costa, L. F., Simões, Z. L. P., Maleszka, R. (2007). Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. BMC Dev. Biol. 7:70, doi:10.1186/1471-213X-7-70.
- Beye, M., Hasselmann, M., Fondrk, M. K., Page, R. E., Omholt, S. W. (2003). The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. Cell 114: 419-429.
- Boleli, I. C., Bitondi, M. M. G., Figueiredo, V. L. C., Simões, Z. L. P. (2001). Mispatterning in the ommatidia of *Apis mellifera* pupae treated with a juvenile hormone analogue. J. Morphol. 249: 89-99.
- Boschert, U., Ramos, R. G. P., Tix, S., Technau, G., Fischbach, K. F. (1990). Genetic and developmental analysis of *irreC*, a genetic function required for optic chiasm formation in *Drosophila*. J Neurogenet 6: 153-171.
- Bownes. M., Rembold .H. (1987). The titre of juvenile hormone during the pupal and adult stages of the cycle of *Drosophila melanogaster*. Eur. J. Biochem. 164:709-712.
- Breathnach, R., Chambon, P. (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. AnnU. Rev. Biochem. 50: 349-383.
- Campos-Ortega, J. A., Hartenstein, V. (1997). *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. 2a edição, Springer, Berlin.

- Champlin, D. T., Truman, J. W. (1998a). Ecdysteroid control of cell proliferation during optic lobe neurogenesis in the moth *Manduca sexta*. *Development* 125: 269-277.
- Champlin, D. T., Truman, J. W. (1998b). Ecdysteroids govern two phases of eye development during metamorphosis of *Manduca sexta*. *Development* 125: 2009-2018.
- Clarkson, E., Levi-Setti, R., Horvarth, G. (2006). The eyes of trilobites: the oldest preserved visual system. *Arthropod. Struct.Dev.* 35: 247-259.
- Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., Carré, C., Noselli, S., Leopold, P. (2005). Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* 310: 667-670.
- Cristino, A. S., Nunes, F. M. F., Lobo, C. H., Bitondi, M. M. G., Simões, Z. L. P., Costa, L. F., Lattorff, H. M. G., Moritz, R. F. A., Evans, J. D., Hartfelder, K. (2006) Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality. *Insect Mol. Biol.* 15: 703-714.
- Eisen, J., Youssef, N. N. (1980). Fine structural aspects of the developing compound eye of the honey bee, *Apis mellifera* L. *J. Ultrastruct Res.* 71: 79-94.
- Evans, J. D., Wheeler, D. E. (2000) Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biology* 2.1, 6 pages, [http:// genomebiology.com/2000/2/1/research/0001.1](http://genomebiology.com/2000/2/1/research/0001.1).
- Friedrich M. (2003). Evolution of insect eye development: first insights from fruit fly, grasshopper and flour beetle. *Integr. Comp. Biol.* 43: 58-521.
- Friedrich M. (2006). Ancient mechanisms of visual sense organ development based on comparison of the gene networks controlling larval eye, ocellus and compound eye specification in *Drosophila*. *Arthropod Struct. Develop.* 35:357-378.
- Gaul U., Cutforth T. (1997). The genetics of visual system development in *Drosophila*: specification, connectivity and asymmetry. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 48-54.
- Hafen, E, Dickson, B, Brunner, D, Raabe, T. (1994). Genetic dissection of signal transduction mediated by the sevenless receptor tyrosine kinase in *Drosophila*. *Progr. Neurobiol.* 42: 287-92

- Hartfelder, K., Engels, W. (1998). Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr. Topics Dev. Biol.* 40: 45-77.
- Hartfelder, K., Steinbrück, G. (1997). Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. *Invert. Reprod. Dev.* 31: 237-250.
- Harzsch S., Müller C. H. G., Wolf H., (2005). From variable to constant cell number: cellular characteristics of the arthropod nervous system argue against a sister-group relationship of Chelicerata and “Myriapoda” but favor the Mandibulata concept. *Dev. Genes Evol.* 215: 53-68.
- Helleman, J., Mortier, G., Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8: R19.
- Honey Bee Genome Sequencing Consortium (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443: 931-949.
- Horridge, G.A. (1965). Arthropoda: Receptors for light, and optic lobes. *Em Theodore H. B., Horridge A. (eds.) Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates*, Vol. II., San Francisco: Freeman W.H. pp. 1063-1113.
- Hsiung, F., Moses, K. (2002). Retinal development in *Drosophila*: specifying the first neuron. *Hum. Mol. Genet.* 11: 1207-1214.
- Huang, Z, Kunes, S. (1996). Hedgehog, transmitted along retinal axons, triggers neurogenesis in the developing visual centers of the *Drosophila* brain. *Cell* 86: 411-422.
- Kestilä, M., Lenkkeri, U., Maennikkö, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C. E., Peltonen, L., Holberg, C., Tryggvason, K. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephritic syndrome. *Mol. Cell* 1: 575-582.
- Lehrer, M. (1994). Spatial vision in the honeybee: the use of different cues in different tasks. *Vision Res.* 34: 2363-2385.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25: 402-408.

- Machado, R. C., Pereira, R. N. R., Costa, M. S. A., Ramos, R. G. P. (2002). "In vivo" toxicity of a truncated version of the *Drosophila* Rst-IrreC protein is dependent on the presence of a glutamine-rich region in its intracellular domain. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 74: 285-295.
- MacWhinnie, S. G. B., Allee, J. P., Nelsonm C. A., Riddiford, L. M., Truman, J. W., Champlin, D. T. (2005). The role of nutrition in creation of the eye imaginal disc and initiation of metamorphosis in *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* 285: 285-297.
- Meinertzhagen, I. A., Hanson, T. E. (1993). The development of the optic lobe. *Em Bate, M., Arias, A. M. (eds) The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 1363-1493.
- Menzel, R. (2001). Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn. Mem.* 8: 53-62.
- Menzel, R., Mercer, A. (1987). *Neurobiology and Behavior of Honeybees*. Springer, Berlin.
- Michelette, E. R. F., Soares, A. E. E. (1993). Characterization of preimaginal developmental stages of Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 24: 431-440.
- Mirth, C., Truman, J. W., Riddiford, L. M. (2005). The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 15: 1-12.
- Monsma S. A., Booker R. (1996a). Genesis of the adult retina and outer optic lobes of the moth, *Manduca sexta*. I. Patterns of proliferation and cell death. *J. Comp. Neurobiol.* 367: 10-20.
- Monsma S. A., Booker, R. (1996b). Genesis of the adult retina and outer optic lobes of the moth, *Manduca sexta*. II. Effects of deafferentation and developmental hormone manipulation. *J. Comp. Neurol.* 367: 21-35.
- Myser, W. C. (1954). The larval and pupal development of the honey bee *Apis mellifera* Linnaeus. *Ann. Entom Soc. Am.* 47: 683-711.
- Nelson, J. A. (1924). Morphology of the honeybee larva. *J. Agric Res.* 12: 1167-1214.

- Nilsson, D.-E. (1994). Eyes as optical alarm systems in fan worms and ark clams. *Phil. Trans. R. Soc London - Ser B* 346: 195-212.
- Nilsson, D.-E., Kelber, A. (2007). A functional analysis of compound eye evolution. *Arthropod Struct. Dev.* 36: 373-385.
- Nowikoff, M. (1931). Das Modell des Rhabdoms von Komplexaugen. *Biol. Zentralbl.* 51: 325-329.
- Octacílio-Silva, S. (2008). *Estudo da regulação transcricional de Rst nas etapas finais do desenvolvimento do olho composto de Drosophila melanogaster*. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Paulus, H. F. (2000). Phylogeny of the Myriapoda-Crustacea-Insecta: a new attempt using photoreceptor structure. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 38: 189-208.
- Pfaffl W.M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nuc. Ac. Res.* 29: 2002-2009.
- Phillips, E.F. (1905). Structure of the compound eye of the honey bee. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57: 123-157
- Praagh, J. P. V., Ribi, W. A., Wehrhahn, C., Wittmann, D. (1980). Drone bees fixate the queen with the dorsal frontal part of their compound eyes. *J. Comp. Physiol. A* 136: 263-266.
- Rachinsky, A., Hartfelder, K. (1998). *In vitro* biosynthesis of juvenile hormone in larval honey bees: Comparison of six media. *In Vitro Cell Dev. Biol. - Animal* 34: 646-648.
- Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A., Hartfelder, K. (1990). Caste and metamorphosis - hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen. Comp. Endocr.* 79:31-38.
- Ramos, R. G. P., Igloi, G. L., Bauman, U., Maier, D., Lichte, B., Schneider, T., Brandstatt, J. H., Frohlich, A., Fischbach, K.-F. (1993). The *irregular chiasm C roughest* locus of *Drosophila*, which affects axonal projections and programmed cell death encodes a novel immunoglobulin-like protein. *Gen. Dev.* 7: 2533-2547.

- Ready, D. F., Hanson, T. E., Benzer, S. (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev. Biol.* 53: 217-240.
- Reiter, C., Schimansky, T., Nie, Z., Fischbach, K. F. (1996). Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the *Drosophila* retina: The role of IrreC-rst protein. *Development* 122: 1931-1940.
- Rembold H. (1976). The role of the determinator in caste formation in the honeybee. *Em Lüscher M. (ed.) Phase and Caste Determination in Insects*. Pergamon, Oxford, pp. 21-34.
- Ribi, W. A. (1979). The first optic ganglion of the bee. III. Regional comparison of the morphology of photoreceptor-cell axons. *Cell Tissue Res.* 200: 345-357.
- Ribi, W.A., Engels, E., Engels, W. (1989). Sex and caste specific eye structures in stingless bees and honey bees (Hymenoptera: Trigonidae, Apidae). *Entom. Gener.* 14: 233-242.
- Schmidt Capella, I.C., Hartfelder, K. (1998). Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J. Insect Physiol.* 44: 385-391.
- Schmidt Capella, I. C., Hartfelder, K. (2002). Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honey bee ovary. *Cell Tissue Res.* 307: 265–272
- Schneider, T., Reiter, C., Lichte, B., Nie, Z., Eule, E., Bader, B., Schimansky, T., Ramos, R.G.P., Fischbach, K.-F. (1995). Neural recognition in the optic lobe of *Drosophila*: restricted expression of the cell adhesion molecule IrreC-rst is required for normal axonal projections of columnar neurons. *Neuron* 15: 259-271.
- Sliter, T. J., Sedlak, F. C., Baker, F.C. Schooley, D. A. (1987). Juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*: Identification and titer determination during development. *Insect Biochem.* 17: 161-165.
- Snodgrass, R. E (1956). *Anatomy of the Honey Bee*. Comstock Publ. Assoc., Ithaca and London.
- Stenkamp, D. L., Cameron, D. (2002). Cellular pattern formation in the retina: retinal regeneration as a model system. *Rev. Mol. Vision* 8: 280-93.

- Strünkelnberg, M., Bonengel, B., Moda, L. M., Hertenstein, A., Couet, H. G., Ramos, R. G. P., Fischbach, K. F. (2001). *Rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* 128: 4229-4239.
- Sun, C., Kilburn, D., Lukashin, A., Crowell, T., Gardner, H., Brundiers, R., Diefenbach, B., Carulli, J. P. (2003). *Kirrel2*, a novel immunoglobulin superfamily gene expressed primarily in cells of the pancreatic islets. *Genomics* 82:130-142.
- Treisman, J. E., Heberlein, U. (1998). Eye development in *Drosophila*: formation of the eye field and control of differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 39:119-58
- Truman, J. W., Riddiford, L. M. (1999). The origin of insect metamorphosis. *Nature* 401: 447-452.
- Varela, F. G., Porter, K. R. (1969). Fine structure of the visual system of the honeybee (*Apis mellifera*). I. The retina. *J. Ultrastruct. Res.* 29: 236-259.
- Varela F. G. (1970). Fine structure of the visual system of the honey bee (*Apis mellifera*). II. The lamina. *J. Ultrastruct. Res.* 31: 178-194.
- Vitt, H. H., Hartfelder, K. (1998). Neurogenesis detected by BrdU incorporation in brains of larval honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *J. Insect Morphol. Embryol.* 27: 351-354.
- Warren, J. T., Gilbert, L. I. (1986). Ecdysone metabolism and distribution during the pupal-adult development of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 16: 65-82.
- West-Eberhard, M. J. (2003). *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford Univ. Press, New York.
- Winston, M. L. (1987). *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge.
- Wolff, T. Ready, D. F. (1991). Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. *Development* 113: 825-839.
- Wolff, T. Ready, D. F. (1993). Pattern formation in the *Drosophila* retina. *Em Bate M., Arias A. M.(eds) The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.1277-1327.
- Zdarek J. Haragsim O. (1974). Action of juvenoids on metamorphosis of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Insect Phys.* 20: 209-221.