

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

ANÁLISE DE EXPRESSÃO E *SPLICING* ALTERNATIVO DO
GENE *Mdh-1* DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)

KEIZE NAGAMATI JUNIOR

SÃO CARLOS

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

ANÁLISE DE EXPRESSÃO E *SPLICING* ALTERNATIVO DO
GENE *Mdh-1* DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)

KEIZE NAGAMATI JUNIOR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

Orientador: Dr. Marco Antonio Del Lama

Coorientadora: Dra. Zilá Luz Paulino Simões

SÃO CARLOS

2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

N147ae

Nagamati Junior, Keize.

Análise de expressão e *splicing* alternativo do gene *Mdh-1* de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) / Keize Nagamati Junior. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
98 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Genética molecular. 2. Expressão gênica. 3. Fenotipagem. 4. Malato desidrogenase. I. Título.

CDD: 574.87328 (20^º)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO E *SPLICING* ALTERNATIVO
DO GENE *MDH-1* DE *APIS MELLIFERA* L.
(HYMENOPTERA: APIDAE)**

Dissertação de Mestrado de **Keize Nagamati Junior**

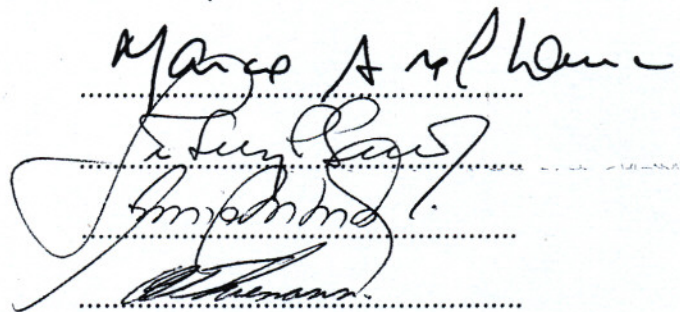
Banca Examinadora

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann


The image shows four handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal dotted line. The signatures are: 1. Marco Antonio Del Lama, 2. Zilá Luz Paulino Simões, 3. Márcia Maria Gentile Bitondi, and 4. Otávio Henrique Thiemann.

*To make a prairie it takes a clover and one bee,
One clover, and a bee,
And reverie.*

Emily Dickinson

*The scientist is not a person who gives the right answers,
he is one who asks the right questions.*

Claude Lévi-Strauss

*Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos se não fora
A presença distante das estrelas!*

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marco Del Lama, pela orientação, pelos ensinamentos e pelas inúmeras oportunidades oferecidas ao longo destes anos.

À Profa. Dra. Zilá Simões, pela coorientação e por me receber gentilmente no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas (LBDA-USP).

À Profa. Dra. Márcia Bitondi, também pela gentileza em me receber no LBDA-USP e pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À Tathyana, aluna de doutorado do LBDA-USP, pelo ensinamento das várias técnicas e contribuição fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À Isabel, técnica do Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH-Ufscar), pelo convívio e auxílio nas análises alozímicas.

Aos colegas do LGEH-Ufscar e de mestrado Cíntia, Camilla e Juliano pela amizade e companhia nas diversas situações proporcionadas por uma pós-graduação.

Aos demais colegas do LGEH-Ufscar Kátia, Thaís, Rogério, Natália, Otávio, Caíto, Juliana e Luana, pela ajuda e pelo convívio agradável.

Aos alunos e técnicos do LBDA-USP, por todo o auxílio prestado durante a realização dos experimentos neste laboratório.

Aos professores membros da banca da qualificação Prof. Gilberto, Profa. Débora e Prof. Otávio, pelos valiosos comentários para aperfeiçoamento deste projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (PPGGEV) pelo auxílio financeiro.

Às secretárias do PPGGEV Greissi e Heloísa, pela paciência por resolver os mais diversos problemas burocráticos.

Aos professores do PPGGEV, que contribuíram significativamente para minha formação.

Ao Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, pelas instalações e facilidades proporcionadas.

Ao CNPq, pela bolsa a mim concedida.

Aos amigos, em especial Ana Lúcia, Cristiane, Danilo, Niara, Rafael, Raquel Carolina e Raquel ..., pela contribuição de alguma maneira fornecida, pelo convívio divertido e pela amizade.

À Ana Karoline, pela presença constante, pelo amor e pela amizade.

À minha família, especialmente aos meus avós Tadashi e Rieko Araki e à minha irmã Luciana, que tanto me ensinam e me motivam a seguir adiante.

Aos meus pais, Moacir e Neide, por todo o amor, compreensão e apoio que sempre estão presentes e permitiram a conclusão de mais essa etapa.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O loco enzimático *Mdh-1*, codificante da malato desidrogenase citoplasmática, possui três alelos comuns – *Mdh-1*¹⁰⁰ (*F*), *Mdh-1*⁸⁰ (*M*) e *Mdh-1*⁶⁵ (*S*) – e tem sido extensivamente utilizado como um marcador racial nos estudos de população de *Apis mellifera*. Análises eletroforéticas demonstram o surgimento de isoformas adicionais durante o desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera*, indicando que o loco apresenta expressão diferencial, e um amplo conjunto de evidências sugere que os alelos deste loco estão sob ação da seleção natural mediada pela temperatura. Neste trabalho, nos propusemos a estudar aspectos moleculares deste loco com o objetivo principal de entender a natureza do polimorfismo observado e os possíveis mecanismos que levam à formação das isoformas adicionais. Nossos resultados sugerem que o alelo *Mdh-1*¹⁰⁰ é ancestral e originou os outros alelos *Mdh-1*⁸⁰ e *Mdh-1*⁶⁵, e que a diferença na mobilidade eletroforética dos produtos destes alelos pode ser atribuída à alteração de um único aminoácido em cada uma das variantes. Em relação à expressão gênica durante o desenvolvimento, pudemos determinar que tanto o loco *Mdh-1* quanto o loco *Mdh-2*, codificante da malato desidrogenase mitocondrial, apresentam elevada expressão durante a fase de larva e no final da fase de pupa, e uma significativa redução durante a transição de larva a pupa. Também determinamos que as isoformas adicionais são características do corpo gorduroso e da hemolinfa, não sendo encontradas em outros tecidos, e surgem no final da fase larval e começam a desaparecer com o início da pigmentação das pupas. Não pudemos identificar as causas que promovem o aparecimento dessas novas isoformas, porém, nossos resultados sugerem que o fenômeno não deve ser devido a *splicing* alternativo ou expressão de um novo gene estágio- e tecido-específicos.

ABSTRACT

Mdh-1 enzyme locus coding for cytoplasmic malate dehydrogenase has three common alleles – *Mdh-1*¹⁰⁰ (F), *Mdh-1*⁸⁰ (M) e *Mdh-1*⁶⁵ (S) – and it has been extensively used as racial marker in populational studies of *Apis mellifera*. Additional isoforms are detected by electrophoretic analysis during ontogenetic development of *A. mellifera*, indicating differential expression of this locus, and a large set of evidences suggests that *Mdh-1* alleles are under temperature-mediated selection. In this work, we proposed to study molecular aspects of this locus aiming to understand the nature of observed polymorphism and possible mechanisms leading to the formation of additional isoforms. Our results suggest *Mdh-1*¹⁰⁰ as the ancestral allele that gave origin to alleles *Mdh-1*⁸⁰ and *Mdh-1*⁶⁵, and electrophoretic mobility differences of allelic products may be attributed to the substitution of a single aminoacid in each variant. Regarding genic expression during development, we're able to determine that both loci *Mdh-1* and *Mdh-2*, coding for mitochondrial malate dehydrogenase, have high expression in larval and late pupal stages, and present a significant decrease in expression during transitional stages between larva and pupa. We also determined that additional isoforms are characteristic of pupae fat body and hemolymph, not being detected in other tissues, appearing at late larval stage and starting to disappear with beginning of pupal pigmentation. We were not able to identify the causes promoting the formation of the new isoforms, but our results suggest that this phenomenon is not due to alternative splicing or expression of a stage- and tissue-specific gene.

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1** – Abelhas das quatro tribos atuais que compõem o grupo dos corbiculados. A: Euglossini. (Foto de Nicole Tharp) B: Apini. (Foto retirada de <http://thesymbioticapparatus.us>) C: Meliponini (Foto de Manoel Mahybe). D: Bombini (Foto de Kerry Matz)..... 5
- Figura 2** – Castas e sexos dos indivíduos de *A. mellifera*. A: operária, fêmea estéril; B: rainha, fêmea reprodutora; C: zangão, macho. Imagens não estão em escala e foram obtidas de *Dorling Kindersley™ Ltd*..... 6
- Figura 3** – Desenvolvimento ontogenético de *Apis mellifera* com fase de ovo, larva, pupa e adulto. Pw: pupa de olho branco; Pp: pupa de olho rosa; Pdp: pupa de olho rosa escuro; Pb: pupa de olho marrom; Pbl: pupa levemente pigmentada; Pbm: pupa moderadamente pigmentada; Pbd: pupa pigmentada; RN: recém-emergido. Adaptado de Elias-Neto *et al.* (2009). Foto do ovo de *The Pennsylvania State University*..... 9
- Figura 4** – Reação catalisada pela malato desidrogenase de conversão reversível do malato a oxaloacetato com redução de NAD^+ a NADH 12
- Figura 5** – Evolução da família LDH/MDH envolvendo dois eventos de duplicação gênica na origem dos três grupos de enzimas: LDH, [LDH-like] MDH e MDH. A, B e E representam os domínios da vida nos quais enzimas de cada grupo da família LDH/MDH já foram identificadas (Archae, Bacteria e Eukarya, respectivamente). Reproduzido com modificações de Madern (2002)..... 15
- Figura 6** – Árvore filogenética de MDHs evidenciando a divisão em dois grupos: citoplasmática e mitocondrial. Baseado nos resultados de Goward & Nichols (1994) e Madern (2002)..... 16
- Figura 7** – Eletroforese em gel de amido representando os fenótipos produzidos pelos alelos comuns da *Mdh-1*. O padrão de três bandas dos heterozigotos deve-se à formação de heterodímeros. Foto: LGEH.... 17
- Figura 8** – Esquematização dos padrões alozímicos da MDHc de *Apis mellifera* observados por Contel *et al.* (1977). A banda intermediária nos heterozigotos indica a estrutura dimérica da enzima. Os fenótipos assinalados com um asterisco (*) representam os padrões observados em pupas, sendo possível visualizar as “bandas adicionais” específicas deste estágio do desenvolvimento..... 20

**Bases moleculares do polimorfismo da malato desidrogenase citoplasmática
(MDHc) de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**

- Figura 1** – Estrutura do gene *Mdh-1* de *Apis mellifera*. Éxons (E) são representados pelas caixas e íntrons (I) pelas linhas; a área hachurada representa as regiões UTR 5' e UTR 3'. O número sobre as linhas e sob as caixas indica o respectivo tamanho em nucleotídeos. A posição dos nucleotídeos dos limites inicial e final de cada exon está representada abaixo das caixas, 1 indicando o primeiro nucleotídeo do códon inicial ATG. Os triângulos pretos invertidos indicam os primers utilizados para amplificação via PCR (primers alelo-específicos não indicados). GB: *Honey Bee Official Gene Set Number*..... 42
- Figura 2** – Polimorfismos encontrados entre os alelos de *Mdh-1* de *Apis mellifera*. A posição do nucleotídeo é dada acima da linha clara e a localização na estrutura do gene é dada acima da linha escura. Polimorfismos localizados em éxons são representados nos códons, com os respectivos aminoácidos codificados indicados. Pontos representam identidade de nucleotídeo e traços representam deleção de nucleotídeo..... 43
- Figura 3** – Diagrama esquematizando as substituições de aminoácidos nos resíduos 114 e 215, que resultam em alteração de carga nas três variantes eletroforéticas de MDHc. A variante F possui dois resíduos carregados negativamente, enquanto M possui um resíduo carregado negativamente e outro de carga neutra; a variante S possui um resíduo carregado negativamente e outro positivamente, anulando as cargas..... 44

**Análise da expressão da malato desidrogenase citoplasmática (MDHc) e
mitocondrial (MDHm) no desenvolvimento ontogenético de *Apis mellifera*
(Hymenoptera: Apidae)**

- Figura 1** – Esquema do padrão eletroforético da MDHc em ovos que originarão operárias, descendentes de um acasalamento entre rainha *Mdh-1⁶⁵/Mdh-1⁶⁵* e zangões *Mdh-1¹⁰⁰*. 1: padrão *Mdh-1⁶⁵/Mdh-1⁶⁵*; 2: ovos (0 – 2 horas); 3: ovos (2 – 4 horas); 4: ovos (5 – 7 horas); 5: ovos (21 – 24 horas); 6: ovos (48 horas); 7: ovos (60 – 64 horas); 8: padrão *Mdh-1¹⁰⁰/Mdh-1⁶⁵*; 9: padrão *Mdh-1¹⁰⁰/Mdh-1¹⁰⁰*..... 64
- Figura 2** – Padrão eletroforético da MDH em diferentes fases do desenvolvimento e em diferentes tecidos de Pw de operárias de *Apis mellifera*. As isoformas específicas do estágio pupal são observadas apenas em

extratos do corpo gorduroso e hemolinfa (5 e 6). 1 e 2: Extrato de larvas L4; 3 e 4: extrato de corpo inteiro de Pw; 5 e 6: extrato de CG; 7: extrato de cérebro; 8: extrato de TD; 9: extrato de Ov; 10 e 11: extrato de corpo inteiro de RN. Em 2, 8 e 9 é possível observar polimorfismo genético da MDH. L4: 4^o estágio larval; Pw: pupa de olho branco; CG: corpo gorduroso; Cér: cérebro; TD: tudo digestivo; Ov: ovário; RN: adultos recém-emergidos..... 65

Figura 3 – Análise semi-quantitativa da expressão dos genes (A) *Mdh-1* e (B) *Mdh-2*. Ambos perfis de expressão se assemelham com a característica curva em U. Em (C), diagrama de correlação entre a expressão de *Mdh-1* e *Mdh-2* (coeficiente de correlação de Spearman = 0,80 $p < 0,0001$)..... 68

Análise de *splicing* alternativo e estudos bioquímicos da malato desidrogenase citoplasmática de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Figura 1 – Filtração em gel em Sephadex G-100 da MDHc de pupas de operárias de *Apis mellifera*. Volumes de eluição idênticos foram obtidos com a soroalbumina bovina e as duas formas da MDHc encontradas em pupas de *A. mellifera*..... 86

Figura 2 – Polimorfismos encontrados nas seqüências de cDNA de clones para as três regiões do gene *Mdh-1*. F5, F7 e F8 referem-se às regiões do gene amplificadas pelos pares de primers F5R6, F7R9 e F8R14, respectivamente. As seqüências utilizadas como referência das três regiões são idênticas ao alelo *Mdh-1*^{100a}..... 87

Figura 3 – Gel de amido 14% para visualização do padrão eletroforético inalterado da MDHc em amostras de pupas tratadas com 10U de enzima fosfatase (*Antarctica Phosphatase* – *New England Biolabs*) por 0 (a), 5 (b), 10 (c), 20 (d), 30 (e), 60 (f), 90 (g) minutos e amostras tratadas somente com tampão por 0 (h), 5 (i), 10 (j), 20 (k), 30 (l), 60 (m) e 90 (n) minutos. (o) amostra sem tratamento..... 88

LISTA DE TABELAS

Bases moleculares do polimorfismo da malato desidrogenase citoplasmática (MDHc) de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Tabela 1 – Primers e respectivos procedimentos experimentais nos quais foram utilizados 41

Análise da expressão da malato desidrogenase citoplasmática (MDHc) e mitocondrial (MDHm) no desenvolvimento ontogenético de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Tabela 1 – Primers utilizados nos experimentos de semi-quantificação por RT-PCR..... 63

Tabela 2 – Atividade da MDH em sucessivos estádios do desenvolvimento ontogenético de operárias de *Apis mellifera*. O ensaio enzimático foi realizado no sentido da oxidação do NADH..... 66

Tabela 3 – Comparação par-a-par dos níveis de expressão dos genes *Mdh-1* (diagonal inferior) e *Mdh-2* (diagonal superior) pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Student-Newman-Keul nas diferentes fases do desenvolvimento ontogenético de *Apis mellifera*. Diferenças significativas são representadas por um asterisco na cor vermelha (*)..... 69

LISTA DE APÊNDICES

Bases moleculares do polimorfismo da malato desidrogenase citoplasmática (MDHc) de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

- APÊNDICE A** – Protocolos utilizados para amplificação alelo-específica dos alelos *Mdh-1⁸⁰* (A) e *Mdh-1⁶⁵* (B)..... 52
- APÊNDICE B** – Sequência nucleotídica do alelo *Mdh-1^{100a}* de *Apis mellifera*. A região em azul corresponde às regiões UTR 5' e UTR 3'; as seqüências dos íntrons estão representadas em vermelho e os códons representados em preto com os respectivos aminoácidos indicados acima. Sítios polimórficos estão sublinhados; possível sinal de poliadenilação está marcado por um retângulo. *: Stop códon..... 53

Análise da expressão da malato desidrogenase citoplasmática (MDHc) e mitocondrial (MDHm) no desenvolvimento ontogenético de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

- APÊNDICE A** – Média normalizada da densitometria óptica das triplicatas técnicas e biológicas de cada fase do desenvolvimento da semi-quantificação por RT-PCR da expressão dos genes *Mdh-1* e *Mdh-2* de *A. mellifera*, com respectivo desvio-padrão (DP) e erro-padrão (Erro)..... 75
- APÊNDICE B** – Perfil de expressão no desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera* de dois genes de esterase, *Est-1* e *Est-3*, obtidos por semiquantificação por RT-PCR (normalizados com o gene *RP49*)..... 76

Análise de *splicing* alternativo e estudos bioquímicos da malato desidrogenase citoplasmática de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

- APÊNDICE A** – Procedência e número de amostras analisadas em eletroforese em gel de amido para o sistema da malato desidrogenase NAD-dependente..... 94

APÊNDICE B – Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo para visualização de produtos de RT-PCR das regiões do gene <i>Mdh-1</i> em amostras de <i>Apis mellifera</i> . 1 – Ladder 100pb; 2 – F7+R9; 3 – F5+R6; 5 – F8+R14; 6 – F7+R9; 7 – F5+R6; 9 – F8+R14. 4 e 8 representam outras combinações de primers não utilizadas neste trabalho. Pw: Pupa de olho branco; Pbd: Pupa pigmentada; Pp CG: corpo gorduroso de pupa de olho rosa; Pdp CG: corpo gorduroso de pupa de olho rosa escuro.....	95
--	----

LISTA DE ANEXOS

Bases moleculares e fenotipagem por amplificação alelo-específica do polimorfismo da malato desidrogenase citoplasmática (MDHc) de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

ANEXO A – Estrutura secundária da MDHc predita a partir da seqüência de aminoácidos da MDHc de suíno (Birktoft *et al.* 1989) (PDB: 4MDH). 'DSSP' indica previsão da estrutura secundária baseada em Kabsch & Sander (1983) e 'Author' indica estrutura secundária aprovada por Birktoft *et al.* (1989). Setas (amarelas) representam estruturas de folha-b, ondulações (marrom) representam estruturas em a-hélice e curvas (roxo) representam ligações por pontes de hidrogênio..... 56

Análise da expressão da malato desidrogenase citoplasmática (MDHc) e mitocondrial (MDHm) no desenvolvimento ontogenético de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

ANEXO A – Curva de titulação do hormônio juvenil e de ecdisterona durante o desenvolvimento de *A. mellifera*. Baseado em Rachinsky *et al.* (1990) e Hartfelder & Engels (1998). Fornecido pelo LBDA-USP..... 77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Hymenoptera	2
1.2 Abelhas e o grupo dos corbiculados	3
1.3 <i>Apis mellifera</i>	5
<u>1.3.1 Origem e Evolução</u>	6
<u>1.3.2 Africanização</u>	8
<u>1.3.3 Ciclo de Vida</u>	9
<u>1.3.4 Genoma</u>	10
1.4 Malato Desidrogenase	12
<u>1.4.1 Estrutura e Mecanismo</u>	13
<u>1.4.2 Evolução da MDH</u>	14
<u>1.4.3 MDHc de <i>A. mellifera</i></u>	17
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	22
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
4 Bases moleculares do polimorfismo da malato desidrogenase citoplasmática (MDHc) de <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae)	35
4.1 Resumo	36
4.2 Introdução	37
4.3 Material e Métodos	38
<u>4.3.1 Amostragem das abelhas</u>	38
<u>4.3.2 Análise alozímica</u>	38
<u>4.3.3 Identificação do gene <i>Mdh-1</i> de <i>A. mellifera</i></u>	39
<u>4.3.4 Extração de DNA e RNA</u>	39
<u>4.3.5 Amplificação via PCR / RT-PCR</u>	39
<u>4.3.6 Análise de Seqüências</u>	40
<u>4.3.7 Amplificação alelo-específica</u>	40
4.4 Resultados	41
<u>4.4.1 Estrutura do gene</u>	41

4.4.2 Polimorfismo e evolução dos alelos de <i>Mdh-1</i> de <i>A. mellifera</i>	42
4.4.3 Bases moleculares do polimorfismo alozímico	44
4.4.4 Fenotipagem por amplificação alelo-específica	44
4.5 Discussão	45
4.6 Referências Bibliográficas	49
APÊNDICE A	52
APÊNDICE B	53
ANEXO A	56
5 Análise da expressão da malato desidrogenase citoplasmática (MDHc) e mitocondrial (MDHm) no desenvolvimento ontogenético de <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae)	58
5.1 Resumo	59
5.2 Introdução	60
5.3 Material e Métodos	61
5.3.1 Material	61
5.3.2 Ensaio espectrofotométrico	61
5.3.3 Inseminação Artificial de Rainha	62
5.3.4 Análise alozímica	62
5.3.5 Extração de RNA e Síntese de cDNA	62
5.3.6 Análise de expressão semi-quantitativa por RT-PCR	62
5.3.7 Análise estatística	63
5.4 Resultados	63
5.4.1 Expressão temporal dos alelos maternos e paternos da <i>Mdh-1</i>	63
5.4.2 Perfil eletroforético da MDHc e da MDHm no desenvolvimento ontogenético e nos diferentes órgãos de <i>A. mellifera</i>	64
5.4.3 Atividade enzimática da MDH no desenvolvimento de <i>A. mellifera</i>	66
5.4.4 Perfil de expressão dos genes <i>Mdh-1</i> e <i>Mdh-2</i>	67
5.5 Discussão	70
5.6 Referências Bibliográficas	73
APÊNDICE A	75

APÊNDICE B	76
ANEXO A	77
6 Análise de <i>splicing</i> alternativo e estudos bioquímicos da malato desidrogenase citoplasmática de <i>A. mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae)	79
6.1 Resumo	80
6.2 Introdução	81
6.3 Material e Métodos	82
<u>6.3.1 Amostras</u>	<u>82</u>
<u>6.3.2 Análise alozímica</u>	<u>82</u>
<u>6.3.3 Amostras para ensaios enzimáticos</u>	<u>83</u>
<u>6.3.4 Determinação do peso molecular</u>	<u>83</u>
<u>6.3.5 Tratamento com neuraminidase</u>	<u>83</u>
<u>6.3.6 Tratamento com fosfatase</u>	<u>84</u>
<u>6.3.7 Efeito de diálise</u>	<u>84</u>
<u>6.3.8 Extração de RNA e Síntese de cDNA</u>	<u>84</u>
<u>6.3.9 Amplificação do cDNA de <i>Mdh-1</i></u>	<u>85</u>
<u>6.3.10 Clonagem e seqüenciamento do cDNA</u>	<u>85</u>
6.4 Resultados	85
<u>6.4.1 Padrão eletroforético da MDHc no desenvolvimento ontogenético em</u> <u>diferentes espécies de abelhas e vespas</u>	<u>85</u>
<u>6.4.2 Determinação do peso molecular da MDHc de <i>A. mellifera</i></u>	<u>86</u>
<u>6.4.3 Análise de <i>splicing</i> alternativo do gene <i>Mdh-1</i></u>	<u>86</u>
<u>6.4.4 Efeito de neuraminidase, diálise e fosfatase sobre o padrão eletroforé-</u> <u>tico da MDHc de pupas de <i>A. mellifera</i></u>	<u>88</u>
6.5 Discussão	88
6.6 Referências Bibliográficas	92
APÊNDICE A	94
APÊNDICE B	95
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	97

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hymenoptera

A ordem Hymenoptera compreende uma grande diversidade de organismos. Com, aproximadamente, 125 mil espécies conhecidas atualmente, há estimativas conservadoras que a diversidade total da ordem varia entre 600 mil a 1,2 milhão de espécies (GASTON, 1991; GRISSELL, 1999). Essa vasta diversidade desconhecida sugere que Hymenoptera pode igualar, ou até mesmo superar, a diversidade dos coleópteros (GRISSELL, 1999; KRISTENSEN, 1999), hoje contendo o maior número de espécies dentre todas as ordens de organismos.

Os espécimes mais antigos de Hymenoptera provêm de formações do Triássico da Austrália, Ásia Central e África (SCHLÜTER, 2000). Após o surgimento no Triássico Superior, há cerca de 230 milhões de anos, a ordem teve eventos de extensiva irradiação no Jurássico, novamente no Cretáceo e durante o Terciário.

Os himenópteros apresentam uma complexa combinação de traços primitivos e numerosos traços derivados únicos, o que resulta em dificuldades para se determinar as relações filogenéticas com as demais ordens de insetos holometábolos. A hipótese filogenética clássica posiciona a ordem Hymenoptera como grupo irmão de Mecopterida (incluindo Diptera e Lepidoptera), com Coleoptera em uma posição mais basal como grupo irmão de Neuropterida (KRISTENSEN, 1999; WHITING, 2002). Porém, estudos recentes propõem uma relação mais próxima entre Coleoptera e Mecopterida, situando Hymenoptera como grupo basal das grandes ordens de insetos holometábolos (SAVARD *et al.*, 2006; WIEGMANN *et al.*, 2009).

Um importante traço derivado apresentado pelos membros da ordem Hymenoptera é o sistema haplodiplóide de determinação do sexo, no qual as fêmeas possuem dois conjuntos cromossômicos (diplóides) e os machos se desenvolvem de ovos não fertilizados e possuem apenas um conjunto cromossômico (haplóides) (HEIMPEL; DE BOER, 2008). Machos diplóides ocorrem ocasionalmente, e este tópico, assim como a viabilidade destes machos, principalmente nos grupos sociais, tem sido interesse de numerosos estudos (DUCHATEAU; MARIËN, 1995; ELIAS *et al.*, 2009; TAKAHASHI *et al.*, 2001; ZAYED; PACKER, 2001).

A ordem Hymenoptera tem sido dividida em duas subordens: Symphyta e Apocrita. A subordem Symphyta (*sawflies* - “moscas-serra” - e *wood wasps* - “vespas da madeira”) é um grupo parafilético agrupando as famílias mais basais da ordem Hymenoptera (VILHELMSSEN, 2001). A subordem Apocrita, monofilética, apresenta uma grande diversidade e é caracterizada pela ocorrência de uma constrição entre o primeiro e o segundo segmento abdominal dos indivíduos (SHARKEY, 2007). Essa subordem é subdividida em dois grupos: Parasítica, grupo parafilético no qual quase todos os membros são parasitas ou parasitóides, e Aculeata, grupo monofilético, caracterizado pela modificação do ovipositor em ferrão, que compreende outros grupos de vespas, as formigas e as abelhas.

1.2 Abelhas e o grupo dos corbiculados

As abelhas estão entre os insetos mais conhecidos, ainda que somente por algumas espécies, e estão amplamente inseridas na cultura popular. O comportamento social é, provavelmente, a característica mais associada às abelhas; porém, está presente em apenas uma pequena parcela da diversidade das abelhas, sendo a maioria delas solitárias (MICHENER, 1974). O hábito polívoro também é característico das abelhas (com raras exceções – CAMARGO; ROUBIK, 1991), realizando serviços ecológicos essenciais como polinizadores (LOSEY; VAUGHAN, 2006).

As abelhas constituem uma linhagem monofilética derivada de vespas esfeciformes (ENGEL, 2001; MELO, 1999; MICHENER, 2000). O registro geológico das abelhas é bastante escasso, porém sua história evolutiva é relativamente bem compreendida. O registro fóssil mais antigo de uma abelha vem do Cretáceo Superior do norte de Mianmar (Sudeste Asiático) e demonstra que muitos dos traços atuais das abelhas já estavam presentes há 100 milhões de anos (POINAR; DANFORTH, 2006). A divergência da linhagem das abelhas com a das vespas crabronídeas (o provável grupo irmão das abelhas) (MELO, 1999) deve ter ocorrido há, aproximadamente, 120 milhões de anos, pouco anterior ao aumento significativo da diversidade das angiospermas, suportando a relação freqüentemente sugerida entre as abelhas e as fanerógamas.

As cerca de 20 mil espécies de abelhas conhecidas atualmente são classificadas, no modelo tradicional, em sete famílias separadas em dois grupos

informais: as abelhas de língua curta (*short-tongued*) (Andrenidae, Colletidae, Halictidae, Melittidae e Stenotritidae) e abelhas de língua longa (*long-tongued*) (Apidae e Megachilidae). Não existe um agrupamento formal para as famílias de abelhas, já que estas estão inseridas na superfamília Apoidea, que também compreende famílias de vespas esfecídeas da antiga superfamília Sphecoidea. Denominações informais como Apiformes ou Anthophila têm sido utilizadas para se referir ao conjunto das abelhas, entretanto, recentemente Melo & Gonçalves (2005) propuseram uma reclassificação na qual todas as abelhas estão agrupadas em subfamílias dentro da família Apidae.

O grupo de abelhas mais estudado provavelmente é o dos corbiculados, que inclui espécies economicamente importantes e que apresentam um complexo comportamento social. A principal característica deste grupo é a presença da corbícula, uma modificação estrutural na tíbia do último par de pernas das fêmeas para o transporte de pólen. Os corbiculados são um grupo monofilético inseridos na subfamília Apinae (ROIG-ALSINA; MICHENER, 1993), consistindo de quatro tribos modernas: Apini, Meliponini, Bombini e Euglossini (Figura 1). Essas tribos também são monofiléticas (MICHENER, 2000), porém a relação filogenética entre elas ainda é bastante controversa, com nove das 15 possíveis topologias sendo suportada por, pelo menos, um marcador morfológico ou molecular (CARDINAL; PACKER, 2007; KAWAKITA *et al.*, 2008).

Os Euglossini, as abelhas das orquídeas, com mais de 175 espécies conhecidas, distribuídas em 5 gêneros (CAMERON, 2004), usualmente apresentam comportamento solitário, comunal ou primitivamente eussocial (AUGUSTO; GARÓFALO, 2004; GARÓFALO *et al.*, 1998; SOUCY; GIRAY, 2003). A tribo Bombini compreende as mamangavas, 239 espécies inseridas em um único gênero *Bombus*, e apresentam comportamento primitivamente eussocial (sociedades com divisão de castas, porém estas não são morfológicamente diferenciadas) (WILLIAMS, 1998). A tribo Meliponini, as abelhas sem ferrão, compreende quase 500 espécies em 56 gêneros, com distribuição restrita a regiões tropicais e subtropicais e comportamento altamente eussocial (sociedades com castas morfológicamente diferenciadas) (CAMARGO; PEDRO, 1992). A tribo Apini possui apenas um gênero, *Apis*, com onze espécies (LO *et al.*, 2010) apresentando comportamento altamente eussocial, incluindo a espécie mais estudada de abelha, *Apis mellifera*.



Figura 1 – Abelhas das quatro tribos atuais que compõem o grupo dos corbiculados. A: Euglossini. (Foto de Nicole Tharp) B: Apini. (Foto retirada de <http://thesymbioticapparatus.us>) C: Meliponini (Foto de Manoel Mahybe). D: Bombini (Foto de Kerry Matz).

1.3 *Apis mellifera*

A abelha comum ou abelha-do-mel, *Apis mellifera*, é uma das abelhas mais conhecidas e de intensa presença no cotidiano da sociedade moderna. A associação entre humanos e *A. mellifera* é bastante antiga, evidenciada por pinturas em cavernas datadas de 7000 anos atrás (CRANE, 1999). Essa espécie tem sido utilizada em benefício do homem por meio da apicultura para obtenção de produtos como mel, cera, própolis e geléia real. Outra grande importância dessa abelha está relacionada com a polinização de culturas, conferindo-lhe também um grande valor econômico (LOSEY; VAUGHAN, 2006; SOUTHWICK; SOUTHWICK JR., 1992).

Uma das características mais marcantes de *A. mellifera* é o comportamento eussocial. A eussocialidade corresponde a um complexo comportamento social caracterizado pela sobreposição de gerações, divisão do trabalho reprodutivo e cuidado cooperativo da prole, tendo surgido entre as abelhas várias vezes de forma independente (CAMERON; MARDULYN, 2001; DANFORTH, 2002). Os indivíduos

de *A. mellifera* vivem em colônias constituídas por uma única fêmea reprodutiva, a rainha (Figura 2B), e milhares de fêmeas geralmente estéreis, as operárias (Figura 2A), que são morfologicamente diferentes da rainha e realizam o restante do trabalho para manutenção da colônia, como cuidado dos juvenis, limpeza da colméia e forrageio. Sazonalmente são produzidos machos, os zangões (Figura 2C), com a principal função de se acasalar com rainhas de outras colônias, mas que podem auxiliar na termorregulação da colônia (KOVAC *et al.*, 2009).

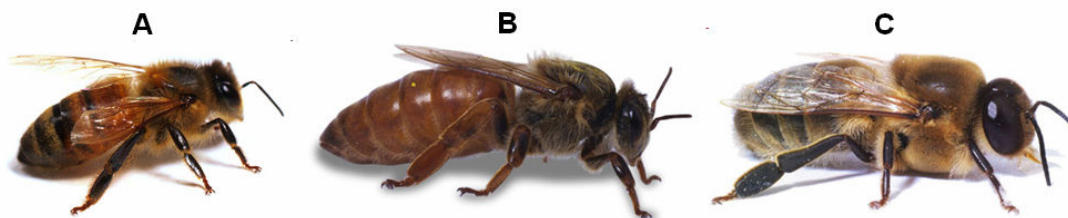


Figura 2 – Castas e sexos dos indivíduos de *A. mellifera*. A: operária, fêmea estéril; B: rainha, fêmea reprodutora; C: zangão, macho. As imagens não estão em escala e foram obtidas de *Dorling Kindersley™ Ltd.*

A cooperação e o altruísmo envolvidos na eussocialidade são assuntos dos mais intrigantes da biologia evolutiva. A seleção por parentesco, potencializada pela assimetria de parentesco genético originada no interior da colônia pela haplodiploidia, tem sido proposta para explicar a origem e manutenção deste comportamento (FOSTER *et al.*, 2006; HAMILTON, 1964; mas ver WILSON; HÖLLDOBLER, 2005). Para os estudos da socialidade, de identificação de genes envolvidos no comportamento social, de fatores envolvidos na diferenciação de castas, de investigação dos efeitos de parentesco e diversidade genética nas colônias, da ecologia comportamental, entre outros, *Apis mellifera* se tornou um organismo-modelo (e.g. ROBINSON *et al.*, 2005).

1.3.1 Origem e Evolução

O gênero *Apis*, provavelmente, surgiu no início do Oligoceno, há cerca de 30 a 40 milhões de anos, visto que os fósseis mais antigos encontrados em formações da

Europa datam desse período (ENGEL, 1998).

As espécies *A. mellifera* e *A. cerana* são consideradas espécies irmãs e as mais derivadas do gênero. A cladogênese das espécies, estima-se, ocorreu entre 6 e 8 milhões de anos atrás de acordo com análises de fósseis, dados de alozimas e seqüências do DNA mitocondrial (ARIAS; SHEPPARD, 2005; SHEPPARD; BERLOCHER, 1989). Entretanto, estima-se que a divergência das subespécies de *A. mellifera* tenha ocorrido há apenas entre 0,7 a 1,3 milhões de anos. Devido à distribuição restrita no continente asiático de todas as espécies do gênero *Apis*, com exceção de *A. mellifera* (com distribuição original da África Subsaariana até a Ásia Central e Norte da Europa), acreditava-se na hipótese na qual as duas espécies teriam divergido na Ásia e, em seguida, *A. mellifera* teria se expandido para a Europa e África (RUTTNER, 1988; SHEPPARD; MEIXNER, 2003). Entretanto, estudos recentes baseados em SNPs dão suporte para a hipótese alternativa na qual *A. mellifera* teria se originado no continente africano e, então, expandido para a Eurásia (WHITFIELD *et al.*, 2006).

As abelhas *A. mellifera* possuem uma grande capacidade de colonizar diferentes ambientes e se adaptar a diversas condições ecológicas, o que levou a origem de diversas 'raças geográficas', isto é, subespécies adaptadas a determinadas áreas geográficas. No momento, são reconhecidas 28 subespécies de *A. mellifera* (RUTTNER, 1988; SHEPPARD *et al.*, 1997; SHEPPARD; MEIXNER, 2003), agrupadas de acordo com características morfométricas, biogeográficas e comportamentais em cinco diferentes linhagens evolutivas (ou ramos evolutivos) propostas por Ruttner *et al.* (1978) e Ruttner (1988).

As linhagens evolutivas de *A. mellifera* são:

- Linhagem A: Característico das subespécies africanas: *A. m. adansonii*, *A. m. capensis*, *A. m. intermissa*, *A. m. lamarckii*, *A. m. litorea*, *A. m. major*, *A. m. monticola*, *A. m. sahariensis*, *A. m. scutellata*, *A. m. siciliana* e *A. m. unicolor*.
- Linhagem M: Subespécies da Europa Ocidental *A. m. iberiensis* e *A. m. mellifera*.
- Linhagem C: Subespécies do leste europeu e mediterrâneo *A. m. carnica*, *A. m. cecropia*, *A. m. macedonica*, *A. m. ligustica*, *A. m. ruttneri* e *A. m. sicula*.
- Linhagem O: Subespécies do Oriente Médio *A. m. adami*, *A. m. anatoliaca*, *A. m. armeniaca*, *A. m. caucasica*, *A. m. cypria*, *A. m. meda*, *A. m. pomonella* e *A. m. syriaca*.

- Linhagem Y: *A. m. yemenitica*, subespécie da região africana da Etiópia e Sudão.

Os dados moleculares de DNA mitocondrial suportam as linhagens A, M, C e O (FRANCK *et al.*, 2000; GARNERY *et al.*, 1992). Entretanto, as espécies *A. m. caucasica* e *A. m. anatoliaca*, inseridas no ramo O, apresentam mtDNA característico da linhagem C (GARNERY *et al.*, 1992; SMITH *et al.*, 1997). A subespécie *A. m. meda*, também inserida no ramo O, apresenta haplótipos mitocondriais tanto da linhagem O quanto da linhagem C e *A. m. lamarckii*, inserida na linhagem A, também apresenta haplótipos mitocondriais da linhagem O (FRANCK *et al.*, 2000).

A distribuição original de *A. mellifera* tem sido sistematicamente alterada por introduções antrópicas associadas ao seu alto valor econômico, de maneira que a espécie pode ser encontrada distribuída por todos os continentes. Como resultado dessa atividade humana, as linhagens antes alopátricas passaram a se misturar e resultou na formação de híbridos. Muitos estudos têm sido realizados para se conseguir discriminar as linhagens evolutivas e composição genética dessas populações introduzidas, com um caso especial conhecido por 'Africanização'.

1.3.2 Africanização

A introdução da abelha *A. mellifera* no continente americano ocorreu a partir do século XVII (CRANE, 1975), inicialmente com a subespécie *A. mellifera mellifera*, seguida por introduções de outras subespécies européias. Em meados da década de 1950, um projeto brasileiro visando aumentar a baixa produção de mel dos apiários com colônias de subespécies européias resultou na introdução da subespécie africana *A. m. adansonii* (atual *A. m. scutellata*) no país. Em 1956, o pesquisador W. E. Kerr trouxe rainhas da subespécie para um apiário na região de Rio Claro, SP, Brasil. No ano seguinte ocorreu um escape acidental de 26 rainhas dessa subespécie africana, dando início ao processo de africanização das abelhas no continente americano, um dos mais rápidos e bem sucedidos eventos de invasão biológica.

A colonização pela subespécie *A. m. scutellata* se deu pela substituição das colônias européias ou pelo intercruzamento com as subespécies européias previamente existentes, formando híbridos que com o tempo apresentaram uma

tendência de perder as características européias e as terem substituídas pelas africanas (SCHNEIDER *et al.*, 2004). Em 1970, as abelhas africanizadas já haviam atingido o sul da Argentina, e em 1990 alcançado o sul dos Estados Unidos, assim, rapidamente colonizaram praticamente todo o continente em menos de 50 anos.

O estudo deste processo resultou em uma ampla literatura, abordando tópicos como as características da subespécie africana que favoreceram o sucesso adaptativo no continente americano, a prevalência das características africanas, o grau de hibridação e as origens raciais das populações africanizadas.

1.3.3 Ciclo de Vida

Como um inseto holometábolo, *A. mellifera* apresenta um desenvolvimento que pode ser dividido em quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 3). O tempo de desenvolvimento depende de condições ambientais e da subespécie, podendo variar de 16 dias (média para as rainhas) até 24 dias (média para os zangões), sendo que o desenvolvimento das subespécies tropicais é levemente menor. As abelhas africanizadas possuem um tempo de desenvolvimento intermediário entre as subespécies européias e africanas (MICHELETTE; SOARES, 1993).

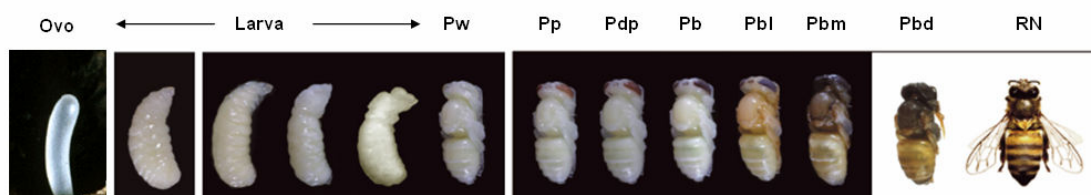


Figura 3 – Desenvolvimento ontogenético de *Apis mellifera* com fases de ovo, larva, pupa e adulto. Pw: pupa de olho branco; Pp: pupa de olho rosa; Pdp: pupa de olho rosa escuro; Pb: pupa de olho marrom; Pbl: pupa levemente pigmentada; Pbm: pupa moderadamente pigmentada; Pbd: pupa pigmentada; RN: recém-emergido. Adaptado de Elias-Neto *et al.* (2009). Foto do ovo de *The Pennsylvania State University*.

Os ovos são postos pela rainha em células específicas do sexo e da casta do indivíduo a ser formado. Ovos não fertilizados, portanto haplóides, geralmente se desenvolvem em zangões, e ovos fertilizados, diplóides, originam fêmeas, que podem vir a ser operárias ou rainhas. A eclosão ocorre, em média, 72 horas após a

postura, com a gradual dissolução do cório e liberação da larva.

O estágio larval é, basicamente, um período de alimentação e crescimento, refletido na ausência de muitas estruturas nas larvas. As larvas são alimentadas em suas células pelas operárias nos primeiros dias com geléia real; em seguida, apenas as larvas que se tornarão rainhas continuam a ser alimentadas com geléia real, enquanto as demais passam a ser alimentadas com néctar e pólen. No último dos cinco estádios larvais, as operárias fecham as células e as larvas cessam a alimentação, defecam e começam a tecer o casulo, seguida da penúltima apólise que corresponde à metamorfose para a pupa, obtendo a forma da abelha adulta.

A pupa é a fase de transição da morfologia pouco diferenciada do estágio larval para o adulto altamente especializado. Utilizando somente as reservas energéticas acumuladas no estágio larval, durante este período ocorrem diversas alterações fisiológicas e morfológicas, muitas também relacionadas com a diferenciação das castas. As fases do estágio pupal são caracterizadas pela coloração dos olhos e pelo processo de pigmentação da cutícula do indivíduo. Após a ecdise final, o indivíduo adulto emerge da célula.

Após a emergência, o desenvolvimento é completo após alguns dias, com o endurecimento da cutícula, desenvolvimento glandular e crescimento dos corpos gordurosos. No caso dos zangões e da rainha, ocorre também o desenvolvimento dos órgãos reprodutores. A longevidade dos indivíduos depende de inúmeras variáveis como fatores genéticos, disponibilidade de alimento e fatores sazonais. A maior longevidade é observada para as rainhas, que vivem em média de 1 a 3 anos; os zangões vivem em média 30 dias. A maior variação é observada entre as operárias, que podem viver de 12 dias a até mais de 300 dias; as abelhas africanizadas parecem possuir uma longevidade menor do que as das subespécies européias. Um interessante comportamento observado entre as operárias é o polietismo etário, no qual os indivíduos realizam diferentes tarefas de acordo com sua idade (na verdade, de acordo com características fisiológicas que se modificam com o tempo, mas podem ser revertidas em determinadas situações) (WINSTON, 1991, e referências contidas).

1.3.4 Genoma

O conjunto de características interessantes de *A. mellifera* levou este a ser o

quinto inseto a ter o genoma completamente seqüenciado. Com tamanho estimado em 262 +/- 1Mb, o genoma de *A. mellifera* apresenta importantes diferenças em relação ao genoma seqüenciado de outros insetos (*Anopheles gambiae*, *Aedes aegyptii*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster* e *Drosophila pseudoobscura*) (ROBINSON *et al.*, 2006).

Uma das principais distinções refere-se à composição do genoma. O conteúdo de A+T presente no genoma de *A. mellifera*, 67%, é significativamente maior do que em outros insetos como *D. melanogaster* (58%) e *A. gambiae* (56%). Os genes de *A. mellifera* estão presentes mais freqüentemente em regiões do genoma ricas em A+T, apresentando conteúdo médio de G+C de apenas 29%. Em contraste, dinucleotídeos CpG estão representados 1,67 vezes acima do esperado pelas freqüências de mononucleotídeos, uma característica única entre os genomas eucariotos seqüenciados (HONEY BEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006).

A disponibilização do genoma permitiu o avanço em estudos moleculares em diversas áreas de pesquisa. Em relação a *D. melanogaster* e *A. gambiae*, *A. mellifera* possui menor número de genes relacionados a enzimas de detoxificação (CLAUDIANOS *et al.*, 2006), imunidade (EVANS *et al.*, 2006), proteínas de cutícula e receptores gustativos, porém mais genes de receptores de odores e novos genes relacionados com a utilização de néctar e pólen, refletindo a ecologia e comportamento social da espécie (HONEY BEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006). É interessante, entretanto, que a abelha apresenta semelhanças com *D. melanogaster* em funções que diferem grandemente entre as duas espécies, como determinação do sexo (CHO *et al.*, 2007).

O genoma de *A. mellifera* também evidenciou muitas características mais semelhantes aos vertebrados do que aos outros insetos. Por exemplo, a retenção de 80% dos introns ancestrais, o compartilhamento único de determinados genes (MATSUI *et al.*, 2009), o ritmo circadiano mais similar ao de mamíferos (RUBIN *et al.*, 2006), e a presença de um sistema completo de metilação de DNA (WANG *et al.*, 2006).

As diferenças em relação a outros insetos e algumas das similaridades com os vertebrados são indicativos de que a divergência de *A. mellifera* ocorre a uma taxa evolutiva mais lenta (HONEY BEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006).

1.4 Malato Desidrogenase

Malato desidrogenase é o nome aceito de, pelo menos, sete enzimas no sistema de nomenclatura e classificação da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) (ENZYME NOMENCLATURE, 1992; para atualizações e modificações recentes ver <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>). Dessas enzimas, entretanto, somente aquelas que catalisam a conversão reversível de L-malato a oxaloacetato utilizando o sistema de cofator $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ (Figura 4) são comumente referidas como malato desidrogenase (E.C. 1.1.1.37 e E.C. 1.1.1.82).

A malato desidrogenase mais comum e bem estudada é a malato desidrogenase NAD-dependente (L-malato: NAD^+ oxidoreductase; MDH; E.C. 1.1.1.37). A enzima MDH desempenha papel importante no metabolismo central dos organismos e já foi identificada em organismos dos três domínios da vida: Archaea, Bacteria e Eukarya (GOWARD; NICHOLLS, 1994).

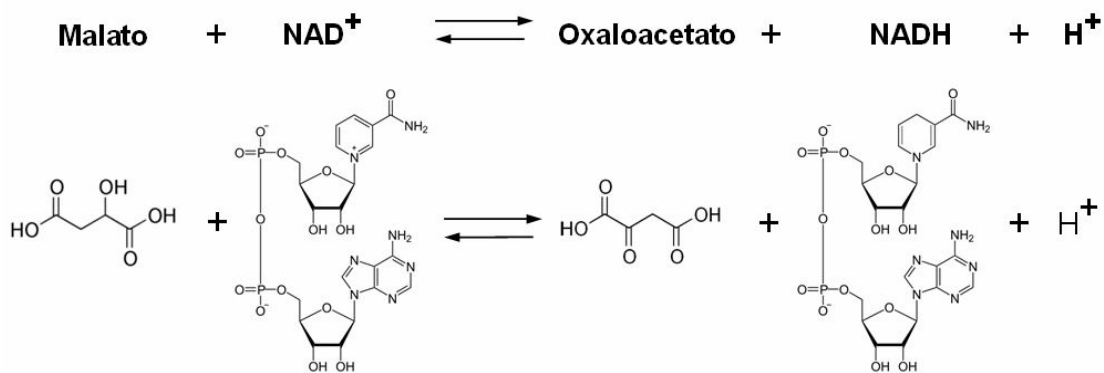


Figura 4 – Reação catalisada pela malato desidrogenase de conversão reversível do malato a oxaloacetato com redução de NAD^+ a NADH .

Nos eucariontes, a enzima ocorre tanto no citoplasma (malato desidrogenase citoplasmática ou solúvel – MDHc ou MDHs) quanto nas mitocôndrias (malato desidrogenase mitocondrial – MDHm); nos vegetais também são encontradas isoformas nos cloroplastos (MDHch) e microcorpos (glioxissomos (MDHg) e perioxissomos (MDHp)). As isoformas dos microcorpos também estão presentes em

alguns fungos. Cada isoforma é codificada por um gene nuclear distinto, apresenta propriedades físico-químicas específicas e tem atuação em vias metabólicas associadas com sua localização (e.g. GIETL, 1992).

A MDHg participa do ciclo do glicolato, que converte duas moléculas de acetil-CoA produzidas pela β -oxidação de ácidos graxos em uma molécula de succinato. A MDHp é idêntica à encontrada nos glioxissomos e está envolvida na fotorrespiração. Nos cloroplastos, são encontradas tanto a malato desidrogenase NAD-dependente quanto uma forma NADP-dependente, ambas essenciais para a fixação de CO₂. A MDHc é componente do *shuttle* da malato-aspartato, atuando na transferência de equivalentes redutores entre o citossol e a matriz mitocondrial na forma de malato/oxaloacetato. A MDHm possui uma função dupla, participando no *shuttle* do malato-aspartato e no ciclo do ácido tricarboxílico. O oxaloacetato produzido na reação catalisada pela MDH também participa de outros importantes processos metabólicos, incluindo a síntese de aminoácidos e a gliconeogênese.

1.4.1 Estrutura e Mecanismo

A MDH é uma enzima dimérica com subunidades de peso molecular entre 30 a 40 KDa. Enzimas tetraméricas com atividades de MDH também já foram identificadas (LEE *et al.*, 2001; SUNDARAM *et al.*, 1980), e são referidas como [LDH-like] MDH. Enzimas com ambos os estados oligoméricos apresentam atividade (MADERN *et al.*, 2001).

Cada subunidade funciona de forma independente sem cooperação entre os sítios catalíticos (MCEVILY *et al.*, 1985); entretanto, existem evidências de que a atividade enzimática depende da estrutura quaternária (BREITER *et al.*, 1994). As subunidades da enzima são compostas de dois domínios distintos. A metade amino-terminal da molécula contém o domínio de ligação de NAD, formado pelo motivo Rossmann, característico de ligação de nucleotídeos, com quatro folhas β e uma alfa-hélice. O domínio carboxi-terminal contém os sítios de ligação de substrato e sítios envolvidos no mecanismo catalítico (HALL *et al.*, 1992).

Estudos cinéticos demonstram que a reação de conversão de malato a oxaloacetato é ordenada, com a ligação de NAD/NADH ocorrendo inicialmente, seguida pela ligação do ácido dicarboxílico (SILVERSTEIN; SULEBELE, 1969). A comparação de seqüências da MDH de diversos organismos, estudos estruturais e

de mutagênese possibilitaram a identificação dos sítios importantes para a atividade da enzima (GOWARD; NICHOLS, 1994). A numeração dos resíduos segue o estabelecido por Eventoff *et al.* (1977).

O resíduo Asp-53 é importante para a ligação e especificidade da coenzima. A substituição de apenas três resíduos em um loop, incluindo o resíduo Asp-53, na MDH de *Thermus flavus* altera a especificidade de NAD^+ para NADP^+ (NISHIYAMA *et al.*, 1993). O sítio ativo da MDH consiste de um vacúolo hidrofóbico que contém sítios para a ligação do substrato e do anel de nicotinamida de NAD^+ . O par de resíduos His-195 e Asp-168 forma um sistema de transferência de prótons no sítio ativo (BIRKTOFT; BANASZAK, 1983), e três resíduos de arginina são importantes para a ligação do substrato e catálise. Arg-102 e Arg-171 contribuem para a ligação e orientação do substrato no sítio ativo, e Arg-109 está envolvido na estabilização do substrato durante o estado de transição. Todos esses resíduos se apresentam conservados em todas as seqüências de MDH conhecidas (GOWARD; NICHOLS, 1994).

1.4.2 Evolução da MDH

A MDH é uma enzima da classe das desidrogenases NAD-dependentes, uma das mais bem estudadas e com mais de 100 membros conhecidos. Em conjunto com a lactato desidrogenase (L-lactato: NAD^+ oxidoreductase; LDH; E.C. 1.1.1.27), enzima tetramérica NAD-dependente que catalisa a interconversão de lactato e piruvato, forma uma superfamília de proteínas encontradas nos três domínios da vida.

A MDH e a LDH são proximamente relacionadas como é demonstrado pelas similaridades nas seqüências, nas estruturas tridimensionais e propriedades bioquímicas, e sugere que derivam de um ancestral comum (BIRKTOFT *et al.*, 1982; MCALISTER-HENN, 1988). A alteração de um único resíduo na posição 102, na qual a MDH apresenta uma arginina conservada, enquanto a LDH possui geralmente uma glicina, é suficiente para alterar a especificidade de substrato das duas enzimas entre oxaloacetato e piruvato (WILKS *et al.*, 1988; CENDRIN *et al.*, 1993; BOERNKE *et al.*, 1995). A descoberta das LDH-like MDH, enzimas que possuem atividade MDH com estrutura que se assemelha mais à LDH, reforça a hipótese de uma origem evolutiva comum (CENDRIN *et al.*, 1993).

As análises filogenéticas realizadas por Madern (2002) fornecem um cenário mais detalhado para a evolução da superfamília MDH/LDH (Figura 5). De acordo com o autor, o putativo gene ancestral seria codificante de uma enzima tetramérica com atividade de MDH, semelhante às enzimas [LDH-like] MDH. Após uma duplicação deste gene ancestral, uma das cópias sofreu mutações relacionadas ao estado oligomérico da proteína, mas não com a função, produzindo uma linhagem de enzimas diméricas com atividade de MDH (grupo MDH) cuja evolução será discutida a seguir. A outra cópia do gene teria passado por um segundo evento de duplicação gênica. Um dos genes manteve as características ancestrais e originou o grupo [LDH-like] MDH, enzimas tetraméricas com atividade MDH, enquanto a outra cópia do gene sofreu mutações associadas com a alteração da função e resultou no grupo LDH, enzimas tetraméricas com atividade LDH.

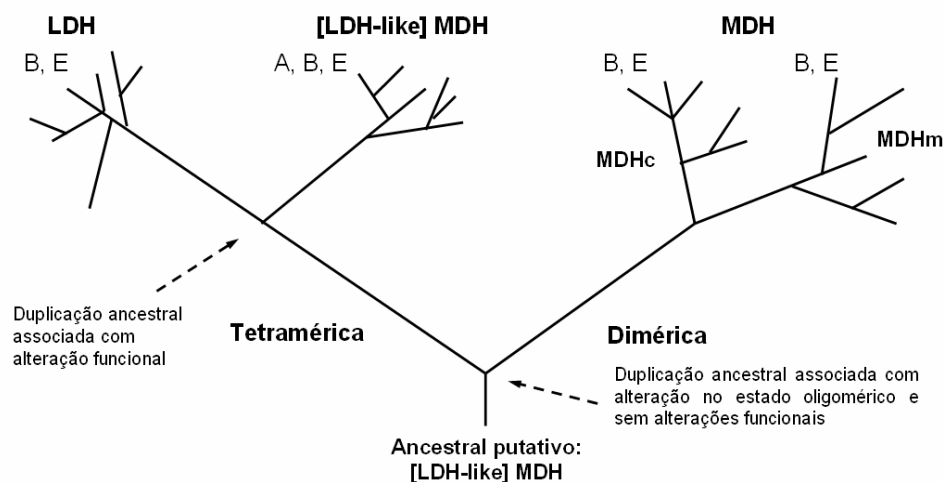


Figura 5 – Evolução da família LDH/MDH envolvendo dois eventos de duplicação gênica na origem dos três grupos de enzimas: LDH, [LDH-like] MDH e MDH. A, B e E representam os domínios da vida nos quais enzimas de cada grupo da família LDH/MDH já foram identificadas (Archae, Bacteria e Eukarya, respectivamente). Reproduzido com modificações de Madern (2002).

No grupo MDH, as análises de seqüências primárias das enzimas de diversos organismos demonstram que mesmas isoformas em diferentes espécies apresentam maior similaridade do que isoformas distintas dentro da mesma espécie (JOH *et al.*, 1987; MCALISTER-HENN, 1988). Por exemplo, a MDHm de suíno apresenta

identidade de apenas 19,6% com a MDHc de suíno; entretanto, a identidade observada entre a MDHm de suíno com a MDHm de levedura é de 53,6%. Esta característica difere o grupo MDH de outros sistemas de isozimas compartimentalizados, como citrato sintase e aspartato-aminotransferase, indicando uma divergência mais recente de um gene ancestral (MCALISTER-HENN, 1988).

Análises filogenéticas demonstram que o grupo MDH diverge em dois cladros distintos (Figura 6). Um dos cladros compreende as isoformas MDHm, MDHp, MDHg e MDHch (NAD-dependente) junto com a maior parte das MDH de procariontes (e.g. *Escherichia coli*). A outra linhagem compreende as MDHc e MDHch (NADP-dependente) e alguns membros procariontes (e.g. *Thermus flavus*). A observação de que a MDHm de eucariontes está mais relacionada com a MDH de *E. coli* (identidade de 58,3%) do que com a MDHc de eucariontes, e de que esta apresenta maior similaridade com a MDH de outro procarionte, 52% de identidade com a de *T. flavus*, se encaixa na teoria endossimbiótica e sugere que o evento de duplicação gênica precedeu a origem dos eucariontes (JOH *et al.*, 1987; MCALISTER-HENN, 1988; MADERN, 2002).

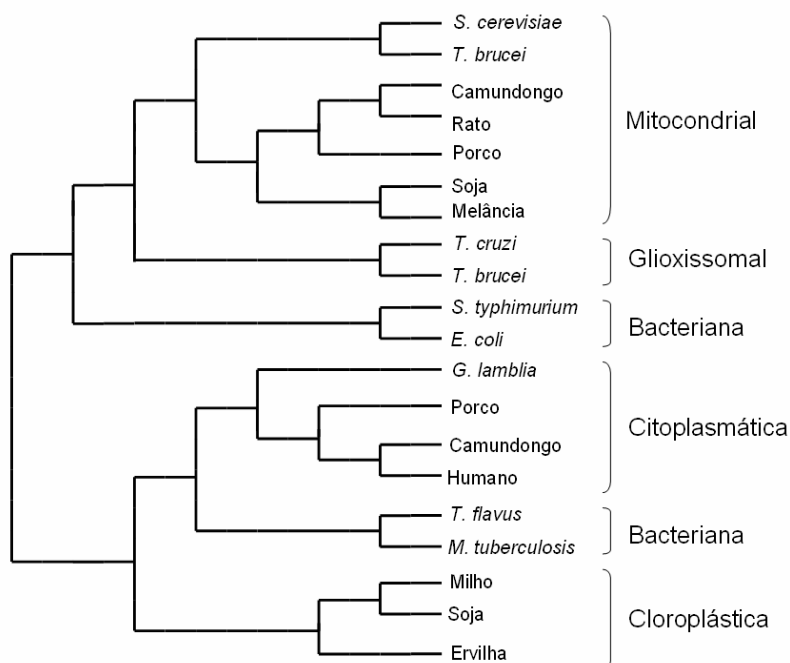


Figura 6 – Árvore filogenética de MDHs evidenciando a divisão em dois grupos: citoplasmática e mitocondrial. Baseado nos resultados de Goward & Nichols (1994) e Madern (2002).

1.4.3 MDHc de *A. mellifera*

A MDHc de *A. mellifera* é uma enzima dimérica com subunidades de peso molecular estimado em 34 KDa (CONTEL *et al.*, 1977; SNYDER *et al.*, 1979). O polimorfismo genético da MDHc foi caracterizado por Contel *et al.* (1977) e atribuído à ação de três alelos codominantes no loco enzimático *Mdh-1* (Figura 7). Seguindo a nomenclatura baseada na mobilidade eletroforética de cada variante após eletroforese em gel de amido estabelecida por Sheppard & Berlocher (1984), são conhecidos atualmente sete alelos deste loco – *Mdh-1⁵⁵*, *Mdh-1⁶⁵*, *Mdh-1⁸⁰*, *Mdh-1⁸⁷*, *Mdh-1¹⁰⁰*, *Mdh-1¹¹⁶* e *Mdh-1¹³³* –, mas somente três são comuns: *Mdh-1⁶⁵* (S ou *slow*), *Mdh-1⁸⁰* (M ou *medium*) e *Mdh-1¹⁰⁰* (F ou *fast*).

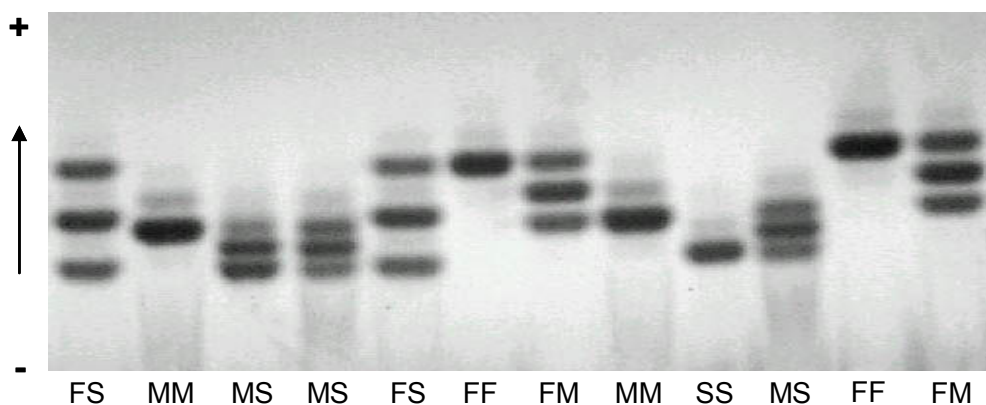


Figura 7 – Eletroforese em gel de amido representando os fenótipos produzidos pelos alelos comuns da *Mdh-1*. O padrão de três bandas dos heterozigotos deve-se à formação de heterodímeros. Foto: LGEH.

O loco enzimático *Mdh-1* tem sido o mais utilizado em estudos populacionais de *A. mellifera*, principalmente para se determinar a composição racial de populações híbridas ou a origem de populações introduzidas (LOBO *et al.*, 1989; DEL LAMA *et al.*, 1990), por apresentar diferenças significativas nas frequências alélicas entre as três principais linhagens evolutivas de *A. mellifera*.

As subespécies africanas (linhagem A) possuem elevadas frequências do alelo *Mdh-1¹⁰⁰*. Nunamaker & Wilson (1981) e Nunamaker *et al.* (1984) relatam *Mdh-1¹⁰⁰* como um alelo fixado ($f = 1,00$) em populações de *A. m. scutellata* de regiões da

África do Sul. Ndiritu *et al.* (1986) e Meixner *et al.* (1994) relatam freqüências do alelo *Mdh-1*¹⁰⁰ variando entre 0,94 a 1,00 para populações de subespécies do Quênia (*A. m. litorea*, *A. m. monticola* e *A. m. scutellata*). Dada essas altas freqüências de *Mdh-1*¹⁰⁰ nas populações de subespécies africanas, este alelo tem sido utilizado como indicativo de ancestralidade africana de populações introduzidas ou híbridas (e.g. NUNAMAKER *et al.*, 1984).

As subespécies da Europa Ocidental (linhagem M) apresentam elevadas freqüências do alelo *Mdh-1*⁸⁰. Nunamaker *et al.* (1984) relatam freqüências do alelo *Mdh-1*⁸⁰ variando entre 0,79 e 0,93 em populações de *A. m. mellifera* de diversos países. Sheppard & Berlocher (1984) encontraram freqüência média de 0,85 do alelo *Mdh-1*⁸⁰ em populações de *A. m. mellifera* da Noruega.

As abelhas da Europa Ocidental (linhagem C) apresentam uma maior variação regional na distribuição alélica, principalmente dos alelos *Mdh-1*⁶⁵ e *Mdh-1*¹⁰⁰. A freqüência do alelo *Mdh-1*⁶⁵ é alta em populações de *A. m. ligustica* e *A. m. carnica*, em média acima de 0,70 (CONTEL *et al.*, 1977; BADINO *et al.*, 1983; SHEPPARD; BERLOCHER, 1985; DEDEJ *et al.*, 1996). Entretanto, nas subespécies *A. m. sicula* e *A. m. macedonica*, o alelo *Mdh-1*¹⁰⁰ é mais comum, com freqüências superiores a 0,85 e 0,7, respectivamente (BADINO *et al.*, 1985; DEDEJ *et al.*, 1996). Além disso, as subespécies *A. m. caucasica* e *A. m. anatoliaca* (linhagem O, haplótipo mtDNA C) apresentam freqüências do alelo *Mdh-1*¹⁰⁰ próximas a 1,00 (ASAL *et al.*, 1995; KANDEMIR; KENCE, 1995), assim como as subespécies africanas.

Como não existem diferenças alélicas fixadas entre as linhagens, o uso somente do loco *Mdh-1* para se inferir a origem das abelhas apresenta complicações, sendo necessária a utilização em conjunto de outros marcadores (mtDNA ou morfométricos) (SHEPPARD, 1988; SCHNEIDER *et al.*, 2004). Além disso, há considerável evidência de que a variação no loco *Mdh-1* não é seletivamente neutra, estando sob influência de seleção mediada pela temperatura, tanto em *A. mellifera* quanto em outros organismos (NIELSEN *et al.*, 1994; MAGALHÃES CARACIOLO *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 1996; KIRBY *et al.*, 1997).

Clines latitudinais dos alelos do loco *Mdh-1* são observados em populações de *A. mellifera* da Europa, América do Norte, América do Sul e Austrália; entretanto, existem discrepâncias em relação a quais alelos estão sob seleção nas áreas de estudo. Na península ibérica, Cornuet (1983) observou um cline *Mdh-1*¹⁰⁰/*Mdh-1*⁸⁰ (F/M), com o alelo *Mdh-1*¹⁰⁰ aumentando de freqüência do norte para o sul. Badino

et al. (1984) relataram clines latitudinais para os alelos *Mdh-1⁶⁵* (S) e *Mdh-1¹⁰⁰* (F) na Itália, no qual o alelo *Mdh-1⁶⁵* aumenta de frequência com o aumento da latitude e, conseqüente diminuição da temperatura.

A análise realizada por Nielsen *et al.* (1994) com dados da Europa, América do Norte e América do Sul concluiu que o alelo *Mdh-1⁶⁵* (S) não apresenta distribuição clinal aparente, enquanto o alelo *Mdh-1¹⁰⁰* (F) diminui de frequência e a frequência do alelo *Mdh-1⁸⁰* (M) aumenta com o aumento da latitude (regiões mais frias). Porém, Hatty & Oldroyd (1999) observaram um cline na Austrália e concluíram que o alelo *Mdh-1⁶⁵* (S) era mais freqüente em regiões quentes e o alelo *Mdh-1⁸⁰* (M) em regiões mais frias, enquanto que a distribuição do alelo *Mdh-1¹⁰⁰* (F) não apresentava correlação com fatores ambientais. Del Lama *et al.* (2004) relataram um cline latitudinal no Chile, no qual a frequência do alelo *Mdh-1¹⁰⁰* (F) aumentava em regiões mais frias em relação à frequência do alelo *Mdh-1⁶⁵* (S). Os estudos de Hatty & Oldroyd (1999) e Del Lama *et al.* (2004) também verificaram que não existia um cline paralelo de marcadores raciais do mtDNA ao observado para os alelos do loco *Mdh-1*, evidenciando que os clines latitudinais não eram devidos a um evento de hibridização incompleto.

Diferenças na termoestabilidade das alozimas da *Mdh-1* relatadas por Cornuet *et al.* (1995) suportam a hipótese de seleção dependente da temperatura atuando sobre o loco *Mdh-1*. Os autores verificaram que o alelo *Mdh-1⁸⁰* (M) produz uma alozima com menor termoestabilidade do que os alelos *Mdh-1¹⁰⁰* (F) e *Mdh-1⁶⁵* (S), e sugerem que este alelo teria desvantagem seletiva em regiões mais quentes. Os genótipos da *Mdh-1* também já foram relacionados com diferentes taxas de consumo de O₂ (COELHO; MITTON, 1988) e capacidade de vôo (Harrison *et al.*, 1996), reforçando as evidências de que a variação neste loco apresenta conseqüências funcionais.

Outro aspecto de interesse em relação ao loco *Mdh-1* diz respeito à variação no padrão eletroforético das alozimas durante o desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera*. Contel *et al.* (1977) observaram que o padrão eletroforético observado em pupas era mais complexo do que o observado em larvas e adultos, apresentando regiões adicionais de atividade (Figura 8).

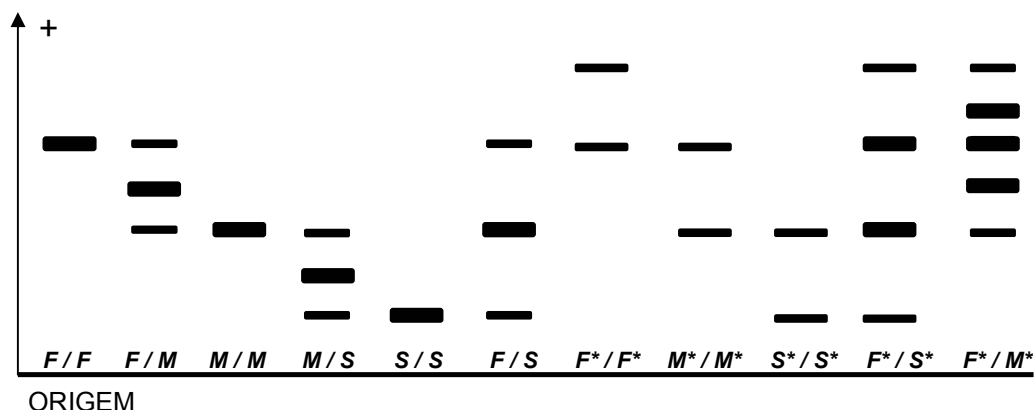


Figura 8 – Esquematização dos padrões alozímicos da MDHc de *Apis mellifera* observados por Contel *et al.* (1977). A banda intermediária nos heterozigotos indica a estrutura dimérica da enzima. Os fenótipos assinalados com um asterisco (*) representam os padrões observados em pupas, sendo possível visualizar as “bandas adicionais” específicas deste estágio do desenvolvimento.

O padrão de banda única característico de larvas e adultos homozigotos / hemizigotos alterava-se para o padrão de duas bandas durante a fase de pupa; o padrão de três bandas característico dos heterozigotos passava a apresentar quatro ou cinco bandas nas pupas.

Os autores apresentaram duas hipóteses que poderiam explicar o complexo padrão observado em pupas. A primeira hipótese seria a expressão de um novo gene restrito ao estágio pupal, que codificaria um polipeptídeo que se ligaria aos polipeptídeos produzidos pelo loco *Mdh-1* durante todo o desenvolvimento. A segunda hipótese consistiria na formação epigenética de isozimas secundárias, por alguma modificação pós-traducional dos polipeptídeos da *Mdh-1* ou por diferentes graus de polimerização da molécula. As causas do surgimento dessas novas bandas no padrão eletroforético e o seu significado funcional ainda não foram esclarecidos.

*Justificativa e
Objetivos*

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As causas do aparecimento das isoformas adicionais de MDHc em pupas de *A. mellifera* foram investigadas por estudos bioquímicos e genéticos realizados por Del Lama (1982). Adicionalmente, o loco *Mdh-1* tem sido interesse de outros estudos conduzidos no Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH – Ufscar).

A proposta inicial deste trabalho foi dar continuidade ao trabalho de Del Lama (1982), com o principal objetivo de determinar se as isoformas adicionais eram resultantes de causa genética, isto é *splicing* alternativo do gene *Mdh-1*. Simultaneamente, buscamos estudar outros aspectos moleculares deste loco e associar os resultados dos estudos previamente desenvolvidos no LGEH.

Apresentamos este trabalho em três capítulos no formato de artigo, reunindo os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste projeto e outros de trabalhos previamente mencionados.

Capítulo 1 – “Bases moleculares do polimorfismo da malato desidrogenase citoplasmática (MDHc) de Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae)”

Este capítulo teve como objetivo a identificação do gene *Mdh-1* e a caracterização molecular da variação alozímica com a descrição das substituições nucleotídicas associadas às três variantes eletroforéticas comuns da MDHc de *A. mellifera*. Também buscamos as condições para amplificação alelo-específica dos alelos comuns da *Mdh-1* para fornecer um método alternativo de fenotipagem deste polimorfismo enzimático.

Capítulo 2 – “Análise da expressão da malato desidrogenase citoplasmática (MDHc) e mitocondrial (MDHm) no desenvolvimento ontogenético de Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae)”

O objetivo deste capítulo consistiu em verificar a expressão dos genes da MDHc e MDHm, *Mdh-1* e *Mdh-2*, durante o desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera*. Verificamos os padrões eletroforéticos em gel de amido das enzimas ao

longo do desenvolvimento e em diferentes tecidos, o perfil de expressão dos genes e quantificamos a atividade enzimática e a expressão gênica.

Capítulo 3 – “Análise de splicing alternativo e estudos bioquímicos da malato desidrogenase citoplasmática de Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae)”

Neste capítulo nos propusemos a investigar possíveis causas do surgimento das isoformas adicionais de MDHc no desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera*. Analisamos o padrão da MDHc no desenvolvimento ontogenético de outras espécies de abelhas e vespas, determinamos o peso molecular da isoforma adicional da MDHc, investigamos a ocorrência de *splicing* alternativo no gene *Mdh-1*, o efeito de neuraminidase, diálise, fosfatase no padrão eletroforético da enzima.

*Referências
Bibliográficas*

3. Referências Bibliográficas

ASAL, S. *et al.* Enzyme polymorphism in honey bee (*Apis mellifera* L.) from Anatolia. *Turkish Journal of Zoology*, v. 19, p. 153–156, 1995.

AUGUSTO, S.C.; GARÓFALO, C.A. Nesting biology and social structure of *Euglossa (Euglossa) townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Insectes Sociaux*, v. 51, p. 400–409, 2004.

BADINO, G.; CELEBRANO, G.; MANINO, A. Population structure and *Mdh-1* locus variation in *Apis mellifera ligustica*. *The Journal of Heredity*, v. 74, p. 443–446, 1983.

BADINO, G.; CELEBRANO, G.; MANINO, A. Population genetics of Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica* Spin.) and its relationships with neighbouring subspecies. *Bollettino del Museo Regionale di Scienze Naturali (Torino)*, v. 2, p. 571–584, 1984.

BADINO, G. *et al.* Enzyme polymorphism in the Sicilian honey bee. *Experientia*, v. 41, p. 752–754, 1985.

BIRKTOFT, J.J.; BANASZAK, L.J. The presence of a histidine-aspartic acid pair in the active site of 2-hydroxyacid dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 258, p. 472–482, 1983.

BIRKTOFT, J.J. *et al.* Amino acid sequence homology among the 2-hydroxyacid dehydrogenase: mitochondrial and cytoplasmic malate dehydrogenase form a homologous system with lactate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 79, p. 6166–6170, 1982.

BOERNKE, W.E. *et al.* Stringency of substrate specificity of *Escherichia coli* malate dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 332, p. 43–52, 1995.

BREITER, D.R.; RESNIK, E.; BANASZAK, L.J. Engineering the quaternary structure of an enzyme: construction and analysis of a monomeric form of malate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Protein Science*, v. 3, p. 2023–2032, 1994.

CAMARGO, J.M.F.; ROUBIK, D.W. Systematics and bionomics of the apoid obligate necrophages: The *Trigona hypogea* group (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 44, p. 13–39, 1991.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini review. *Apidologie*, v. 23, p. 293–314, 1992.

CAMERON, S.A. Phylogeny and biology of neotropical orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Entomology*, v. 49, p. 377–404, 2004.

CAMERON, S.A.; MARDULYN, P. Multiple molecular data sets suggest independent origins of highly eusocial behavior in bees (Hymenoptera: Apinae). *Systematic Biology*, v. 50, n. 2, p. 194–214, 2001.

- CARDINAL, S.; PACKER, L. Phylogenetic analysis of the corbiculate Apinae based on morphology of the sting apparatus (Hymenoptera: Apidae). *Cladistics*, v. 23, p. 99–118, 2007.
- CENDRIN, F. *et al.* Cloning, sequencing and expression in *Escherischia coli* of the gene coding for malate dehydrogenase of the extremely halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry*, v. 32, p. 4308–4313, 1993.
- CHO, S.; HUANG, Z.Y.; ZHANG, J. Sex-specific splicing of the honeybee *doublesex* gene reveals 300 million years of evolution at the bottom of the insect sex-determination pathway. *Genetics*, v. 177, p. 1733–1741, 2007.
- CLAUDIANOS, C. *et al.* A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, v. 15, p. 615–636, 2006.
- COELHO, J.R.; MITTON, J.B. Oxygen consumption during hovering is associated with genetic variation in honey-bees. *Functional Ecology*, v. 2, p. 141–146, 1988.
- CONTEL, E.P.B.; MESTRINER, M.A.; MARTINS, E. Genetic control and developmental expression of malate dehydrogenase in *Apis mellifera*. *Biochemical Genetics*, v. 15, n. 9-10, p. 859–875, 1977.
- CORNUET, J.M. Reproduction, génétique et sélection de l'abeille. *Bulletin Technique Apicole*, v. 10, p. 13–36, 1983.
- CORNUET, J.M.; OLDROYD, B.P.; CROZIER, R.H. Unequal thermostability of allelic forms of malate dehydrogenase in honey bees. *Journal of Apicultural Research*, v. 34, p. 45–47, 1995.
- CRANE, E. History of honey. In: Crane, E. (Ed.). *Honey, a comprehensive survey*. Londres: William Heinemann, 1975, p. 439–488.
- CRANE, E. *The world history of beekeeping and honey hunting*. Nova Iorque: Routledge, 1999. 720 p.
- DANFORTH, B.N. Evolution of sociality in a primitively eusocial lineage of bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 99, n. 1, p. 286–290, 2002.
- DEDEJ, S.; BIASIOLO, A.; PIVA, R. Morphometric and alloenzymatic characterisation in the Albanian honeybee population *Apis mellifera* L. *Apidologie*, v. 27, p. 121–131, 1996.
- DEL LAMA, M.A. *Estudos genéticos e bioquímicos das isoenzimas de malato desidrogenase de Apis mellifera*. 1982. 104 f. Tese (Doutorado em Genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 1982.

DEL LAMA, M.A. *et al.* Genetic differentiation estimated by isozymic analyses of Africanized bee populations from Brazil and from Central America. *Apidologie*, v. 21, n. 4, p. 271-280, 1990.

DEL LAMA, M.A. *et al.* Clinal variation and selection on MDH allozymes in honeybees in Chile. *Hereditas*, v. 140, p. 149–153, 2004.

DUCHATEAU, M.J.; MARIËN, J. Sexual biology of haploid and diploid males in the bumble bee *Bombus terrestris*. *Insectes Sociaux* v. 42, n. 3, p. 255–266, 1995.

ELIAS, J.; MAZZI, D.; DORN, S. No need to discriminate? Reproductive diploid males in a parasitoid with complementary sex determination. *PLoS ONE*, v. 4, n. 6, e6024, 2009.

ENGEL, M.S. Fossil honey bees and evolution in the genus *Apis* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, v. 29, p. 265–281, 1998.

ENGEL, M.S. A monograph of the Baltic amber bees and evolution of the Apoidea (Hymenoptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 259, p. 1–192, 2001.

EVANS, J.D. *et al.* Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, v. 15, p. 645–656, 2006.

ENZYME NOMECLATURE. *Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes, NC-IUBMB*. Nova Iorque: Academic Press, 1992, 862p.

EVENTOFF, W. *et al.* Structural adaptations of lactate dehydrogenase isozymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 74, p. 2677–2681, 1977.

FOSTER, K.R.; WENSELEERS, T.; RATNIEKS, F.L.W. Kin selection is the key to altruism. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 21, p. 57–60, 2006.

FRANCK, P. *et al.* Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie*, v. 31, p. 167–180, 2000.

GARÓFALO, C.A. *et al.* Nest structure and communal nesting in *Euglossa (Glossura) annectans* Dressler (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 15, p. 589–596, 1998.

GARNERY, L. *et al.* Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Apidologie*, v. 22, p. 87–92, 1991.

GARNERY, L.; CORNUET, J.M.; SOLIGNAC, M. Evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, v. 1, p. 145-154, 1992.

GASTON, K.J. The magnitude of global insect species richness. *Conservation Biology*, v. 5, p. 283–296, 1991.

GIETL, C. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1100, n. 3, p. 217–234, 1992.

GOWARD, R.; NICHOLLS, D.J. Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Science*, v. 3, p. 1883–1888, 1994.

GRISSELL, E.E. Hymenopteran biodiversity: Some alien notions. *American Entomologist*, v. 45, p. 235–244, 1999.

HALL, M.D.; LEVITT, D.G.; BANASZAK, L.J. Crystal structure of *Escherichia coli* malate dehydrogenase. A complex of the apoenzyme and citrate at 1,87 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, v. 226, p. 867–882, 1992.

HAMILTON, W.D. The genetical evolution of social behaviour I. *Journal of Theoretical Biology*, v. 7, p. 1–16, 1964.

HAMILTON, W.D. The genetical evolution of social behaviour II. *Journal of Theoretical Biology*, v. 7, p. 17–52, 1964.

HARRISON, J.F.; NIELSEN, D.I.; PAGE, R.E. Malate dehydrogenase phenotype, temperature and colony effects on flight metabolic rate in the honey-bee, *Apis mellifera*. *Functional Ecology*, v. 10, p. 81–88, 1996.

HATTY, S.; OLDROYD, B.P. Evidence for temperature-dependent selection for malate dehydrogenase allele frequencies in honeybee populations. *The Journal of Heredity*, v. 90, p. 565–568, 1999.

HEIMPEL, G.E.; DE BOER, J.G. Sex determination in the Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, v. 53, p. 209–230, 2008.

HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, v. 443, n. 7114, p. 931–949, 2006.

JOH, T. *et al.* Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding mammalian cytosolic malate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 262, p. 15127–15131, 1987.

KANDEMIR, I.; KENCE, A. Allozyme variability in a central Anatolian honeybee (*Apis mellifera* L.) population. *Apidologie*, v. 26, p. 503–510, 1995.

KAWAKITA, A. *et al.* Phylogenetic analysis of the corbiculate bee tribes based on 12 nuclear protein-coding genes (Hymenoptera: Apoidea: Apidae). *Apidologie*, v. 39, p. 163–175, 2008.

- KIRBY, R.R.; BERRY, R.J.; POWERS, D.A. Variation in mitochondrial DNA in a cline of allele frequencies and shell phenotype in the dog-whelk *Nucella lapillus* (L.). *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 62, p. 299–312, 1997.
- KRISTENSEN, N.P. Phylogeny of endopterygote insects, the most successful lineage of living organisms. *European Journal of Entomology*, v. 96, p. 237–253, 1999.
- KOVAC, H.; STABENTHEINER, A.; BRODSCHNEIDER, R. Contribution of honeybee drones of different age to colonial thermoregulation. *Apidologie*, v. 40, n. 1, p. 82–95, 2009.
- LEE, B.I. *et al.* Crystal structure of the MJ0490 gene product of the hyperthermophilic archaeobacterium *Methanococcus jannaschii*, a novel member of the lactate/malate family of dehydrogenases. *Journal of Molecular Biology*, v. 307, p. 1351–1562, 2001.
- LIN, J.-J.; MACLEOD, S.; KUO, C. Qualitative and quantitative strategies of thermal adaptation of grass carp (*Ctenoparyngodon idella*) cytoplasmic malate dehydrogenases. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 15, p. 71–81, 1996.
- LO, N. *et al.* A molecular phylogeny of the genus *Apis* suggests that the Giant Honey Bee of the Philippines, *A. breviligula* Maa, and the Plains Honey Bee of southern India, *A. indica* Fabricius, are valid species. *Systematic Entomology*, v. 35, n. 2, p. 226–233, 2010.
- LOBO, J.A.; DEL LAMA, M.A.; MESTRINER, M.A. Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee (*Apis mellifera* L.). *Evolution*, v. 43, n. 4, p. 794–802, 1989.
- LOSEY, J.E.; VAUGHAN, M. The Economic Value of Ecological Services Provided by Insects. *BioScience*, v. 56, n. 4, p. 311–323, 2006.
- MADERN, D. Molecular Evolution Within the L-Malate and L-Lactate Dehydrogenase Super-Family. *Journal of Molecular Evolution*, v. 54, p. 825–840, 2002.
- MADERN, D. *et al.* Differences in the oligomeric states of the [LDH-like] L-MalDH from the hyperthermophilic archaea *Methanococcus jannaschii* and *Archaeoglobus fulgidus*. *Biochemistry*, v. 40, p. 10310–10316, 2001.
- MAGALHÃES CARACIOLO, M.C.; VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Malate dehydrogenase polymorphism in Amazon Curimatids (Teleostei Curimatidae): Evidence of an ancient mutational event. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 19, p. 57–64, 1996.
- MCALISTER-HENN, L. Evolutionary relationships among the malate dehydrogenase. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 13, p. 178–181, 1988.
- MCEVILY, A.J. *et al.* Regulation of mitochondrial malate dehydrogenase: Kinetic modulation independent of subunit interaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 238, p. 229–236, 1985.

- MATSUI, T. *et al.* Expression profiles of urbilaterian genes uniquely shared between honey bee and vertebrates. *BMC Genomics*, v. 10, p. 17, 2009.
- MEIXNER, M.D. *et al.* Morphological and allozyme variability in honey bees from Kenya. *Apidologie*, v. 25, p. 188–202, 1994.
- MELO, G.A.R. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the crabronid wasps. *Scientific Papers*, Natural History Museum, University of Kansas, v. 14, p. 1–55, 1999.
- MELO, G.A.R.; GONÇALVES, R.B. Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae sensu lato). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 22, n. 1, p. 153–159, 2005.
- MICHELETTE, E.R.F.; SOARES, A.E.E. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, v. 24, p. 431–440, 1993.
- MICHENER, C.D. *The social behavior of the bees*. Cambridge(MA): Harvard University Press, 1974. 404p.
- MICHENER, C.D. *The bees of the world*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2000. 913 p.
- NDIRITU, D.W.; MUTUGI, N.; NDUNG'U, S. Variation in malate dehydrogenase allozymes among honeybee populations in Kenya. *Journal of Apicultural Research*, v. 25, p. 234–237, 1986.
- NIELSEN, D.I.; PAGE, R.E.; CROSLAND, M.W.J. Clinal variation and selection of MDH allozymes in honey bee populations. *Experientia*, v. 50, p. 867–871, 1994.
- NISHIYAMA, M.; BIRKTOFT, J.J.; BEPPU, T. Alteration of coenzyme specificity of malate dehydrogenase from *Thermus flavus* by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, p. 4656–4660, 1993.
- NUNAMAKER, R.A.; WILSON, W.T. Comparison of MDH allozyme patterns in the African honey bee (*Apis mellifera adansonii* L.) and the Africanized populations of Brazil. *Journal of the Kansas Entomological Society*, v. 54, p. 704–710, 1981.
- NUNAMAKER, R.A.; WILSON, W.T.; HALEY, B.E. Electrophoretic detection of Africanized honey bees (*Apis mellifera scutellata*) in Guatemala and Mexico based on malate dehydrogenase allozyme patterns. *Journal of the Kansas Entomological Society*, v. 57, p. 622–631, 1984.
- POINAR, G.O. Jr; DANFORTH, B.N. A fossil bee from Early Cretaceous Burmese amber. *Science*, v. 314, p. 614, 2006.
- ROBINSON, G.E.; GROZINGER, C.M.; WHITFIELD, C.W. Sociogenomics: social life in molecular terms. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, p. 257–271, 2005.

- ROBINSON, G.E. *et al.* Sweetness and light: Illuminating the honey bee genome. *Insect Molecular Biology*, v. 15, p. 535–536, 2006.
- ROIG-ALSINA, A.; MICHENER, C.D. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *The University of Kansas Science Bulletin*, v. 55, p. 123–173, 1993.
- RUBIN, E.B. *et al.* Molecular and phylogenetic analyses reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on the molecular evolution of the circadian clock. *Genome Research*, v. 16, p. 1352–1365, 2006.
- RUTTNER, F. *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Nova Iorque: Springer-Verlag, 1988. 284 p.
- RUTTNER, F.; TASSENCOURT, L.; LOUVEAUX, J. Biometrical statistical analysis of the geographical variability of '*A. mellifera* L.'. *Apidologie*, v. 9, n. 4, p. 363–381, 1978.
- SAVARD, J. *et al.* Phylogenetic analysis reveals bees and wasps (Hymenoptera) at the base of the radiation of holometabolous insects. *Genome Research*, v. 16, p. 1334–1338, 2006.
- SCHLÜTER, T. *Moltenia rieki* n. gen., n. sp. (Hymenoptera: Xyelidae?), a tentative sawfly from the Molteno Formation (Upper Triassic), South Africa. *Paläontologische Zeitschrift*, v. 74, p. 75–78, 2000.
- SCHNEIDER, S.S.; DEGRANDI-HOFFMAN, G.; SMITH, D. The African honeybee: Factors contributing to a successful biological invasion. *Annual Review of Entomology*, v. 49, p. 351–376, 2004.
- SHARKEY, M.J. Phylogeny and Classification of Hymenoptera. *Zootaxa*, v. 1668, p. 521–548, 2007.
- SHEPPARD, W.S. Comparative study of enzyme polymorphism in United States and European honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 81, p. 886–889, 1988.
- SHEPPARD, W.S.; BERLOCHER, S.H. Enzyme polymorphisms in *Apis mellifera mellifera* from Norway. *Journal of Apicultural Research*, v. 23, p. 64–69, 1984.
- SHEPPARD, W.S.; BERLOCHER, S.H. New allozyme variability in Italian honey bees, *Apis mellifera ligustica*. *The Journal of Heredity*, v. 76, p. 45–48, 1985.
- SHEPPARD, W.S.; BERLOCHER, S.H. Allozyme variation and differentiation among four *Apis* species. *Apidologie*, v. 20, p. 419–431, 1989.
- SHEPPARD, W.S.; MEIXNER, M.D. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*, v. 34, p. 367–375, 2003.

SHEPPARD, W.S. *et al.* *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta. *Apidologie*, v. 28, n. 5, p. 287–293, 1997.

SILVERSTEIN, E.; SULEBELE, G. Equilibrium kinetic study of the mechanism of mitochondrial and supernatant malate dehydrogenases of bovine heart. *Biochimica et Biophysica Acta – Enzymology*, v. 185, n. 2, p. 297–304, 1969.

SMITH, D.R. *et al.* Turkish honeybees belong to the east Mediterranean mitochondrial lineage. *Apidologie*, v. 28, p. 269–274, 1997.

SNYDER, T.P.; CHAMBERS, G.K.; AYALA, F.J. Isolation of the cytoplasmic form of malate dehydrogenase from honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 88, p. 668–675, 1979.

SOUCY, S.L.; GIRAY, T. Solitary and group nesting in the orchid bee *Euglossa hyacinthina* (Hymenoptera, Apidae). *Insectes Sociaux*, v. 50, n. 3, p. 248–255, 2003.

SOUTHWICK, E.E.; SOUTHWICK JR., L. Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the United States. *Journal of Economic Entomology*, v. 85, n. 3, p. 621–633, 1992.

SUNDARAM, T.K.; WRIGHT, I.P.; WILKINSON, A.E. Malate dehydrogenase from thermophilic and mesophilic bacteria. Molecular size, subunit structure, amino acid composition, immunochemical homology and catalytic activity. *Biochemistry*, v. 19, p. 2017–2022, 1980.

TAKAHASHI, N.C. *et al.* A reanalysis of diploid male frequencies in euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). *Evolution*, v. 55, n. 9, p. 1897–1899, 2001.

VILHELMSSEN, L. Phylogeny and classification of the extant basal lineages of the Hymenoptera (Insecta). *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 131, p. 393–442, 2001.

WANG, Y. *et al.* Functional CpG methylation system in a social insect. *Science*, v. 314, n. 5799, p. 645–647, 2006.

WHITTING, M.F. Phylogeny of the holometabolous insect orders: molecular evidence. *Zoological Scripta*, v. 31, p. 3–15, 2002.

WHITFIELD, C.W. *et al.* Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, v. 314, p. 642–645, 2006.

WIEGMANN, B.M. *et al.* Single-copy nuclear genes resolve the phylogeny of the holometabolous insects. *BMC Biology*, v. 7, p. 34, 2009.

WILKS, H.M. *et al.* A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework. *Science*, v. 242, p. 1541–1544, 1988.

WILLIAMS, P.H. An annotated checklist of bumble bees with an analysis of patterns of description (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Bulletin of The Natural History Museum (Entomology)*, v. 67, p. 79–152, 1998.

WILSON, E.O.; HÖLLDOBLER, B. Eusociality: origin and consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 102, n. 38, p. 13367–13371, 2005.

WINSTON, M.L. *The biology of the honey bee*. Cambridge(MA): Harvard University Press. 1991, 294 p.

ZAYED, A.; PACKER, L. High levels of diploid male production in a primitively eusocial bee (Hymenoptera: Halictidae). *Heredity*, v. 87, n. 6, p. 631-636, 2001.

Capítulo 1

4. Bases moleculares do polimorfismo da malato desidrogenase citoplasmática (MDHc) de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Keize Nagamati Junior¹, Kátia Maria Ferreira¹, Zilá Luz Paulino Simões² e Marco Antonio Del Lama¹

¹ Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros

Departamento de Genética e Evolução

Universidade Federal de São Carlos

São Carlos – SP – Brasil

² Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas

Departamento de Biologia

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Ribeirão Preto – SP – Brasil

4.1 Resumo

Clines latitudinais envolvendo os alelos do loco *Mdh-1* (malato desidrogenase citoplasmática) em populações de *Apis mellifera* de três continentes sugerem a ação da seleção natural sobre este polimorfismo. Neste capítulo, nós descrevemos a estrutura do gene *Mdh-1* e seqüenciamos os três alelos comuns deste loco para identificar as substituições associadas com o polimorfismo alozímico. Nossos resultados indicam o alelo *Mdh-1*¹⁰⁰ (F) como alelo ancestral que deu origem aos alelos *Mdh-1*⁸⁰ (M) e *Mdh-1*⁶⁵ (S) e que as diferenças na mobilidade eletroforética das alozimas podem ser atribuídas à substituição de um único aminoácido nas variantes S (Glu-114 → Lys) e M (Asp-215 → Asn) a partir da variante F. Também relatamos outros sítios polimórficos encontradas nos alelos e discutimos a fenotipagem por seqüenciamento ou por amplificação alelo-específica como métodos alternativos à fenotipagem por análise eletroforética.

Palavras-chave: amplificação alelo-específica, *Mdh-1*, substituições não-sinônimas, variantes eletroforéticas.

4.2 Introdução

A malato desidrogenase (E.C. 1.1.1.37) tem papel fundamental no ciclo de Krebs ao catalisar a conversão reversível do L-malato a oxaloacetato utilizando NAD^+/NADH como cofatores. Nos animais eucariotos, duas formas da enzima estão presentes nas células, a citoplasmática ou solúvel (MDHc ou MDHs) e a mitocondrial (MDHm), ambas codificadas por genes nucleares independentes (*Mdh-1* e *Mdh-2*, respectivamente). As duas isoformas apresentam mecanismo catalítico similar, mas propriedades físicas, químicas e imunológicas distintas (O'BRIEN, 1973; GIETL, 1992; LIN *et al.*, 2002).

A verificação do caráter genético das variantes de MDHc de *Apis mellifera* representou um dos primeiros polimorfismos protéicos descritos na espécie (CONTEL *et al.*, 1977). Os padrões eletroforéticos em gel de amido foram interpretados pelos autores como a ação de três alelos codominantes de um loco gênico – *Mdh-1*¹⁰⁰ (F ou *fast*), *Mdh-1*⁸⁰ (M ou *medium*) e *Mdh-1*⁶⁵ (S ou *slow*) – cujos produtos interagem para produzir a estrutura dimérica esperada para a enzima e confirmada pelos padrões do presumido heterozigoto.

Análises em diferentes populações revelaram que as alozimas F e M encontravam-se praticamente fixadas nas linhagens africana (A) e da Europa Ocidental (M), respectivamente, enquanto que na linhagem evolutiva C da Europa Oriental (*carnicalligustica*) as variantes F e S ocorriam em frequências próximas de 25% e 75%, respectivamente (CONTEL *et al.*, 1977; BADINO *et al.*, 1983). Esta distribuição diferencial dos alelos levou à utilização do polimorfismo da MDHc como importante marcador racial em *A. mellifera*, tendo sido muito utilizado para se determinar a composição racial de populações híbridas ou a origem de populações introduzidas (LOBO *et al.*, 1989; DEL LAMA *et al.*, 1990).

Estudos com populações naturais da Itália e com populações introduzidas na Austrália e na América do Norte e do Sul demonstraram a existência de clines latitudinais para as variantes de MDHc, verificando-se alta correlação entre a distribuição dos alelos de *Mdh-1* e a temperatura dos sítios de amostragem (BADINO *et al.*, 1984; NIELSEN *et al.*, 1994; HATTY; OLDROYD, 1999; DEL LAMA *et al.*, 2004). Diferenças na termoestabilidade dos produtos destes alelos (CORNUET *et al.*, 1995) e a ausência de clines para marcadores raciais do mtDNA (HATTY; OLDROYD, 1999; DEL LAMA *et al.*, 2004) nestas mesmas populações

sustentam a hipótese de seleção natural mantendo as distribuições diferenciais dos alelos da *Mdh-1*.

A demonstração de que a distribuição clinal dos alelos de *Mdh-1* é o resultado de seleção diferencial requer inicialmente que tais variantes genéticas sejam caracterizadas, permitindo que se possa demonstrar o efeito das substituições de aminoácidos sobre as propriedades físico-químicas das alozimas geradas e como tais alterações poderiam ser modeladas pela seleção. Neste estudo, nós relatamos as bases moleculares do polimorfismo alozímico da MDHc. Descrevemos a estrutura do gene *Mdh-1* de *A. mellifera* e as substituições nucleotídicas associadas às três variantes eletroforéticas de MDHc. Nós também apresentamos os primers e as condições para uma identificação dos alelos da *Mdh-1* por meio de amplificação alelo-específica.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Amostragem das abelhas

Abelhas provenientes de colônias Africanizadas ou Européias de *A. mellifera* mantidas no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP – Universidade de São Paulo) foram analisadas. O material foi estocado a - 20° C até as análises serem realizadas.

4.3.2 Análise alozímica

A identificação dos fenótipos enzimáticos foi obtida a partir de extratos individuais de cabeça de zangões e operárias após homogeneização do material em 200 µL de mercaptoetanol 0,2 % e centrifugação a 5000 g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi submetido à eletroforese horizontal em gel de amido 14% (Penetrose 30, Corn Brazil) em tampão Tris-citrato pH 7,5 (TC - 0,1 M Tris + 0,028 M ácido cítrico) por 5 horas e meia à corrente constante de 55 mA. A coloração histoquímica foi realizada segundo Del Lama *et al.* (1990).

4.3.3 Identificação do gene *Mdh-1* de *A. mellifera*

Realizamos uma busca TBLASTN no banco de genes oficiais de *A. mellifera* (*Honey Bee Official Gene Set*) em busca de uma seqüência similar a MDHc de humanos (Número de acesso NCBI: NP_005908). A região do genoma de *A. mellifera* no qual identificamos o gene *Mdh-1* também foi submetida à análise de predição de genes com o *software Augustus* (STANKE; MORGENSTERN, 2005) para identificação do códon inicial. A plataforma Artemis 7.0 (RUTHERFORD *et al.*, 2000) foi utilizada para anotação manual da seqüência encontrada, visualização da estrutura do gene e desenho de primers.

4.3.4 Extração de DNA e RNA

O DNA genômico total foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio (SHEPPARD; MCPHERON, 1991) do mesossoma das abelhas previamente fenotipadas para o polimorfismo da MDHc. O RNA de operárias recém-emergidas foi extraído com *TRIzol (Invitrogen)* segundo o protocolo do fabricante. O RNA extraído foi incubado com *RNase-free DNase I (Promega)* por 40 minutos a 37° C para eliminar contaminações de DNA. Foram utilizados 2 µg de RNA total para síntese do cDNA em reação com *SuperScript II (Invitrogen)* e primer oligo(dT)₁₂₋₁₈ seguindo as recomendações do fabricante.

4.3.5 Amplificação via PCR / RT-PCR

Desenhamos três pares de primers – F5R6 (683 pb), F8R14 (506 pb) e F7R9 (583 pb) – do início do segundo éxon até 47pb *downstream* do stop códon, para a amplificação via PCR (Figura 1). Os primers utilizados em todos os procedimentos experimentais estão apresentados na Tabela 1. O DNA genômico de indivíduos com o fenótipo de interesse foi amplificado para as três regiões em volume final de reação de 25 µL, contendo tampão 1 x, 250 µM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 1,0 µM de cada primer, 1U de *Taq DNA polimerase (Invitrogen)* e 1,0 µL de DNA nas seguintes condições: 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 52° C e 45 segundos a 72° C. O cDNA foi amplificado para verificação dos limites dos éxons e ORF, também para as três regiões, em volume final de reação de 20 µL, contendo

MasterMix (Promega) 1 x, 0,4 µM de cada primer e 1,0 µL de cDNA, nas seguintes condições de reação: 2 minutos iniciais a 94° C, 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 52° C por 30 segundos e 72° C por 30 segundos, e um passo final de extensão por 5 minutos a 72° C. Produtos de PCR foram purificados com protocolo EXOI-SAP e seqüenciados em seqüenciador ABI 3100.

4.3.6 Análise de Seqüências

O DNA genômico foi seqüenciado para os três fragmentos do gene *Mdh-1* de 27 indivíduos de origens genéticas distintas, sendo 10 de fenótipo F, oito de fenótipo M e nove S. O fragmento F8R14, por compreender as substituições que levam à alteração na carga líquida da proteína, foi seqüenciado adicionalmente para outros 10 indivíduos de origens genéticas distintas, totalizando 11 seqüências para o fenótipo S, 13 seqüências para o fenótipo M e 13 seqüências para o fenótipo F. As seqüências foram analisadas utilizando o software *CodonCode Aligner 3.5* (*CodonCode Corporation*, Dedham, MA, USA) e a ferramenta on-line de alinhamento *MultAlin* (CORPET, 1988). A análise das seqüências de aminoácidos codificada por cada alelo para visualização de substituições e alteração na carga total da proteína foi realizada com o software *Gene Runner* (Hastings Software, Inc.).

4.3.7 Amplificação alelo-específica

As reações de amplificação alelo-específica para o alelo S (F3+R11) e seletiva para os alelos F e M (F3 + R10) foram em volume final de 25 µL, contendo tampão 1 x, 250 µM de cada dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada primer, 1U de *Taq DNA polimerase (Invitrogen)* e 1,0 µL de DNA nas seguintes condições: 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 10 segundos a 60° C e 30 segundos a 72° C. As reações de amplificação alelo-específica para o alelo M e seletiva para os alelos F e S foram em volume final de 25 µL, contendo tampão 1 x, 250 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada primer, 1U de *Taq DNA polimerase (Biotools)* e 1,0 µL de DNA nas seguintes condições: 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 10 segundos a 51° C e 30 segundos a 72° C (Protocolos apresentados no Apêndice A).

Tabela 1 – Primers e respectivos procedimentos experimentais nos quais foram utilizados

Primer	Seqüência 5' -> 3'	Procedimento Experimental
F5	AGAGTGAACCAATAAATGTGGTAG	PCR / RT-PCR
F8	GCCTCGAAAAGAAGGAATGG	PCR / RT-PCR
F7	AATATCCTGATGCTTCTCAT	PCR / RT-PCR
R6	GCATTTGTGTTAGCAGGATTACC	PCR / RT-PCR
R14	TTACAGCTGCACCACGTTTC	PCR / RT-PCR
R9	GCCAGAACAAGTAATTGGCT	PCR / RT-PCR
F3	GCTGATCCAAGTGTAGCTTTCA	Alelo-específico
F15	GAAATTTTTAAAGTTCAAGGAG	Alelo-específico
R10	GAGCATATTTGTCCAAAGCTTC	Alelo-específico
R11	GAGCATATTTGTCCAAAGCTTT	Alelo-específico
R12	GTAGTATTTAACCAATTTTCATC	Alelo-específico
R13	GTAGTATTTAACCAATTTTCATT	Alelo-específico

4.4 Resultados

4.4.1 Estrutura do gene

O gene *Mdh-1* é identificado no banco *Honey Bee Official Gene Set* pelo número de acesso GB-18727. Encontra-se situado no grupo 4.22 do genoma de *A. mellifera*, com estimativa de comprimento total de 1993 nucleotídeos, formado por cinco éxons e quatro íntrons (Figura 1) (Apêndice B). O primeiro éxon é composto basicamente da UTR 5', inferida pelo alinhamento com ESTs de *Melipona quadrifasciata* (ROBINSON *et al.*, dados não publicados), terminando com o códon de iniciação (ATG). A região UTR 3' foi inferida pela comparação com EST de *A. mellifera* (BB160017B10A08 – WHITFIELD *et al.*, 2002).

O conteúdo de A+T do gene é de 74,96 % (éxons mais íntrons; 65,94 % nos éxons e 88,47 % nos íntrons). A região codificante é constituída de 1002 nucleotídeos, e foi verificada pelo seqüenciamento do cDNA (exceto ATG inicial), com uma proteína predita de 333 aminoácidos e peso molecular estimado em 36,1 KDa, apresentando dois domínios conservados da superfamília lactato/malato

desidrogenase: domínio ligante de NAD (código de acesso Pfam: PF00056) e domínio alpha/beta C-terminal (código de acesso Pfam: PF02866).

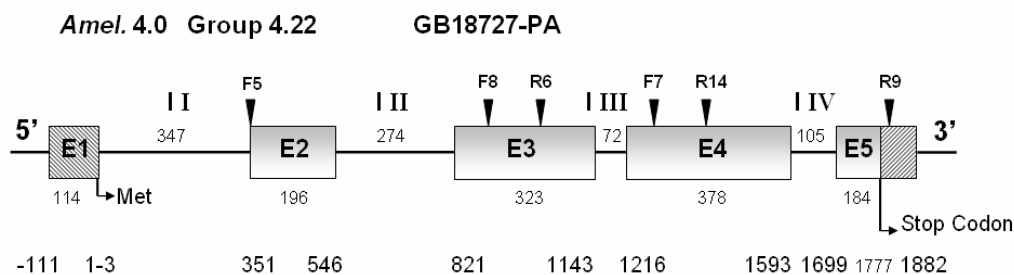


Figura 1 – Estrutura do gene *Mdh-1* de *Apis mellifera*. Éxons (E) são representados pelas caixas e íntrons (I) pelas linhas; a área hachurada representa as regiões UTR 5' e UTR 3'. O número sobre as linhas e sob as caixas indica o respectivo tamanho em nucleotídeos. A posição dos nucleotídeos dos limites inicial e final de cada exon está representada abaixo das caixas, 1 indicando o primeiro nucleotídeo do códon inicial ATG. Os triângulos pretos invertidos indicam os primers utilizados para amplificação via PCR (primers alelo-específicos não indicados). GB: *Honey Bee Official Gene Set Number*.

4.4.2 Polimorfismo e evolução dos alelos de *Mdh-1* de *A. mellifera*

Um total de 12 sítios polimórficos e uma deleção foram detectados nas seqüências analisadas, cinco em regiões intrônicas assim como a deleção de oito nucleotídeos no íntron III. Dos seis sítios polimórficos localizados em éxons, cinco constituíam substituições não-sinônimas.

Não foi detectada variação entre as seqüências dos nove indivíduos de fenótipo S (alelo *Mdh-1*⁶⁵). Das seqüências dos oito indivíduos de fenótipo M (alelo *Mdh-1*⁸⁰), apenas um apresentou uma mutação sinônima (alelo *Mdh-1*^{80b}). Dentre os dez indivíduos de fenótipo F (alelo *Mdh-1*¹⁰⁰), encontramos cinco seqüências distintas (*Mdh-1*^{100a}, *Mdh-1*^{100b}, *Mdh-1*^{100c}, *Mdh-1*^{100d}, *Mdh-1*^{100e}), quatro diferenciadas por mutações em íntrons e uma por mutação não-sinônima no éxon 3 (Figura 2).

O alelo *Mdh-1*^{100a} foi o único dos alelos *Mdh-1*¹⁰⁰ encontrado em mais de um indivíduo. Em todos os sítios polimórficos, este alelo compartilha o mesmo nucleotídeo com pelo menos um dos outros alelos, sugerindo que este representa o

alelo ancestral que originou os demais. Em relação ao alelo *Mdh-1*^{100a}, seis substituições ocorrem nos indivíduos de fenótipo S (alelo *Mdh-1*⁶⁵) – duas em íntrons, uma sinônima e três não-sinônimas –, e outras duas ocorrem em todos os fenótipos M (alelo *Mdh-1*^{80a} e *Mdh-1*^{80b}) – uma em íntron e uma não-sinônima. Desta forma, dois sítios permitem diferenciar o alelo *Mdh-1*⁸⁰ dos alelos *Mdh-1*¹⁰⁰ e *Mdh-1*⁶⁵, enquanto o alelo *Mdh-1*⁶⁵ diferencia-se dos alelos *Mdh-1*¹⁰⁰ e *Mdh-1*⁸⁰ por seis mutações. No entanto, em todos estes sítios o alelo *Mdh-1*¹⁰⁰ compartilha uma base com um dos alelos *Mdh-1*⁸⁰ ou *Mdh-1*⁶⁵ e não apresenta uma mutação característica que permita distingui-lo dos alelos *Mdh-1*⁸⁰ e *Mdh-1*⁶⁵.

	I II					E 3		E 4		I IV	E 5			
	598	641	764	767	780	787	961	1063	1318	1336	1468	1536	1632	1734
						→								
							Glu	Pro	Val	Asp	Ile	Lys		Leu
<i>Mdh-1</i> ^{100a}	G	C	C	G	G	TGATTTT	GAA	CCA	GTA	GAT	ATT	AAG	T	TTA
<i>Mdh-1</i> ^{100b}	.	T
<i>Mdh-1</i> ^{100c}	C	.
<i>Mdh-1</i> ^{100d}
<i>Mdh-1</i> ^{100e}	T
<i>Mdh-1</i> ^{80a}	A	A
<i>Mdh-1</i> ^{80b}	A	A	.	.	A	.
<i>Mdh-1</i> ⁶⁵	.	.	T	A	.	.	A	.	A	.	G	.	.	G
							Lys	Ser	Ile	Asn	Val	Lys		Leu

Figura 2 – Polimorfismos encontrados entre os alelos de *Mdh-1* de *Apis mellifera*. A posição do nucleotídeo é dada acima da linha clara e a localização na estrutura do gene é dada acima da linha escura. Polimorfismos localizados em éxons são representados nos códons, com os respectivos aminoácidos codificados indicados. Pontos representam identidade de nucleotídeo e traços representam deleção de nucleotídeo.

4.4.3 Bases moleculares do polimorfismo alozímico

A partir do alelo *Mdh-1*¹⁰⁰, uma mutação não-sinônima no nucleotídeo 961 resulta na substituição de um resíduo carregado negativamente por um carregado positivamente (Glu-114 → Lys) e origina a variante S codificada pelo alelo *Mdh-1*⁶⁵. A variante M, codificada pelo alelo *Mdh-1*⁸⁰, origina-se de uma mutação ocorrida na posição 1336 do alelo *Mdh-1*¹⁰⁰, resultando na substituição de um resíduo carregado negativamente por um resíduo de carga elétrica neutra (Asp-215 → Asn). Essas alterações de resíduos com cargas distintas explicam as variantes da enzima observadas em eletroforese no gel de amido (Figura 3).

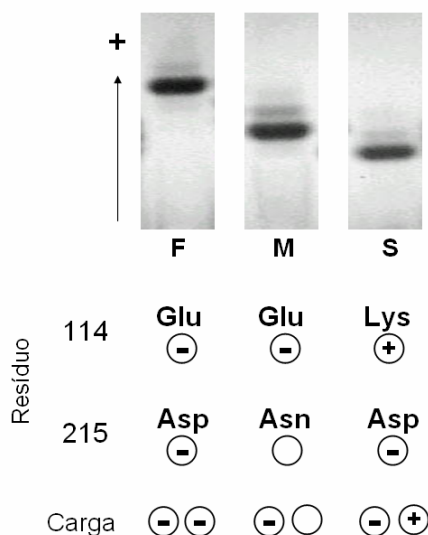


Figura 3 – Diagrama esquematizando as substituições de aminoácidos nos resíduos 114 e 215, que resultam em alteração de carga nas três variantes eletroforéticas de MDHc. A variante F possui dois resíduos carregados negativamente, enquanto M possui um resíduo carregado negativamente e outro de carga neutra; a variante S possui um resíduo carregado negativamente e outro positivamente, anulando as cargas.

4.4.4 Fenotipagem por amplificação alelo-específica

Os primers para PCR alelo-específica dos alelos *Mdh-1*⁸⁰ e *Mdh-1*⁶⁵ foram desenhados com base nas mutações não-sinônimas (posição 1336 e 961, respectivamente) associadas à alteração de resíduos responsáveis pela diferença

de cargas entre as variantes eletroforéticas. O primer R11 apresenta o nucleotídeo característico do alelo *Mdh-1⁶⁵* na extremidade 3', e em combinação com o primer consenso F3 amplificou um fragmento de 148 pb especificamente para as amostras de indivíduos previamente fenotipados para a variante S (zangões S, operárias FS e SS). O primer R13 apresenta o nucleotídeo característico do alelo *Mdh-1⁸⁰* na extremidade 3' e, em combinação com o primer consenso F3, amplificou um fragmento de 524 pb especificamente para as amostras de indivíduos previamente fenotipados para a variante M (zangões M, operárias MM e FM).

Como o alelo *Mdh-1¹⁰⁰* não é caracterizado por mutação específica, primers alelo-específicos para este alelo não puderam ser desenhados. A combinação dos primers F15, para amplificação seletiva dos alelos *Mdh-1¹⁰⁰* e *Mdh-1⁸⁰*, e R13, para amplificação seletiva dos alelos *Mdh-1¹⁰⁰* e *Mdh-1⁶⁵*, foram testados para amplificação específica do alelo *Mdh-1¹⁰⁰*, porém a padronização da reação não foi bem sucedida.

Ainda assim, a identificação do alelo *Mdh-1¹⁰⁰* nas amostras pode ser feita por método indireto: quando a amostra não apresentava amplificação específica tanto para o alelo *Mdh-1⁶⁵* quanto para o alelo *Mdh-1⁸⁰*, inferiu-se que se tratava de um indivíduo hemizigoto ou homozigoto para o alelo *Mdh-1¹⁰⁰*. Por outro lado, quando a amostra apresentava amplificação específica para o alelo *Mdh-1⁸⁰*, mas não para o alelo *Mdh-1⁶⁵*, a presença do alelo *Mdh-1¹⁰⁰* foi inferida quando a amostra também apresentou amplificação utilizando-se o par de primers F3 + R12 (para amplificação seletiva dos alelos *Mdh-1¹⁰⁰* e *Mdh-1⁶⁵*). Finalmente, nos casos de amplificação específica para o alelo *Mdh-1⁶⁵*, mas não para o alelo *Mdh-1⁸⁰*, a detecção do alelo *Mdh-1¹⁰⁰* foi realizada utilizando-se o par de primers F3 + R10 (amplificação seletiva dos alelos *Mdh-1¹⁰⁰* e *Mdh-1⁸⁰*). Desta forma, os três alelos comuns do loco *Mdh-1* puderam ser identificados corretamente nas amostras analisadas (conferidos posteriormente com a fenotipagem prévia por eletroforese em gel de amido) após as três reações de amplificação.

4.5 Discussão

A enzima MDHc está presente em praticamente todos os eucariontes e desempenha uma função similar em todos na troca de moléculas entre o citossol e a mitocôndria por meio do shuttle malato-aspartato. Em todos os organismos nos

quais a MDHc foi estudada, esta consistia numa proteína dimérica, com cada subunidade variando entre 330 a 340 aminoácidos e peso molecular entre 30 a 40KDa, apresentando-se evolutivamente conservada (JOH *et al.*, 1987; GOWARD; NICHOLS, 1994). A MDHc de *A. mellifera*, codificada pelo gene apresentado neste estudo, possui 333 aminoácidos e peso molecular estimado em 36,1 KDa, próximo aos pesos moleculares estimado em pupas por filtração em gel (DEL LAMA, 1982) e em larvas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS-uréia (SNYDER *et al.*, 1979). A similaridade com a MDHc de outros organismos é elevada, sendo de 60,42 % a identidade com a de humanos (NP_005908) e de 66,97 % com a putativa MDHc de *Drosophila melanogaster* (AAF52935). Apesar dessa alta similaridade na seqüência primária da proteína, a estrutura do gene mostra-se menos conservada, variando de dois éxons em *D. melanogaster* (FlyBase: CG5632) a nove éxons em humanos (Ensembl: ENSG00000014641). A seqüência do gene *Mdh-1* de *A. mellifera* apresenta um elevado conteúdo de A-T (71,93 %, enquanto em humanos o conteúdo de A-T é de 61,95 % e de 66,97 % em *D. melanogaster*), como é característico do genoma de *A. mellifera* (HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006).

O resíduo Arg102 (numeração segundo Eventoff *et al.* (1977)), identificado como sítio da especificidade ao substrato (CENDRIN *et al.*, 1993; BOERNKE *et al.*, 1995) apresenta-se conservado, assim como o resíduo Asp53 (associado à especificidade de ligação de NAD⁺) e os resíduos Arg109, Asp168, Arg171 e His195 (envolvidos no mecanismo catalítico (GOWARD; NICHOLLS, 1994)) também se mostram conservados. Embora seja um gene conservado, com 0,8 % de sítios polimórficos nas seqüências analisadas, cinco das seis mutações localizadas em éxons são não-sinônimas. Comparando-se com a estrutura da MDHc de suíno (BIRKTOFT *et al.*, 1989) (Anexo A), uma das cinco substituições (Pro148 → Ser – *Mdh-1*^{100e}) está localizada em um loop na estrutura secundária da enzima, e quatro das substituições (Asp215 → Asn – *Mdh-1*⁸⁰; Glu114 → Lys, Val209 → Ile, Ile259 → Val – *Mdh-1*⁶⁵) estão localizadas em estruturas em α -hélice da molécula (α 1G, α DE, α G', α 3G, respectivamente). α 1G, α G' e α 3G estão no domínio catalítico da enzima, sendo que a α -hélice α 3G apresenta um dos lados em contato com o substrato e o outro lado em contato com outra subunidade da enzima.

A ancestralidade do alelo *Mdh-1*¹⁰⁰, sugerida pelo padrão dos polimorfismos observados e pelo fato das mutações características dos outros alelos derivarem

deste alelo, se encaixa no cenário evolutivo no qual a espécie *A. mellifera* teria se originado em regiões subtropicais ou tropicais da África (WHITFIELD *et al.*, 2006), onde o alelo *Mdh-1*¹⁰⁰ mostra-se praticamente fixado com frequência variando entre 0,95 a 1,00 (NUNAMAKER; WILSON, 1981; NDIRITU *et al.*, 1986).

A variante eletroforética M difere da variante ancestral F apenas por um resíduo na posição 215, enquanto a variante S difere do ancestral F em três resíduos, porém apenas um deles, na posição 114, altera a carga da proteína e confere menor mobilidade anódica para esta variante. Ainda que estas substituições não sejam em resíduos críticos para a atividade da enzima, podem alterar a estrutura terciária ou as propriedades físico-químicas da enzima e justificar as relatadas diferenças na termoestabilidade das alozimas (CORNUET *et al.*, 1995) e a possível ação da seleção natural. Fields *et al.* (2006), estudando espécies do gênero *Mytilus*, e Dong & Somero (2009), estudando espécies do gênero *Lottia*, concluíram que diferenças na termoestabilidade da MDHc podiam ser atribuídas a substituições de um único resíduo na seqüência da enzima, e influenciar na adaptabilidade à temperatura das diferentes espécies.

Além disso, com as seqüências dos alelos é possível verificar se as diferenças na mobilidade eletroforética e, portanto, as substituições associadas, são o alvo da seleção ou se estas somente são marcadores de outros sítios que estejam sendo selecionados, e se os clines latitudinais observados para esse loco são realmente mantidos por pressões seletivas associadas à temperatura (CORNUET *et al.*, 1995), ou outros fatores como diferenças na capacidade de vôo (HARRISON *et al.*, 1996) ou no consumo de O₂ (COELHO; MITTON, 1988).

Como as mutações em ponto responsáveis pelas diferenças de mobilidade eletroforética das variantes ocorreram em sítios próximos, o seqüenciamento de apenas um fragmento, F8R14 (506 pb de DNA genômico; 434 pb cDNA), é necessário para fenotipar os indivíduos de interesse. Um método alternativo também é proposto aqui, a fenotipagem por PCR alelo-específico. Com três reações de amplificação é possível fenotipar os indivíduos, ainda que a identificação do alelo *Mdh-1*¹⁰⁰ por amplificação alelo-específica não tenha sido possível, somente inferindo-se a presença dele de modo indireto. Ambos os métodos propostos para fenotipar os indivíduos para o loco *Mdh-1*, por seqüenciamento ou por PCR alelo-específico, apresentam vantagens em relação à fenotipagem pela análise alozímica,

pois não requer que as amostras sejam mantidas em baixas temperaturas (-20° C, por exemplo), dado que a atividade da enzima não necessita ser preservada.

O conhecimento da estrutura do gene *Mdh-1* de *A. mellifera* e a caracterização molecular do polimorfismo alozímico da MDHc facilitam o estudo deste marcador ao possibilitar um método prático e confiável de fenotipagem dos indivíduos amostrados. Também fornecem informações valiosas para futuros estudos moleculares, bioquímicos e estruturais, de forma que se possa compreender o significado funcional deste polimorfismo enzimático.

4.6 Referências Bibliográficas

- BADINO, G.; CELEBRANO, G.; MANINO, A. Population structure and *Mdh-1* locus variation in *Apis mellifera ligustica*. *The Journal of Heredity*, v. 74, n. 6, p. 443–446, 1983.
- BADINO, G.; CELEBRANO, G.; MANINO, A. Population genetics of Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica* Spin.) and its relationships with neighbouring subspecies. *Bollettino del Museo Regionale di Scienze Naturali (Torino)*, v. 2, p. 571–584, 1984.
- BIRKTOFT, J.J.; RHODES, G.; BANASZAK, L.J. Refined crystal structure of cytoplasmic malate dehydrogenase at 2.5-Å resolution. *Biochemistry*, v. 28, p. 6065–6089, 1989.
- BOERNKE, W.E. *et al.* Stringency of substrate specificity of *Escherichia coli* malate dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 332, p. 43–52, 1995.
- CENDRIN, F. *et al.* Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for malate dehydrogenase of the extremely halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry*, v. 32, p. 4308–4313, 1993.
- COELHO, J.R.; MITTON, J.B. Oxygen consumption during hovering is associated with genetic variation in honey-bees. *Functional Ecology*, v. 2, p. 141–146, 1988.
- CONTEL, E.P.B.; MESTRINER, M.A.; MARTINS, E. Genetic control and developmental expression of malate dehydrogenase in *Apis mellifera*. *Biochemical Genetics*, v. 15, n. 9-10, p. 859–875, 1977.
- CORNUET, J.M.; OLDROYD, B.P.; CROZIER, R.H. Unequal thermostability of allelic forms of malate dehydrogenase in honey bees. *Journal of Apicultural Research*, v. 34, p. 45–47, 1995.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, v. 16, n. 22, p. 10881–10890, 1988.
- DEL LAMA, M.A. *Estudos genéticos e bioquímicos das isoenzimas de malato desidrogenase de Apis mellifera*. 1982. 104 f. Tese (Doutorado em Genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 1982.
- DEL LAMA, M.A. *et al.* Genetic differentiation estimated by isozymic analyses of Africanized bee populations from Brazil and from Central America. *Apidologie*, v. 21, n. 4, p. 271–280, 1990.
- DEL LAMA, M.A. *et al.* Clinal variation and selection on MDH allozymes in honeybees in Chile. *Hereditas*, v. 140, p. 149–153, 2004.
- DONG, Y.; SOMERO, G.N. Temperature adaptation of cytosolic malate dehydrogenases of limpets (genus *Lottia*): differences in stability and function due to

minor changes in sequence correlate with biogeographic and vertical distributions. *Journal of Experimental Biology*, v. 212, p. 169–177, 2009.

EVENTOFF, W. *et al.* Structural adaptations of lactate dehydrogenase isozymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 74, p. 2677–2681, 1977.

FIELDS, P.A.; RUDOMIN, E.L.; SOMERO, G.N. Temperature sensitivities of cytosolic malate dehydrogenases from native and invasive species of marine mussels (genus *Mytilus*): sequence-function linkages and correlations with biogeographic distribution. *Journal of Experimental Biology*, v. 209, p. 656–677, 2006.

GIETL, C. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1100, n. 3, p. 217–234, 1992.

GOWARD, C.R.; NICHOLS, D.J. Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Science*, v. 3, p. 1883–1888, 1994.

HARRISON, J.F.; NIELSEN, D.I.; PAGE, R.E. Malate dehydrogenase phenotype, temperature and colony effects on flight metabolic rate in the honey-bee, *Apis mellifera*. *Functional Ecology*, v. 10, p. 81–88, 1996.

HATTY, S.; OLDROYD, B.P. Evidence for temperature-dependent selection for malate dehydrogenase allele frequencies in honeybee populations. *The Journal of Heredity*, v. 90, p. 565–568, 1999.

HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, v. 443, n. 7114, p. 931–949, 2006.

JOH, T. *et al.* Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding mammalian cytosolic malate dehydrogenase. Comparison of the amino acid sequences of mammalian and bacterial malate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 262, p. 15127–15131, 1987.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, v. 22, n. 12, p. 2577–2637, 1983.

LIN, J. *et al.* Phylogenetic relationships and biochemical properties of the duplicated cytosolic and mitochondrial isoforms of malate dehydrogenase from a teleost fish, *Sphyaena idiaestes*. *Journal of Molecular Evolution*, v. 54, n. 1, p. 107–117, 2002.

LOBO, J.A.; DEL LAMA, M.A.; MESTRINER, M.A. Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee (*Apis mellifera* L.). *Evolution*, v. 43, n. 4, p. 794–802, 1989.

NDIRITU, D.W.; MUTUGI, N.; NDUNG'U, S. Variation in malate dehydrogenase allozymes among honeybee populations in Kenya. *Journal of Apicultural Research*, v. 25, p. 234–237, 1986.

NIELSEN, D.; PAGE, R.E.; CROSLAND, M.W.J. Clinal variation and selection of MDH allozymes in honey bee populations. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 50, n. 9, p. 867–871, 1994.

NUNAMAKER, R.A.; WILSON, W.T. Comparison of MDH allozyme patterns in the African honey bee (*Apis mellifera adansonii* L.) and the Africanized populations of Brazil. *Journal of the Kansas Entomological Society*, v. 54, p. 704–710, 1981.

O'BRIEN, S. Comparative analysis of malate dehydrogenase of *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Genetics*, v. 10, n. 2, p. 191–205, 1973.

RUTHERFORD, K. *et al.* Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, v. 16, n. 10, p. 944–945, 2000.

SHEPPARD, W.S.; MCPHERON, B.A. Ribosomal DNA diversity in Apidae. In: *Diversity in the genus Apis*. Smith D.R. (Ed.). Boulder(CO): Westview Press, 1991. pp 89–102.

SNYDER, T.P.; CHAMBERS, G.K.; AYALA, F.J. Isolation of the cytoplasmic form of malate dehydrogenase from honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 88, p. 668–675, 1979.

STANKE, M.; MORGENSTERN, B. AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. *Nucleic Acids Research*, v. 33, p. W465–W467, 2005.

WHITFIELD, C.W. *et al.* Annotated Expressed Sequence Tags and cDNA Microarrays for Studies of Brain and Behavior in the Honey Bee. *Genome Research*, v. 12, p. 555–566, 2002.

WHITFIELD, C.W. *et al.* Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, v. 314, n. 5799, p. 642–645, 2006.

APÊNDICE A - Protocolos utilizados para amplificação alelo-específica dos alelos *Mdh-1⁸⁰* (A) e *Mdh-1⁶⁵* (B).

PROTOCOLO A	PROTOCOLO B
16,25 µL H ₂ O	17,0 µL H ₂ O
2,5 µL dNTPs 2,5 mM	2,5 µL dNTPs 2,5 mM
2,5 µL Buffer <i>Invitrogen</i> 10x	2,5 µL Buffer <i>Invitrogen</i> 10x
0,75 µL MgCl ₂ <i>Invitrogen</i> 50 mM	1,0 µL MgCl ₂ <i>Invitrogen</i> 50 mM
0,5 µL Primer F3 25 µM	0,4 µL Primer F3 25 µM
0,5 µL Primer R13 25 µM	0,4 µL Primer R11 25 µM
1,0 µL Taq (<i>Biotoools</i>) 1U/µL	0,2 µL Taq Platinum (<i>Invitrogen</i>) 5U/µL
1,0 µL DNA	1,0 µL DNA

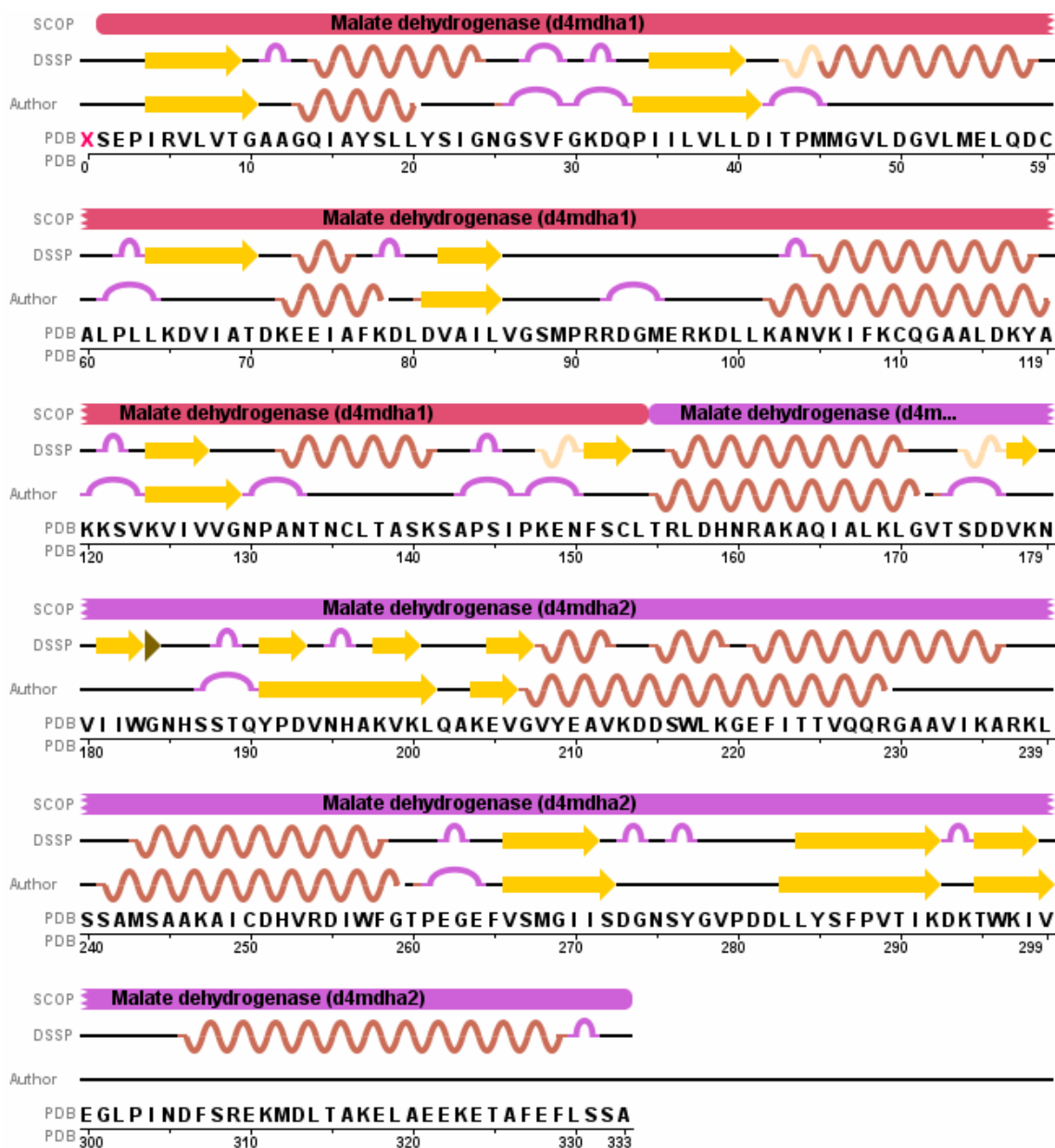
APÊNDICE B – Sequência nucleotídica do alelo *Mdh-1^{100a}* de *Apis mellifera*. A região em azul corresponde às regiões UTR 5' e UTR 3'; as seqüências dos introns estão representadas em vermelho e os códons representados em preto com os respectivos aminoácidos indicados acima. Sítios polimórficos estão sublinhados; possível sinal de poliadenilação está marcado por um retângulo. *: Stop códon.

TAAGTCGCTATTACAGCAATCATCCTAACTGACCTTAGTCCTCGAGAGTTCGATAAACTGATTTTAAATATTGTCATTTAAAAATA
 TCATTATAAAAAAAGCTAAAAA ^M ATG **GTAAGTTCTAAGAAACATATTAATTTTACATTATAAAAATTAATGTAAAAATAGTTT**
 AAAAAATTTTATTTTATATTAAAGAAATTAATTAACCTATAATTTGACCTTCAATATTTATTATATATCGATTGCTTTTTTATTATCATA
 TATTAATTTTAAATATAATACITTGATTTAACCCCTGTATTAACAGAAATCGATTTAAATAAAAATTTAAAAATAAAAATAATTTTAA
 GAAAAATTAATAAATTAATTAATTTTATATTATAATTAATAATGAATTAATTAATAAATTTTAAATTTTAAATTTGCATTTAT
GTGATTTATGTTTTTTTAAATTTCTAG S E P I N V V V T G A A G Q
 AGT GAA CCA ATA AAT GTG GTA GTT ACT GGA GCT GCA GGA CAA
 I A Y S L L Y Q L A A G T V F G P N Q P I
 ATT GCT TAT TCT TTA TTA TAT CAA CTT GCT GCT ACA GTT TTT GGT CCA AAT CAA CCA ATT
 N L R L L D I P V M M K V L D G V V M E L
 AAT CTT CGT TTG TTA GAT ATT CCA GTT ATG ATG AAA GTA TTA GAT GGA GTA GTT ATG GAA TTG
 E D L A L P L L R
 GAA GAT TTA GCT CTT CCA CTT TTA AGG G **GTA**AAAAATATAAATTTATAAATTAAGATATATTATAAAAATTTCTCTT
 TGATTTGGATAITTTAAACAAAATTAATTTCTATATTAGAAAAAATTTGAATCATAATAGTTTCTGATAAAATATAACAAAAAACATTTAT
 GTAACATTATATACTGTTATATAAATGCACCTTAACATAATATGATGATTTGTTTTTATTTATTTCTTAATTTTAAATAAAAAATA**CA**

TGCTATATATTTTGATTTTAAATAGTTTCATTATATAAAATTTTGGTTTGTAG E V V P T A D P
AA GTT GTT CCT ACA GCT GAT CCA
F K N V A A A F L V G A M P R K E G M E R
TTC AAA AAT GTA GCT GCA GCT TTT CTG GTT GGA GCA ATG CCT CGA AAA GAA GGA ATG GAA AGA
K D L L A A N V E I F K V Q G E A L D K Y
AAA GAT CTT TTA GCA GCT AAT GTA GAA ATT TTT AAA GTT CAA GGA GAA GCT TTG GAC AAA TAT
A Q K D V K V L V V G N P A N T N A L I C
GCT CAA AAA GAT GTT AAA GTT TTA GTT GGT AAT CCT GCT AAC ACA AAT GCT TTA ATT TGC
S H Y A P S I P K E N F T A M T R L D Q N
TCT CAT TAT GCA CCA TCC ATT CCA AAA GAA AAT TTT ACT GCT ATG ACA AGA TTG GAT CAA AAT
R A Q A A L S A K L N V Q
CGC GCT CAA GCA GCA TTA TCA GCA AAA TTG AAT GTT CAG **GTGATTAATATTTTATTTATATAAAAAAAA**
TAGATTTATAAAATTTTAAACAAAATAATATATGCAATAG V D K V K N V I I W G
GTT GAT AAA GTA AAA AAT GTT ATT ATT TGG GGT
N H S S T Q Y P D A S H A T V A L Q S S T
AAT CAC AGT TCA ACT CAA TAT CCT GAT GCT TCT CAT GCT ACT GTA GCT CTT CAA AGT TCC ACC
K P V S L A I N D E N W L N T T F V E T I
AAG CCA GTA TCT TTA GCT ATA AAT GAT GAA AAT TGG TTA AAT ACT ACT TTT GTG GAA ACA ATT
Q K R G A A V I A A R K M S S A M S A A K
CAG AAA CGT GGT GCA GCT GTA ATA GCT GCC AGA AAG ATG TCA TCT GCA ATG TCA GCT GCT AAA
A A G D H M R D W W I G T K P G E W V S M
GCA GCT GGA GAT CAC ATG AGA GAT TGG TGG ATT GGT ACC AAA CCA GGT GAA TGG GTT AGC ATG
G V L S D G S Y G I P K D I V F S F P V T
GGT GTA TTA TCT GAT GGC AGT TAT GGA ATT CCA AAG GAT ATT GTG TTT TCT TTC CCA GTT ACT

I E N G Q Y K I V Q
 ATA GAA AAT GGA CAA TAC AAA ATT GTT CAA **GTAATAATCITTTTTTATATAATTAATTTTTTATATAATTTTTTATATATT**
ATATTTTTATATTTAAATAATAATTTTTAAACAAAAAATAATTTACATTTGATTTCTTAG G L S I N D F
 GGA CTT TCA ATC AAT GAC TTT
 A R S K L N I T S N E L E E R A E A K N
 GCT AGA TCA AAG TTA AAT ATT ACA TCT AAT GAA TTA GAA GAG GAA CGT GCA GAA GCA AAA AAT
 V L H E K *
 GTA TTA CAT GAA AAG TGA **CTAAAAATCAGTAAAATTATGATACTACAAGCCCAATTACTTGTTCCTGGCAAAAATTGTAGAA**
AAATAAA **AAATTTGATGATAATAC**

ANEXO A – Estrutura secundária da MDHc predita a partir da seqüência de aminoácidos da MDHc de suíno (BIRKTOFT *et al.*, 1989) (PDB: 4MDH). ‘DSSP’ indica previsão da estrutura secundária baseada em Kabsch & Sander (1983) e ‘Author’ indica estrutura secundária aprovada por Birktoft *et al.* (1989). Setas (amarelas) representam estruturas de folha- β , ondulações (marrom) representam estruturas em α -hélice e curvas (roxo) representam ligações por pontes de hidrogênio.



Capítulo 2

5. Análise da expressão da malato desidrogenase citoplasmática (MDHc) e mitocondrial (MDHm) no desenvolvimento ontogenético de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Keize Nagamati Junior¹, Tathyana Rachel Palo Mello², Marco Antonio Del Lama¹ e Zilá Luz Paulino Simões²

¹ Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros

Departamento de Genética e Evolução

Universidade Federal de São Carlos

São Carlos – SP – Brasil

² Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas

Departamento de Biologia

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Ribeirão Preto – SP – Brasil

5.1 Resumo

A malato desidrogenase (MDH, E.C. 1.1.1.37), uma importante enzima no metabolismo central, é encontrada em duas formas nas células eucarióticas animais, uma citoplasmática (MDHc) e outra mitocondrial (MDHm). Variação no padrão eletroforético da MDHc durante o desenvolvimento ontogenético de *Apis mellifera* já foram relatados, no qual as pupas apresentam um padrão mais complexo do que larvas e adultos. Neste capítulo, nós investigamos a expressão dos genes *Mdh-1* (MDHc) e *Mdh-2* (MDHm) durante o desenvolvimento de *A. mellifera*. Ambos os genes apresentam perfil de expressão com a característica forma em U, com elevada expressão nas fases iniciais de larva e mais avançadas de pupa, e redução significativa nas fases de transição entre larva e pupa. Os resultados da semi-quantificação da expressão gênica e da quantificação da atividade enzimática são concordantes, porém algumas discrepâncias são observadas em algumas fases de pupa. Nossos resultados também demonstram que as isoformas adicionais da MDHc são características do corpo gorduroso e hemolinfa e surgem ao final da fase larval e começam a desaparecer com o início da pigmentação das pupas.

Palavras-chave: atividade enzimática, *Mdh-1*, *Mdh-2*, perfil de expressão, RT-PCR semi-quantitativo

5.2 Introdução

A abelha *Apis mellifera* é um inseto holometábolo, uma vez que seu desenvolvimento ontogenético percorre os estágios específicos de ovo, larva, pupa e adulto (HEMING, 2003). A fase larval é basicamente um período de alimentação para incremento de massa e acúmulo de reserva energética que será utilizada nas fases seguintes (DOWNER; MATTHEWS, 1976). Durante a fase de pupa, geralmente imóvel, ocorre a metamorfose da larva pouco diferenciada na forma do adulto altamente especializado, com complexas alterações morfológicas e fisiológicas sem nenhum influxo de energia, resultando num balanço energético negativo (DOWNER, 1981). Os adultos são bastante ativos, com atividades relacionadas primordialmente com a manutenção e reprodução.

As atividades realizadas em cada estágio do desenvolvimento necessitam demandas energéticas específicas e promovem alterações metabólicas, além de diferentes fontes poderem ser utilizadas para obtenção da energia necessária (DUTRA *et al.*, 2007). Portanto, é esperado que as enzimas apresentem expressão diferencial para suprir essa demanda ao longo do desenvolvimento (AVISE; MCDONALD, 1976).

A malato desidrogenase (MDH; E.C. 1.1.1.37) é uma enzima fundamental no metabolismo central das células animais que catalisa a oxidação reversível de L-malato a oxaloacetato utilizando NAD^+ como aceptor de elétrons. Encontrada em duas isoformas distintas, a isoforma MDHc (codificada pelo gene nuclear *Mdh-1*) está presente no citoplasma e atua no *shuttle* da malato-aspartato, possibilitando que equivalentes redutores (NADH) sejam transportados através da membrana mitocondrial na forma de malato. A isoforma MDHm (codificada pelo gene nuclear *Mdh-2*) está localizada na matriz mitocondrial, e além de atuar no *shuttle* da malato-aspartato, também desempenha função essencial no ciclo do ácido tricarbóxico.

Alterações qualitativas e quantitativas na expressão da MDH durante o desenvolvimento já foram relatadas para insetos como *Culex quinquefasciatus*, *Hyalophora cecropia* e *Samia cynthia* (LAUFER, 1961; NARANG; NARANG, 1975). Em *A. mellifera*, análises eletroforéticas (zimogramas) indicam que a MDHc possui expressão diferencial durante o desenvolvimento ontogenético (CONTEL *et al.*, 1977). Os padrões alozímicos em pupas são mais complexos do que os padrões de larvas e adultos, já que isoformas restritas ao estágio pupal são observadas. Neste

trabalho relatamos o padrão eletroforético de MDHc e MDHm, a atividade enzimática da MDH e o perfil da expressão dos genes *Mdh-1* e *Mdh-2*, procurando associar a expressão deste sistema enzimático no contexto das alterações metabólicas ocorridas durante o desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera*.

5.3 Material e Métodos

5.3.1 Material

Foram utilizadas abelhas *A. mellifera* africanizadas (AHB) de colônias mantidas no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP – USP). As fases do desenvolvimento foram identificadas seguindo os critérios estabelecidos por Michellete & Soares (1993), sendo: L1, L2, L3, L4, L5F1, L5F2, L5F3, L5S1, L5S2 e L5S3: sucessivas fases de larva; PP1, PP2, PP3: fases de pré-pupa; Pw: pupa de olho branco; Pp: pupa de olho rosa; Pdp: pupa de olho rosa escuro; Pb: pupa de olho marrom; Pbl: pupa com corpo levemente pigmentado; Pbm: pupa com corpo moderadamente pigmentado; Pdb: pupa com corpo pigmentado; RN: adulto recém emergido.

5.3.2 Ensaio espectrofotométrico

A atividade da MDH de *A. mellifera* foi medida espectrofotometricamente seguindo-se ou a redução do NAD ou a oxidação do NADH em 340 nm.

Na direção da redução do NAD⁺ (L-malato + NAD⁺ → oxaloacetato + NADH), os ensaios foram realizados em tampão glicinato 100 mM pH 10,0 contendo 25 mM de ácido L-málico (neutralizado a pH 7,5 com NaOH) e 1 mM β-NAD (neutralizado a pH 6,5 com NaOH) em volume final de 3,0 mL, em cubetas de 1,0 cm de caminho óptico. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, utilizando-se espectrofotômetro Zeiss PM QII. A velocidade inicial ($\Delta A_{340} / \text{min}$), no intervalo de 0,004 – 0,08, foi utilizada para cálculo de atividade.

Na direção reversa (oxaloacetato + NADH → L-malato + NAD⁺), a mistura de reação padrão continha tampão fosfato 100 mM pH 7,5, 0,5 mM oxaloacetato (em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5) em um volume final de 1,5 mL, em cubetas de 1,0 cm

de caminho óptico. Os ensaios foram feitos a 37° C, em espectrofotômetro Beckman DU-25. A velocidade inicial (0,02 – 0,25) foi utilizada para cálculo da atividade.

Uma unidade de atividade da MDH foi definida como a quantidade de enzima requerida para oxidar ou reduzir 1 μmol de coenzima por minuto, sob as condições descritas, e foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{unidades E/ml} = \frac{\Delta A_{340} / \text{min} \times \text{fator diluição}}{6,22 \times \text{mL enzima/mL mistura de reação}}$$

5.3.3 Inseminação Artificial de Rainha

Utilizamos uma rainha de genótipo *Mdh-1⁶⁵/Mdh-1⁶⁵* e a inseminamos instrumentalmente com sêmen de vários zangões de genótipo *Mdh-1¹⁰⁰*. A rainha foi presa com o auxílio de uma tela metálica em uma área delimitada de um quadro previamente preparado (sem cria, mas com algum alimento), onde se permitiu a postura. Após 6 horas, a rainha foi retirada e através das malhas da tela, as operárias tinham acesso à postura, permitindo-lhes desempenhar a tarefa de cuidar da cria. Em intervalos sucessivos de tempo, amostra de 3 a 5 indivíduos de idade conhecida era retirada para verificar o padrão eletroforético da MDHc.

5.3.4 Análise alozímica

As análises eletroforéticas foram realizadas como descrito no Capítulo 1.

5.3.5 Extração de RNA e Síntese de cDNA

A extração de RNA e síntese do cDNA procedeu como descrito no Capítulo 1.

5.3.6 Análise de expressão semi-quantitativa por RT-PCR

A análise de expressão foi efetuada para os genes *Mdh-1* (primers F8 + R14) e *Mdh-2* (primers MDH2F e MDH2R) para diferentes fases do desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera*. O gene *RP49* (proteína ribossomal 49, NM_001011587) foi utilizado como controle endógeno. Os primers utilizados estão apresentados na Tabela 1.

O volume final de cada reação foi de 20 µl, contendo *Master Mix* 1 x (*Promega*) e 0,4 µM de cada primer e 1,0 µL de cDNA. As condições das reações para o gene *Mdh-1* foram 2 minutos iniciais a 94° C, 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 52° C por 30 segundos e 72° C por 30 segundos, e 5 minutos finais a 72° C. Para o gene *Mdh-2*, o número de ciclos foi reduzido a 28, e para o *RP49* a temperatura de hibridização foi elevada a 60° C e os ciclos reduzidos a 26.

Para cada fase do desenvolvimento foram feitas triplicatas biológicas, e para cada uma foram realizadas triplicatas técnicas. O produto das reações foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo. A densidade relativa das bandas foi obtida pela análise de densidade óptica utilizando o software Kodak 1D Image Analysis (Kodak Scientific Imaging Systems, Rochester, NY).

Tabela 1 – Primers utilizados nos experimentos de semi-quantificação por RT-PCR.

Primer	Seqüência 5' -> 3'	Gene
F8	GCCTCGAAAAGAAGGAATGG	<i>Mdh-1</i>
R14	TTACAGCTGCACCACGTTTC	<i>Mdh-1</i>
MDH2F	CGTTCTCCATTAAGTGCTTTG	<i>Mdh-2</i>
MDH2R	GATCTTACACAGGCTATAGCAG	<i>Mdh-2</i>
RP49F	CGTCATATGTTGCCAACTGGT	<i>RP49</i>
RP49R	TTGAGCACGTTCAACAATGG	<i>RP49</i>

5.3.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o pacote estatístico BioEstat 5.0. Para a comparação da expressão de um gene entre as fases do desenvolvimento foi utilizado o teste Kruskal-Wallis ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Student-Newman-Keul. A correlação entre a expressão dos genes *Mdh-1* e *Mdh-2* foi calculada utilizando o coeficiente de correlação de Spearman.

5.4 Resultados

5.4.1 Expressão temporal dos alelos maternos e paternos da *Mdh-1*

A inseminação instrumental de rainha *Mdh-1⁶⁵/Mdh-1⁶⁵* com zangão *Mdh-1¹⁰⁰* possibilitou a obtenção de operárias heterozigotas *Mdh-1¹⁰⁰/Mdh-1⁶⁵* e,

consequentemente, a determinação do padrão de expressão temporal do alelo materno e paterno de *Mdh-1* na prole heterozigota (Figura 1).

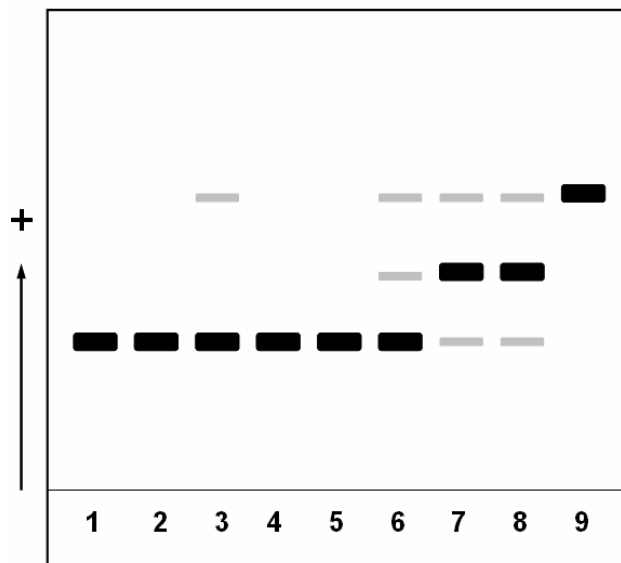


Figura 1 – Esquema do padrão eletroforético da MDHc em ovos que originarão operárias, descendentes de um acasalamento entre rainha *Mdh-1⁶⁵/Mdh-1⁶⁵* e zangões *Mdh-1¹⁰⁰*. 1: padrão *Mdh-1⁶⁵/Mdh-1⁶⁵*; 2: ovos (0 – 2 horas); 3: ovos (2 – 4 horas); 4: ovos (5 – 7 horas); 5: ovos (21 – 24 horas); 6: ovos (48 horas); 7: ovos (60 – 64 horas); 8: padrão *Mdh-1¹⁰⁰/Mdh-1⁶⁵*; 9: padrão *Mdh-1¹⁰⁰/Mdh-1¹⁰⁰*.

Análises eletroforéticas demonstraram que os ovos recém-postos apresentam o padrão do homozigoto *Mdh-1⁶⁵/Mdh-1⁶⁵*, indicando que o alelo paterno não se expressa durante este período. Ovos com 2 – 4 horas de idade apresentavam, além da região correspondente ao homozigoto *Mdh-1⁶⁵/Mdh-1⁶⁵*, uma região de menor intensidade e de mobilidade eletroforética semelhante à região correspondente ao homozigoto *Mdh-1¹⁰⁰/Mdh-1¹⁰⁰*. O aparecimento do padrão eletroforético de três regiões de atividade se dá por volta de 48 horas após a postura e torna-se o padrão característico dos heterozigotos *Mdh-1¹⁰⁰/Mdh-1⁶⁵* em ovos de 60 - 64 horas.

5.4.2 Perfil eletroforético da MDHc e da MDHm no desenvolvimento ontogenético e nos diferentes órgãos de *A. mellifera*

A MDHm não apresentou variação no padrão eletroforético ao longo do desenvolvimento e nos diferentes órgãos analisados de *A. mellifera*, ao contrário da

MDHc, que apresentou novas isoformas em tecidos específicos durante um determinado do período de desenvolvimento.

O aparecimento da região adicional de atividade da MDHc se dá aos 6 dias da vida larval (L5S3 – PP1). A intensidade da região “extra” vai aumentando, até se observar o padrão característico de pupa ao final do estágio larval (8 - 9 dias – PP3). O desaparecimento desta região adicional também se verifica lentamente. No início da pigmentação do tórax (5° - 6° dia do estágio de pupa - Pbl), a região extra, mais anódica, começa a diminuir de intensidade. Quarenta e oito horas após, quando o processo de pigmentação está avançado (Pbd), o padrão eletroforético que se observa é o verificado em indivíduos adultos.

A análise eletroforética dos diferentes órgãos de Pw demonstrou que as regiões adicionais da MDHc que se observam nas pupas estão presentes apenas na hemolinfa e no corpo gorduroso (Figura 2). O padrão obtido nos demais órgãos (tubo digestivo completo, cérebro e ovário) é semelhante ao obtido na análise de larvas e adultos.

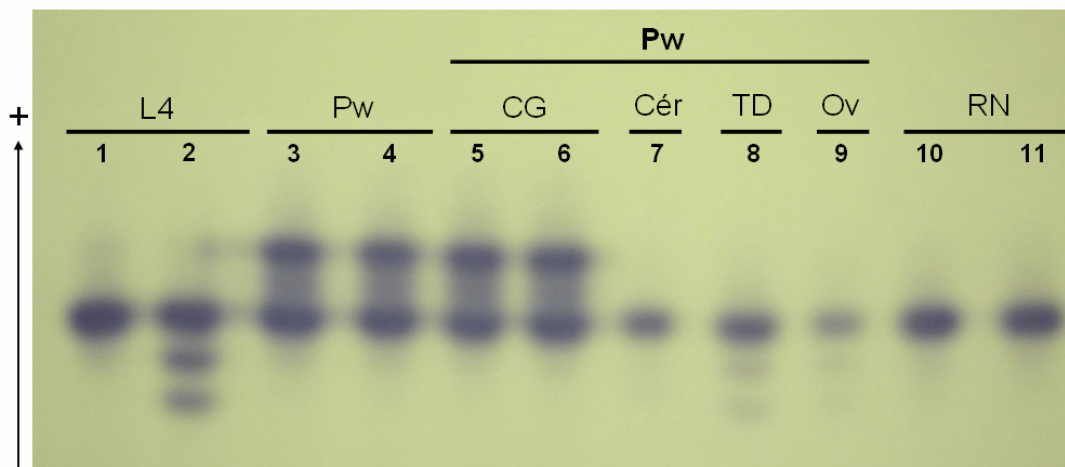


Figura 2 – Padrão eletroforético da MDH em diferentes fases do desenvolvimento e em diferentes tecidos de Pw de operárias de *Apis mellifera*. As isoformas específicas do estágio pupal são observadas apenas em extratos do corpo gorduroso e hemolinfa (5 e 6). 1 e 2: Extrato de larvas L4; 3 e 4: extrato de corpo inteiro de Pw; 5 e 6: extrato de CG; 7: extrato de cérebro; 8: extrato de TD; 9: extrato de Ov; 10 e 11: extrato de corpo inteiro de RN. Em 2, 8 e 9 é possível observar polimorfismo genético da MDH. L4: 4° estágio larval; Pw: pupa de olho branco; CG: corpo gorduroso; Cér: cérebro; TD: tudo digestivo; Ov: ovário; RN: adultos recém-emergidos.

5.4.3 Atividade enzimática da MDH no desenvolvimento de *A. mellifera*

A quantificação da atividade da MDH em estágios sucessivos do desenvolvimento ontogenético de operárias de *A. mellifera* evidenciou que larvas e adultos apresentam níveis mais altos de atividade enzimática (Tabela 2).

Os resultados sugerem que a atividade da MDH é alta em larvas mais jovens (3 a 5 dias – L3 a L5F3), diminuindo nos estágios seguintes. Nas fases iniciais de pupa, à medida que a atividade enzimática diminui, a quantidade da proteína nos homogeneizados também diminui.

Quando se inicia o processo de pigmentação do corpo das operárias (Pbl), a atividade enzimática e a quantidade de proteína diminuem acentuadamente; em consequência, a atividade específica aumenta ligeiramente. Nas operárias recém-emergidas (RN), a atividade enzimática aumenta marcante e abruptamente, elevando consideravelmente a atividade específica.

Tabela 2 – Atividade da MDH em sucessivos estádios do desenvolvimento ontogenético de operárias de *Apis mellifera*. O ensaio enzimático foi realizado no sentido da oxidação do NADH.

Estádio do Desenvolvimento	U enz./mL	Mg prot./mL	Atividade Específica U/mg
Larva (3 - 5 dias)	38,2 ± 0,3	8,5 ± 0,2	4,5
Larva (6 - 7 dias)	29,8 ± 0,4	9,5 ± 0,2	3,1
Pré-Pupa	30,4 ± 0,5	10,0 ± 0,2	3
Pupa olho branco	26,6 ± 0,4	9,7 ± 0,2	2,7
Pupa olho marrom	24,4 ± 0,3	8,9 ± 0,04	2,7
Pupa em pigmentação	14,2 ± 0,2	5,4 ± 0,1	2,6
Pupa pigmentada	12,0 ± 0,05	3,1 ± 0,1	3,9
Recém-emergida	32,0 ± 0,4	3,2 ± 0,2	10

5.4.4 Perfil de expressão dos genes *Mdh-1* e *Mdh-2*

O gene *Mdh-1*, codificante da MDHc, apresentou diferença visível na semiquantificação a partir de 35 ciclos da RT-PCR, enquanto o gene *Mdh-2*, codificante da MDHm, apresentou diferença a partir de 28 ciclos.

A amplitude de variação observada para o gene *Mdh-2* (-6,60 ~ 115,92) foi maior do que a observada para o gene *Mdh-1* (6,42 ~ 75,67) (Apêndice A). No entanto, o perfil de expressão dos dois genes apresentou-se bastante similar (coeficiente de correlação de Spearman = 0,8058; $p < 0,0001$) (Figura 3). Ambos os genes apresentam expressão alta nas fases iniciais de larva e fases finais de pupa e no recém-emergido. Durante as fases finais de larva e iniciais de pupa, principalmente no período de transição de larva a pupa, a expressão tem uma redução significativa (Tabela 3).

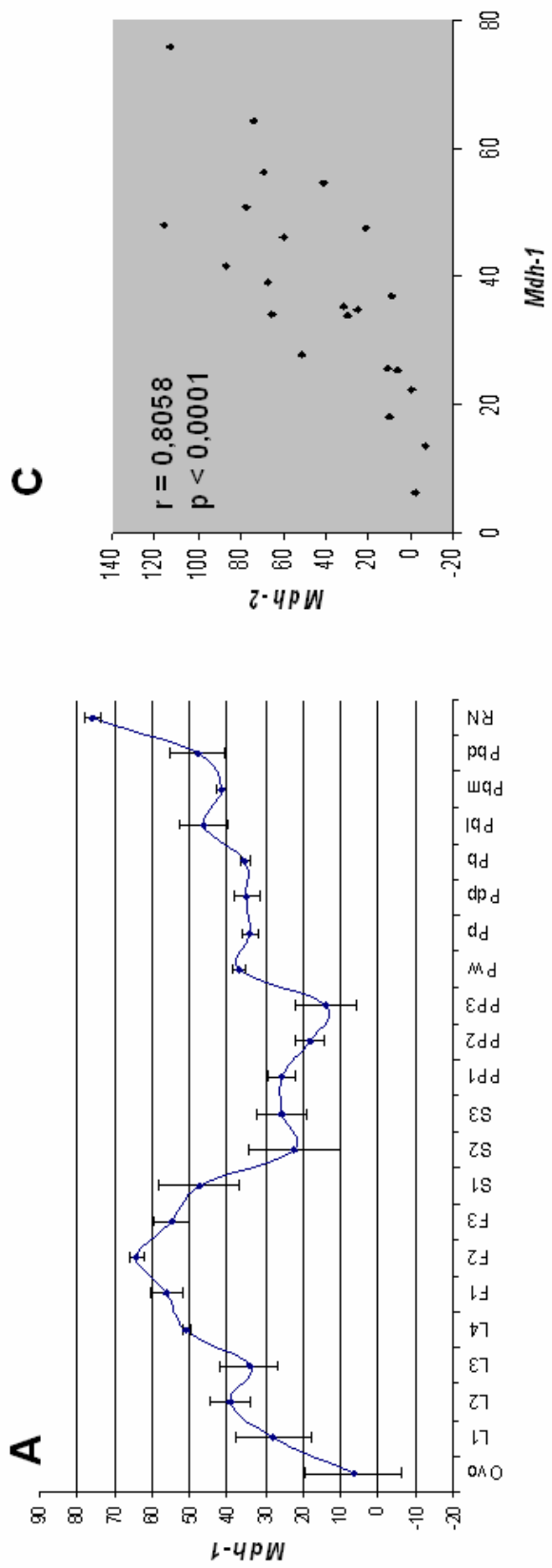


Figura 3 – Análise semi-quantitativa da expressão dos genes (A) *Mdh-1* e (B) *Mdh-2*. Ambos perfis de expressão se assemelham com a característica curva em U. Em (C), diagrama de correlação entre a expressão de *Mdh-1* e *Mdh-2* (coeficiente de correlação de Spearman = 0,80 $p < 0,0001$). L1 a S3: sucessivas fases larvais; PP1 a PP3: fases de pré-pupa; Pw a Pbd: sucessivas fases de pupa; RN: adulto recém emergido.

Tabela 3 – Comparação par-a-par dos níveis de expressão dos genes *Mdh-1* (diagonal inferior) e *Mdh-2* (diagonal superior) pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Student-Newman-Keul nas diferentes fases do desenvolvimento ontogenético de *Apis mellifera*. Diferenças significativas são representadas por um asterisco na cor vermelha (*).

		<i>Mdh-2</i>																									
		Ovo	L1	L2	L3	L4	L5F1	L5F2	L5F3	L5S1	L5S2	L5S3	PP1	PP2	PP3	Pw	Pp	Pdp	Pb	Pbl	Pbm	Pbd	RN				
<i>Mdh-1</i>	Ovo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	L1	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	L2	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	L3	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	L4	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	L5F1	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	L5F2	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	L5F3	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L5S1	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L5S2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L5S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PP2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PP3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pw	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pdp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-
	Pb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-
	Pbl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-
	Pbm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-
	Pbd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-
	RN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-

5.5 Discussão

Os resultados demonstram que a MDH apresenta variação na expressão durante o desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera*. A MDHm apresenta variação quantitativa na expressão e a MDHc apresenta variação tanto quantitativa quanto em relação ao surgimento e desaparecimento tecido-específico de novas isoformas durante o desenvolvimento.

A análise eletroforética permitiu estabelecer que ovos recém-postos apresentam o padrão característico do alelo materno, enquanto a expressão do alelo paterno só é detectada em torno de 48 horas após o ovo ser ovipositado e o padrão característico do heterozigoto se observa em ovos de 60 horas de idade.

Ovos de 2 - 4 horas de idade evidenciaram em análise eletroforética dois componentes de atividade de MDHc: o primeiro, correspondente ao homodímero produzido pelo alelo materno; o segundo componente, de menor intensidade, apresentava mobilidade eletroforética correspondente ao homodímero produzido pelo alelo paterno. A presença deste segundo componente indica que, logo após a postura do ovo, o pronúcleo do zangão parece apresentar atividade inicial de síntese.

O gene *Mdh-2* possui expressão mais elevada do que o *Mdh-1*, o que pode ser deduzido pelo número de ciclos de amplificação necessários para se realizar a semiquantificação. Entretanto, os perfis são significativamente correlacionados. A alta correlação das curvas sugere alguma forma de regulação coordenada dos dois genes cujos produtos participam do *shuttle* da malato-aspartato (SETOYAMA *et al.*, 1988) ou apenas uma resposta comum à diminuição da atividade metabólica.

Os perfis de expressão de ambos os genes *Mdh-1* e *Mdh-2* apresentam a característica forma de U, com alta expressão nas fases iniciais/intermediárias de larva e nas fases finais de pupa até o recém-emergido. Este padrão é comum para muitas enzimas no desenvolvimento de *Drosophila* (FOX, 1971), e também foi verificado para a expressão de dois genes de esterases de *A. mellifera*, *Est-1* e *Est-3* (Apêndice B). A curva em U é característica das taxas metabólicas observadas por calorimetria durante o desenvolvimento ontogenético de muitos insetos (SCHMOLZ; LAMPRECHT, 2000), incluindo *A. mellifera* (SCHMOLZ *et al.*, 2005). A quantificação da atividade enzimática da MDH também demonstra uma redução durante as fases finais do estágio larval e fases iniciais do estágio pupal, e é consistente com os

resultados de Tripathi & Dixon (1969), que verificaram um pico de atividade a 60 – 72 horas de vida larval.

O mesmo padrão também é observado para a enzima málica (E.C. 1.1.1.40) de *Drosophila melanogaster* (CHERNIK *et al.*, 1982), a qual apresenta regulação da expressão por hormônio juvenil e ecdisteróides (FARKAS; KNOPP, 1997). Os perfis de expressão gênica observados em *A. mellifera*, porém, não apresentam relação aparente com os níveis de hormônio juvenil e ecdisteróides durante o desenvolvimento (Anexo A), indicando que a expressão quantitativa desses genes não é diretamente modulada pelos principais reguladores da metamorfose nos insetos.

A redução na expressão dos dois genes pode estar relacionada com o decréscimo no consumo energético nesse período. O metabolismo de ácidos graxos para obtenção de energia durante a transição de larva a pupa e nas fases iniciais do estágio pupal também pode explicar a redução na expressão dos genes *Mdh-1* e *Mdh-2* e da atividade enzimática. Os lipídios são uma das principais fontes de energia no estágio pupal (NESTEL *et al.*, 2003). O metabolismo de ácidos graxos com atividade da carnitina aciltransferase permite que equivalentes redutores sejam liberados diretamente na matriz mitocondrial, não necessitando, conseqüentemente, do transporte de NADH do citoplasma para a mitocôndria por meio do *shuttle* da malato-aspartato.

Uma pequena discrepância é observada quando comparamos os perfis da expressão dos genes com a quantificação da atividade enzimática. O processo de pigmentação da pupa marca um novo aumento da expressão dos genes *Mdh-1* e *Mdh-2*; entretanto, a atividade da MDH permanece no mesmo baixo nível das fases anteriores do estágio pupal. Isso pode representar a transcrição de mRNAs que não estão sendo imediatamente traduzidos. O aumento na expressão dos genes pode ser uma preparação para a emergência do adulto, que levará a um aumento considerável do consumo energético. Scholz *et al.* (1998) relataram uma discrepância similar entre níveis de mRNA e da proteína da MDHm durante o desenvolvimento cardíaco de suínos, e sugeriram que mecanismos de regulação pós-transcricional poderiam estar envolvidos.

Como relatado por Contel *et al.* (1977), observamos nas análises eletroforéticas o surgimento de novas regiões de atividade da MDHc durante o estágio pupal do desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera*. A análise

eletroforética da MDHc nos diferentes órgãos de pupas de *A. mellifera* revelou que o padrão observado nos indivíduos só é encontrado na hemolinfa e no corpo gorduroso, enquanto outros órgãos apresentam o padrão observado em larvas e adultos. Uma interpretação deste resultado pode ser que a isozima originalmente formada sofre alguma alteração estrutural pela ação de algum fator, enzimático ou não, possivelmente sintetizado no corpo gorduroso e, em seguida lançado na hemolinfa. Uma explicação alternativa seria de que no corpo gorduroso ocorre processamento diferencial do mRNA de *Mdh-1* durante o estágio de pupa, resultando na síntese de polipeptídeos que poderão formar dímeros com mobilidade eletroforética distinta.

O controle da postura da rainha possibilitou determinar que o aparecimento dessas regiões de atividade se dá ao final do estágio larval, inicialmente sendo detectado em larvas de 6 dias (L5S3) e 48 horas após apresentando o padrão observado em pupas. O surgimento dessas novas regiões de atividade ocorre durante um período do desenvolvimento em que tanto a expressão gênica quanto a atividade está em declínio. Em contraste, o desaparecimento destas regiões se inicia com o início do processo de pigmentação do corpo da pupa, quando a expressão gênica volta a aumentar. O aparecimento destas bandas parece estar relacionado com eventos específicos do desenvolvimento ontogenético, como indicam os experimentos realizados por Del Lama (1982) para verificar o padrão eletroforético da MDHc em pupas com o desenvolvimento alterado pela temperatura e por hormônio juvenil. Embora o perfil de expressão quantitativo do gene *Mdh-1* em *A. mellifera* não apresente relação com os títulos de hormônio juvenil durante o desenvolvimento, Silva & Bitondi (2002) relatam que a expressão das isoformas específicas do estágio pupal de *A. mellifera* (denominada MDHp pelos autores) é dependente de alto título de ecdisteróides (20-hidroxicdisona).

A variação na expressão da MDHc e da MDHm não está diretamente associada com a concentração dos hormônios de metamorfose, e seguem a variação na taxa metabólica durante o desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera*, apresentando um significativo declínio durante a transição do estágio larval para o estágio pupal. Neste período de declínio, novas isoformas da MDHc são detectadas, mas a causa e o significado funcional desta alteração ainda permanecem a serem investigados.

5.6 Referências Bibliográficas

- AVISE, J.C.; MCDONALD, J.F. Enzyme changes during development of holo- and hemi-metabolic insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 53, n. 3, p. 393–397, 1976.
- CHERNIK, Y.I.; KORYTKO, O.R.; BELOKON, E.M. Age changes of alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Ontogenez*, v. 13, p. 409–516, 1982.
- CONTEL, E.P.B.; MESTRINER, M.A.; MARTINS, E. Genetic control and developmental expression of malate dehydrogenase in *Apis mellifera*. *Biochemical Genetics*, v. 15, p. 859–875, 1977.
- DEL LAMA, M.A. *Estudos genéticos e bioquímicos das isoenzimas de malato desidrogenase de Apis mellifera*. 1982. 104 f. Tese (Doutorado em Genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 1982.
- DOWNER, R.G.H. Physiological and environmental considerations in insect bioenergetics. In: Downer, R.G.H. (Ed.). *Energy metabolism in insects*. Nova Iorque: Plenum, 1981. p. 1–17.
- DOWNER, R.G.H.; MATTHEWS, J.R. Patterns of lipid distribution and utilization in insects. *American Zoologist*, v. 16, p. 733–745, 1976.
- DUTRA, B.K. *et al.* Intermediate metabolism during the ontogenetic development of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 147, p. 594–599, 2007.
- FARKAS, R.; KNOPP, J. Ecdysone-Modulated Response of *Drosophila* Cytosolic Malate Dehydrogenase to Juvenile Hormone. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 35, p. 71–83, 1997.
- FOX, D.J. The soluble citric acid cycle enzymes of *Drosophila melanogaster*. I. Genetics and ontogeny of NADP-linked isocitrate dehydrogenase. *Biochemical Genetics*, v. 5, n. 1, p. 69–80, 1971.
- HARTFELDER, K.; ENGELS, W. Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 40, p. 45–77, 1998.
- HEMING, B.S. *Insect development and evolution*. Ithaca(NY): Comstock Publishing Associates, 2003. 560 p.
- LAUFER, H. Forms of enzymes in insect development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 94, p. 825–835, 1961.

MICHELETTE, E.R.F.; SOARES, A.E.E. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, v. 24, p. 431–440, 1993.

NARANG, S.; NARANG, N. Malate dehydrogenase of a mosquito, *Culex p. quinquefasciatus*: Developmental changes, polymorphism, and physicochemical characterization. *Biochemical Genetics*, v. 13, n. 1-2, p. 73–84, 1975.

NESTEL, D. *et al.* Lipid, carbohydrate and proteins patterns during metamorphosis of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Physiology, biochemistry and toxicology. Annals of the Entomological Society of America*, v. 96, p. 237–244, 2003.

RACHINSKY, A. *et al.* Caste and metamorphosis haemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *General and Comparative Endocrinology*, v. 79, p. 31–38, 1990.

SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. Calorimetric investigations on activity states and development of holometabolous insects. *Thermochimica Acta*, v. 349, p. 61–68, 2000.

SCHMOLZ, E.; KÖSECE, F.; LAMPRECHT, I. Energetics of honeybee development. Isoperibol and combustion calorimetric investigations. *Thermochimica Acta*, v. 437, p. 39–47, 2005.

SCHOLZ, T.D. *et al.* Ontogeny of malate-aspartate shuttle capacity and gene expression in cardiac mitochondria. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 274, p. 780–788, 1998.

SETOYAMA, C. *et al.* Structural organization of the mouse cytosolic malate dehydrogenase gene: comparison with that of the mouse mitochondrial malate dehydrogenase gene. *Journal of Molecular Biology*, v. 202, p. 355–364, 1988.

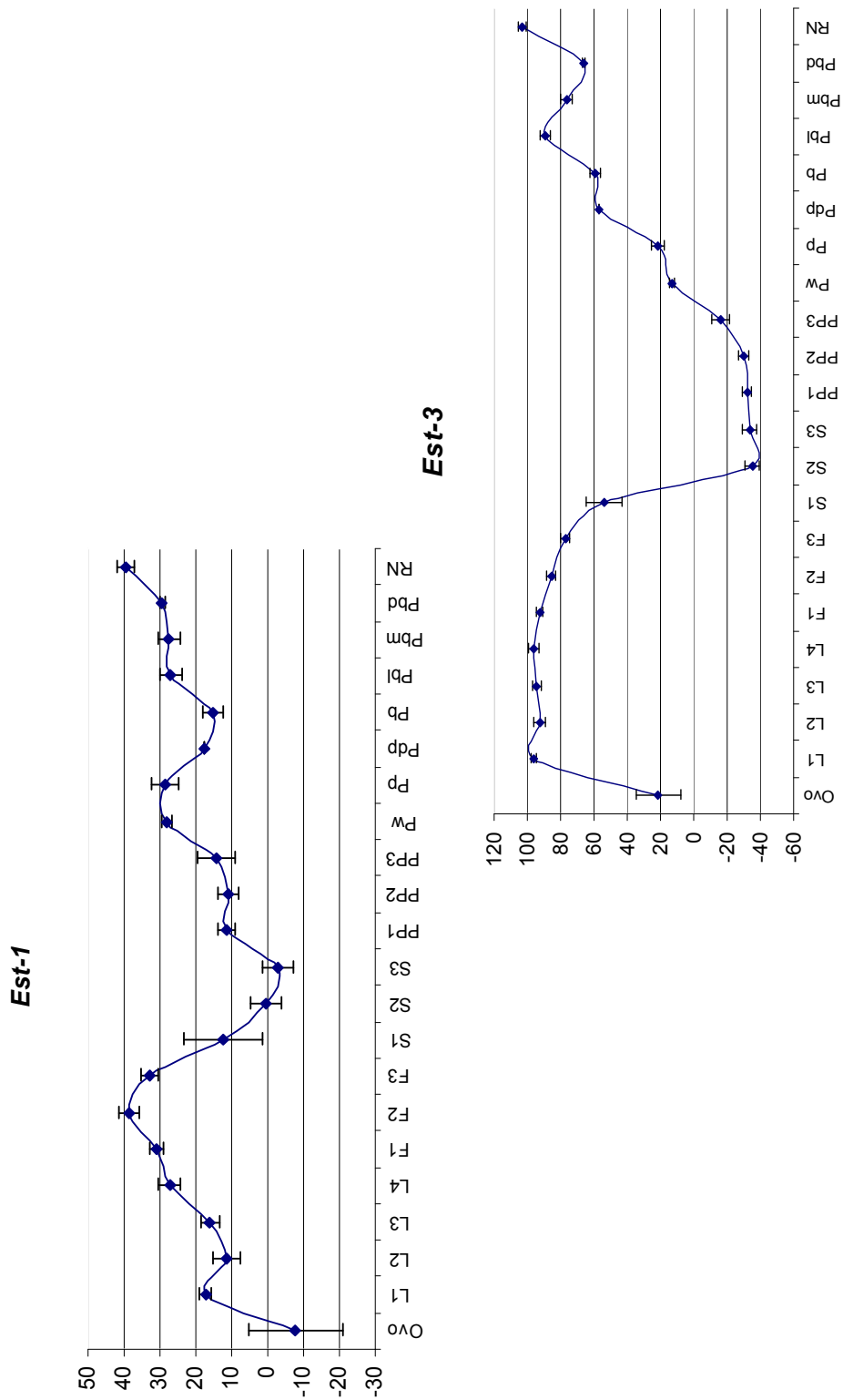
SILVA, E.J.; BITONDI, M.M.G. Regulação hormonal da malato desidrogenase de abelhas operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 5., 2002, Ribeirão Preto. *Anais do V Encontro sobre abelhas*. Ribeirão Preto: Gráfica e Editora São Francisco, 2002. p. 243-243.

TRIPATHI, R.K.; DIXON, S.E. Changes in some haemolymph dehydrogenase isozymes of the female honeybee, *Apis mellifera* L., during caste development. *Canadian Journal of Zoology*, v. 47, n. 5, p. 763–770, 1969.

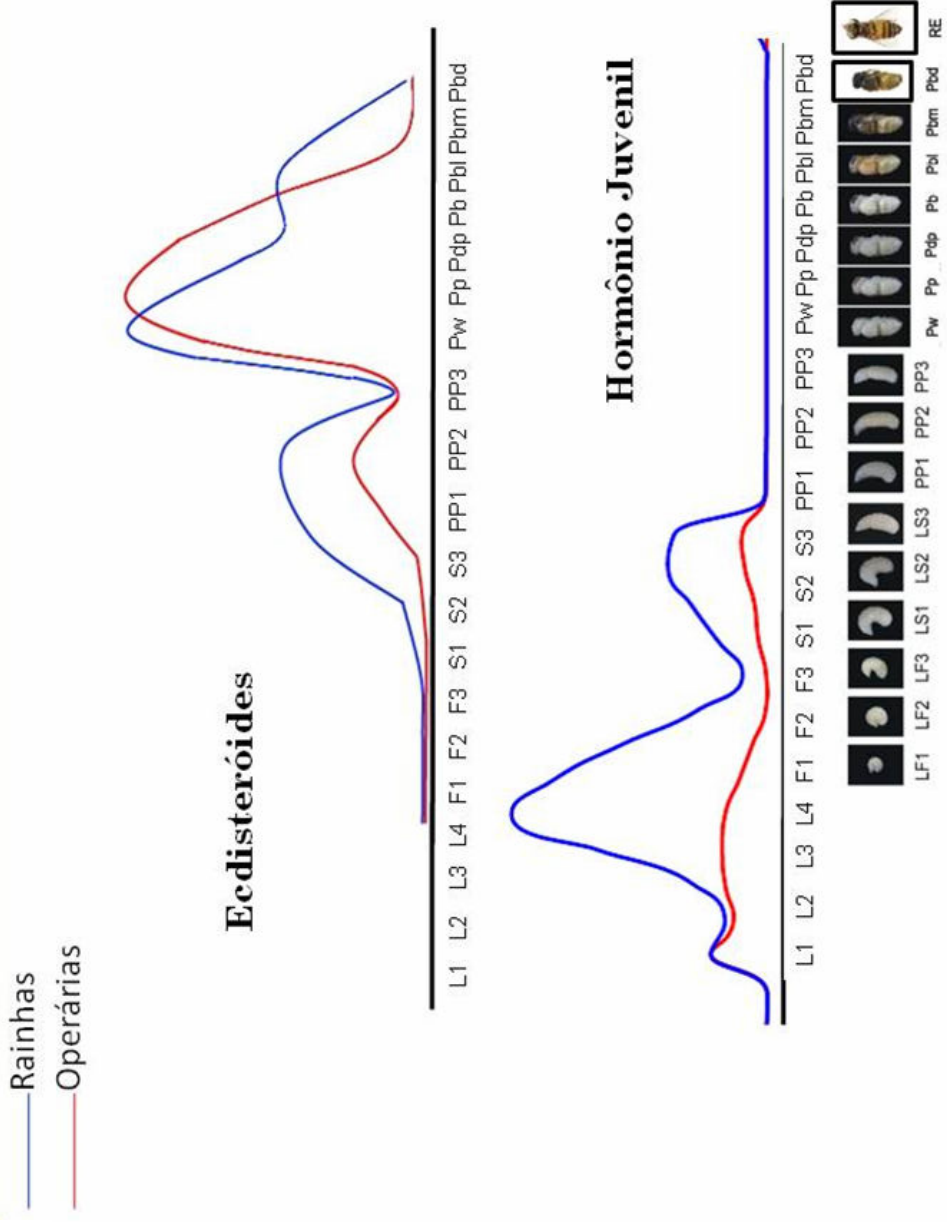
APÊNDICE A – Média normalizada da densitometria óptica das triplicatas técnicas e biológicas de cada fase do desenvolvimento da semi-quantificação por RT-PCR da expressão dos genes *Mdh-1* e *Mdh-2* de *A. mellifera*, com respectivo desvio-padrão (DP) e erro-padrão (Erro).

<i>Mdh-1</i>				<i>Mdh-2</i>			
	Média	DP	Erro		Média	DP	Erro
Ovo	6.42	22.55	13.02	Ovo	-2.59	17.33	10.01
L1	27.78	17.31	9.99	L1	51.30	22.71	13.11
L2	39.03	8.97	5.18	L2	67.28	8.65	4.99
L3	34.23	13.17	7.60	L3	64.80	10.03	5.79
L4	50.79	2.27	1.31	L4	77.45	3.41	1.97
F1	56.18	7.28	4.20	F1	68.43	19.80	11.43
F2	64.20	3.51	2.02	F2	73.72	12.43	7.18
F3	54.68	8.00	4.62	F3	40.35	10.64	6.14
S1	47.45	18.20	10.51	S1	21.53	28.44	16.42
S2	22.31	20.89	12.06	S2	-0.60	20.62	11.90
S3	25.40	11.44	6.61	S3	6.36	23.80	13.74
PP1	25.58	6.57	3.79	PP1	10.62	9.76	5.63
PP2	18.09	6.14	3.55	PP2	10.06	12.01	6.94
PP3	13.75	13.78	7.96	PP3	-6.60	8.23	4.75
Pw	36.83	3.27	1.89	Pw	9.25	9.01	5.20
Pp	33.85	3.99	2.30	Pp	29.28	17.61	10.17
Pdp	34.77	5.77	3.33	Pdp	24.66	7.83	4.52
Pb	35.39	1.96	1.13	Pb	31.42	9.29	5.37
Pbl	46.22	11.55	6.67	Pbl	59.08	4.95	2.86
Pbm	41.58	2.29	1.32	Pbm	86.75	4.70	2.72
Pbd	47.89	12.86	7.42	Pbd	115.92	14.98	8.65
RN	75.67	3.70	2.14	RN	113.29	2.59	1.50

APÊNDICE B – Perfil de expressão no desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera* de dois genes de esterase, *Est-1* e *Est-3*, obtidos por semiquantificação por RT-PCR (normalizados com o gene *RP49*).



ANEXO A – Curva de titulação do hormônio juvenil e de ecdisterona durante o desenvolvimento de *A. mellifera*. Baseado em Rachinsky *et al.* (1990) e Hartfelder & Engels (1998). Fornecido pelo LBDA-USP.



Capítulo 3

6. Análise de *splicing* alternativo e estudos bioquímicos da malato desidrogenase citoplasmática de *A. mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Keize Nagamati Junior ¹, Zilá Luz Paulino Simões ², Moacyr Antonio Mestriner³ e
Marco Antonio Del Lama¹

¹ Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros

Departamento de Genética e Evolução

Universidade Federal de São Carlos

São Carlos – SP – Brasil

² Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas

Departamento de Biologia

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Ribeirão Preto – SP – Brasil

³ Departamento de Genética

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Ribeirão Preto – SP – Brasil

6.1 Resumo

A observação de padrões eletroforéticos mais complexos da malato desidrogenase citoplasmática em corpo gorduroso de pupas de *A. mellifera* do que o observado em larvas e adultos sugere que isoformas adicionais são produzidas por causas genéticas ou epigenéticas durante o desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera*. Nossos resultados aqui apresentados demonstram que este fenômeno ocorre em outros grupos de abelhas, provavelmente sendo generalizado entre os corbiculados. A clonagem do cDNA do gene *Mdh-1*, codificante da cMDH e ensaios bioquímicos indicam que as isoformas adicionais de MDHc possuem peso molecular similar ao das isoformas originais e não são causadas por diferentes graus de polimerização, proteólise significativa, glicosilação, fosforilação, expressão de um novo gene ou *splicing* alternativo.

Palavras-chave: clonagem, *Mdh-1*, modificações pós-traducionais, padrão alozímico, processamento diferencial

6.2 Introdução

Os insetos holometábolos passam por complexas alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais durante o seu desenvolvimento que compreende três fases com hábitos bastante diferentes (HEMING, 2003). A taxa metabólica da maioria dos insetos apresenta a característica curva em formato de U, indicando um alto consumo energético nas fases iniciais de larva, uma diminuição durante a fase de pupa, e novamente um aumento nas fases finais do processo de metamorfose (SCHMOLZ; LAMPRECHT, 2000). Da mesma forma, muitas enzimas também apresentam variação na expressão durante o desenvolvimento dos insetos, tanto relacionada à atividade quanto ao surgimento ou desaparecimento de isoformas (FOX, 1971; AVISE; MCDONALD, 1976).

Na abelha *Apis mellifera*, uma das enzimas a apresentar variação tanto quanto à atividade como quanto ao surgimento de isoformas ao longo do desenvolvimento é a malato desidrogenase citoplasmática (MDHc) – enzima que catalisa a conversão reversível de L-malato a oxaloacetato utilizando NAD⁺ como cofator e atua no *shuttle* da malato-aspartato para intercâmbio de moléculas entre o citoplasma e a mitocôndria.

A quantificação da expressão do mRNA e da atividade enzimática no desenvolvimento de *A. mellifera* demonstram que a enzima segue basicamente o padrão de curva em U, com alta expressão e atividade no estágio larval e no final do estágio pupal até a emergência do indivíduo, e baixa expressão durante a transição de larva a pupa e nas fases iniciais do período pupal (Capítulo 2).

A análise eletroforética em gel de amido revelou que larvas e adultos apresentam padrão alozímico idêntico, enquanto o padrão de pupas é mais complexo, já que isoformas restritas ao estágio pupal são observadas (CONTEL *et al.*, 1977). Os autores sugeriram que estas novas isoformas poderiam ser o produto da expressão de um novo gene ou de uma modificação epigenética das isozimas.

As modificações pós-traducionais constituem um importante mecanismo de modulação da atividade protéica em eucariontes, compreendendo mais de 300 processos (WITZE *et al.*, 2007) e promovendo, entre outros processos, a ativação ou desativação de enzimas, a sinalização intracelular, a regulação de interações moleculares ou a estabilidade da proteína (MANN; JENSEN, 2003). A regulação transcricional também é importante na modulação da expressão, consistindo na

indução/repressão da transcrição de genes (e.g. vitelogenina, BARCHUK *et al.*, 2002) ou no processamento diferencial dos mRNAs (i.e. *splicing* alternativo; e.g. *doublesex*, CHO *et al.*, 2007).

Utilizando técnicas moleculares atuais e a estrutura do gene da MDHc de *A. mellifera* que relatamos anteriormente (Capítulo 1), investigamos as possíveis causas do surgimento das isoformas específicas do estágio pupal no padrão alozímico de *A. mellifera*. Neste estudo relatamos o surgimento dessas isoformas em outras espécies de abelhas e vespas e analisamos a ocorrência de *splicing* alternativo no gene *Mdh-1* e de possíveis modificações pós-traducionais na enzima MDHc em pupas de *A. mellifera*.

6.3 Material e Métodos

6.3.1 Amostras

Foram utilizadas abelhas africanizadas de *A. mellifera* (AHB) de colônias mantidas no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. As fases do desenvolvimento foram identificadas seguindo os critérios estabelecidos por Michelette & Soares (1993).

Foram utilizados larvas, pupas e adultos para análise do padrão eletroforético do sistema MDH no desenvolvimento das espécies *Nannotrigona testaceicornis*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Scaptotrigona tubiba*, *Frieseomelitta varia*, *Schwarziana quadripunctata*, *Friesella schrottkyi*, *Leurotrigona muelleri*, *Bombus atratus*, *Pseudaugochloropsis graminea*, *Xylocopa* sp., *Centris* sp., *Lithurgus corumbae*, *Stelopolybia multipicta*, *Polybia paulista*, *Polybia* sp1, *Polybia* sp2, *Protopolybia pumila* e *Polistes versicolor* (procedência e número de amostras analisadas apresentadas no Apêndice A).

6.3.2 Análise alozímica

Análises eletroforéticas realizadas conforme descrito no Capítulo 1.

6.3.3 Amostras para ensaios enzimáticos

Extratos de larvas, pupas ou adultos de *A. mellifera* foram obtidos homogeneizando-se estas amostras em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 + 1 mM DL-DTT (ditiotreitól) em homogeneizador Potter, a 1000 rpm, com 10 excursões, em banho de gelo. Em seguida, o macerado era filtrado em lã de vidro. A solução resultante era recentrifugada por 1 hora a 29000 g a 0° C, o precipitado descartado e o sobrenadante resultante filtrado em lã de vidro.

6.3.4 Determinação do peso molecular

Amostras preparadas conforme o item (6.3.3) foram levadas a 40 % de saturação pela adição vagarosa de sulfato de amônio sólido. O pH da solução foi mantido em 7,5 com a utilização de solução de amônia 0,5 N. A solução permaneceu em agitação por 2 horas e o precipitado foi removido e eliminado pela centrifugação a 29000 g por 30 minutos a 0° C. O sobrenadante resultante foi levado a 80 % de saturação com sulfato de amônio. Após agitação por 2 horas, o precipitado obtido por centrifugação a 29000 g por 30 min a 0° C foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,5 contendo 1 mM DL-DTT.

Extratos obtidos foram aplicados à coluna de Sephadex G-100, calibrada para determinações de peso molecular segundo Andrews (1965), e as frações eluídas foram dosadas para atividade de MDH, seguindo-se a redução do NAD. Alíquotas dos tubos contendo alta atividade enzimática foram utilizadas como amostra para análise eletroforética em gel de amido.

As proteínas usadas como padrões foram soro-albumina bovina (2,8 mg), ovoalbumina (1,6 mg), inibidor de tripsina de soja (2,2 mg) e ribonuclease A (2,0 mg). Blue Dextran 2000 (4,0 mg) foi usado para determinar o volume de exclusão. O volume de eluição destas proteínas foi determinado pela absorbância em 280 nm.

6.3.5 Tratamento com neuraminidase

Extrato de pupas jovens, preparado conforme item 6.3.3, foi tratado com liofilizado de *Clostridium perfringens* de maneira que a atividade neuraminidásica no extrato fosse igual a 5 unidades de enzima / mL de extrato. A mistura foi incubada

por 5 horas a 37° C. O controle consistiu de extrato não tratado incubado a 37° C. Após o período de incubação, alíquotas destas amostras foram submetidas à análise eletroforética.

6.3.6 Tratamento com fosfatase

Extrato de volume final de 2 mL foi obtido a partir de macerado de 20 pupas de olho branco em tampão Tris-HCl pH 8,0 com mercaptoetanol 0,2% e centrifugado por três vezes a 6000 rpm por 15 minutos. Esse volume foi dividido em 14 alíquotas de 50 µL, com sete amostras sendo tratadas com 10 U de enzima fosfatase *Antarctica Phosphatase (New England Biolabs)* e sete amostras controle apenas com tampão da enzima. Em cada tratamento as amostras foram incubadas a 37°C por 0, 5, 10, 20, 30, 60 e 90 minutos. Após a incubação, as amostras foram submetidas à análise eletroforética.

6.3.7 Efeito de diálise

Extratos liofilizados foram ressuspensos na proporção de 20 mg/mL, em três tampões diferentes: tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, e tampão glicinato de sódio 0,1 M pH 9,5. Todos estes tampões continham 1 mM de 2-mercaptoetanol.

Os extratos preparados nos diferentes tampões foram dialisados por 24 horas contra 1 litro de tampão utilizado na preparação do extrato, com uma troca. Em seguida, foram centrifugados por 10 min a 15000 g a 0° C e submetidos à análise eletroforética.

6.3.8 Extração de RNA e Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de RNA extraído do corpo gorduroso de um pool (4 a 5) de Pw de operárias de uma colônia, seguindo procedimento relatado no Capítulo 1

6.3.9 Amplificação do cDNA de *Mdh-1*

Amplificamos os três fragmentos do gene *Mdh-1* – F5R6, F8R14 e F7R9 – utilizando primers e as condições apresentadas no Capítulo 1. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

6.3.10 Clonagem e seqüenciamento do cDNA

Os produtos de PCR foram subclonados no vetor *pGEM-T Easy* (Promega). Os plasmídeos foram extraídos e purificados utilizando o sistema *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification* (Promega) e seqüenciados em seqüenciador ABI 3100. Os eletroferogramas foram analisados no software *CodonCode Aligner* v3.1.

6.4 Resultados

6.4.1 Padrão eletroforético da MDHc no desenvolvimento ontogenético em diferentes espécies de abelhas e vespas

As análises eletroforéticas evidenciaram a ocorrência de isoformas adicionais da MDHc no estágio de pupa em *Nannotrigona testaceicornis*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Scaptotrigona tubiba*, *Frieseomelitta varia*, *Schwarziana quadripunctata*, *Friesella schrottkyi*, *Leurotrigona muelleri*, *Bombus atratus*, *Pseudaugochloropsis graminea*. As espécies *B. atratus* e *F. varia* também apresentaram polimorfismo genético.

O padrão eletroforético das larvas de *F. varia* é mais complexo do que o observado em *A. mellifera*. Em *P. graminea*, observamos o aparecimento de 3 ou 4 bandas adicionais de atividade na fase de pupa, além da região observada em larvas e adultos, conforme o sistema também utilizado.

Os resultados observados em *Xylocopa* sp., *Centris* sp. e *Lithurgus corumbae*, além das espécies de vespas *Stelopolybia multipicta*, *Polybia paulista*, *Polybia* sp1, *Polybia* sp2, *Protopolybia pumila* e *Polistes versicolor* sugerem que este fenômeno não ocorre nestas espécies.

6.4.2 Determinação do peso molecular da MDHc de *A. mellifera*

A determinação do peso molecular da MDHc em coluna de Sephadex G-100 indicou que as duas isoformas da enzima observadas em pupas de operárias apresentavam volume de eluição semelhante ao da soroalbumina bovina, permitindo estimar o peso molecular dos dímeros em, aproximadamente, 67 KDa (Figura 1). Como a isoforma adicional do estágio de pupa apresenta peso molecular similar ao da isoforma encontrada em larvas e adultos, podemos concluir que o aparecimento das novas regiões de atividade de MDHc não é devido a diferentes graus de polimerização da enzima, tampouco à proteólise de parte significativa do polipeptídeo precursor.

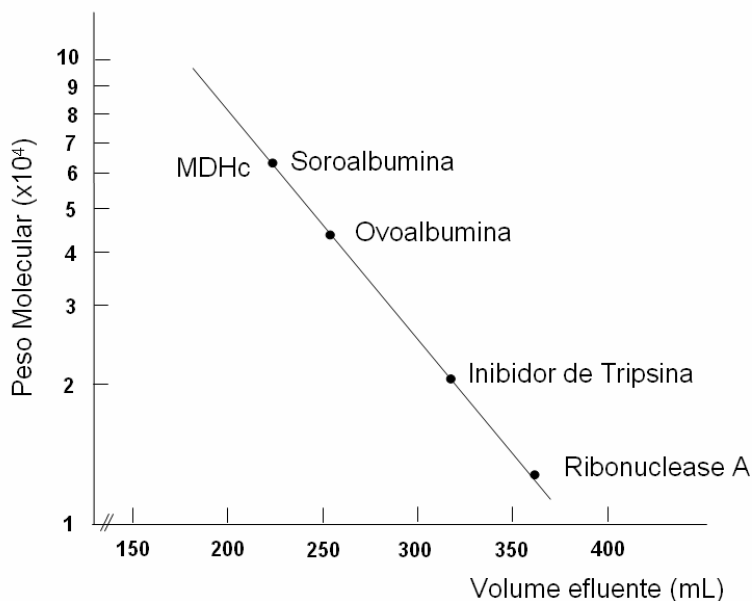


Figura 1 – Filtração em gel em Sephadex G-100 da MDHc de pupas de operárias de *Apis mellifera*. Volumes de eluição idênticos foram obtidos com a soroalbumina bovina e as duas formas da MDHc encontradas em pupas de *A. mellifera*.

6.4.3 Análise de *splicing* alternativo do gene *Mdh-1*

A visualização dos produtos de RT-PCR das três regiões do cDNA de *Mdh-1* não apresentou evidências da ocorrência de *splicing alternativo*, pois observamos

apenas uma banda de amplificação no gel de agarose após eletroforese (Apêndice B).

A análise das seqüências dos clones das três regiões também não evidenciou sinais da ocorrência de *splicing alternativo*. No entanto, observamos sítios polimórficos não relatados anteriormente (Figura 2). Os nove clones da região F5R6 apresentaram tamanho de 409 pb, e foram observadas três substituições sinônimas e uma não-sinônima num total de quatro haplótipos. Os dez clones da região F8R14 apresentaram tamanho de 434 pb, e foram observadas três substituições sinônimas e três não-sinônimas num total de seis haplótipos. Sete clones da região F7R9 apresentaram tamanho de 478 pb e um apresentou uma inserção; além dessa inserção foram observadas três substituições não-sinônimas num total de quatro haplótipos.

	E 2		E 3			E 4	E 5		
	444	482	533	939		1582	1712	1763	1782
F5	Asn AAT	Val GTT	Leu CTT	Val GTA	F7	Lys AAA	Asn AAT	Glu GAA	-
F5_A	G...	F7_A	G...	-
F5_BC	...C	...	F7_BG.	.G.	-
F5_CC	...	F7_CA	
	Asp →	Val →	Leu →	Val →		Glu →	Ser →	Gly →	

	E 3				E 4	
	911	960	1092	1135	1336	1353
F8	Glu GAA	Gly GGA	Arg AGA	Asn AAT	Asp GAT	Gly AAT
F8_A	.G.
F8_BG	..G
F8_C	G..
F8_D	A..	...
F8_E	A..	..C
	Gly →	Gly →	Arg →	Asp →	Asn →	Gly →

Figura 2 – Polimorfismos encontrados nas seqüências de cDNA de clones para as três regiões do gene *Mdh-1*. F5, F7 e F8 referem-se às regiões do gene amplificadas pelos pares de primers F5R6, F7R9 e F8R14, respectivamente. As seqüências utilizadas como referência das três regiões são idênticas ao alelo *Mdh-1*^{100a}.

6.4.4 Efeito de neuraminidase, diálise e fosfatase sobre o padrão eletroforético da MDHc de pupas de *A. mellifera*

O padrão também não se alterou quando extratos de pupas previamente liofilizados são preparados em diferentes tampões (acetato pH 5,0; fosfato pH 7,0; glicinato pH 9,5) e, em seguida, exaustivamente dialisados contra os mesmos.

A incubação de extratos de pupa com neuraminidase de *Clostridium perfringens* não alterou o padrão eletroforético da MDHc de *A. mellifera*. A incubação de extratos de pupas de operárias com fosfatase também não alterou o padrão eletroforético da MDHc de *A. mellifera* (Figura 3).

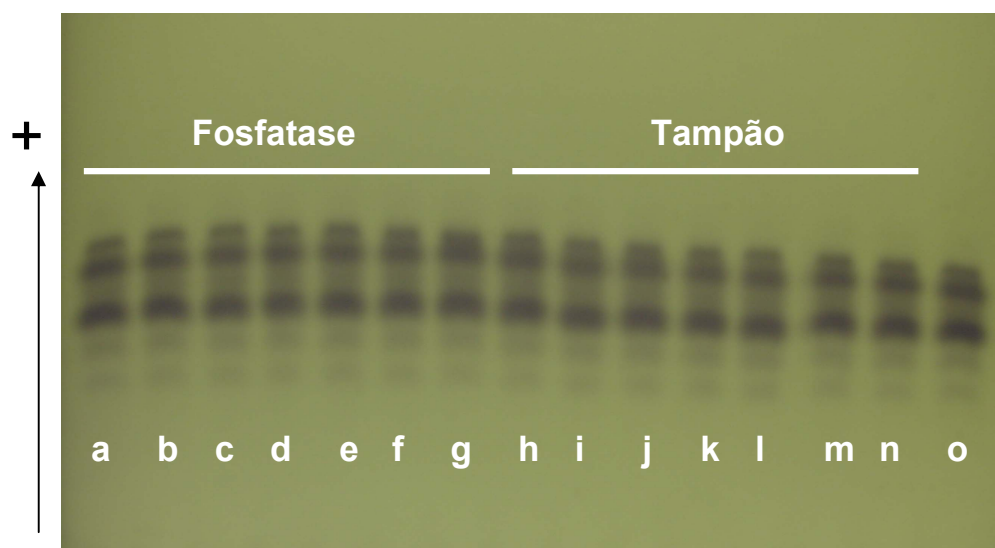


Figura 3 – Gel de amido 14% para visualização do padrão eletroforético inalterado da MDHc em amostras de pupas tratadas com 10U de enzima fosfatase (*Antarctica Phosphatase* – *New England Biolabs*) por 0 (a), 5 (b), 10 (c), 20 (d), 30 (e), 60 (f), 90 (g) minutos e amostras tratadas somente com tampão por 0 (h), 5 (i), 10 (j), 20 (k), 30 (l), 60 (m) e 90 (n) minutos. (o) amostra sem tratamento.

6.5 Discussão

A análise do padrão eletroforético da MDHc no desenvolvimento de outras espécies de abelhas indica que a ocorrência de regiões adicionais de atividade desta enzima não é comum a todas as espécies de abelhas, como não observamos

em abelhas das tribos Xylocopini, Centridini (família Apidae) e Lithurgini (família Megachilidae). A ocorrência de um padrão mais complexo em pupas de *P. graminea* (Halictidae: Augochlorini) pode indicar uma natureza distinta do aparecimento das isoformas adicionais em pupas de *A. mellifera*.

Entretanto, o fenômeno aparenta ser generalizado nas tribos Apini e Meliponini, e também pode ser comum às espécies da tribo Bombini. Embora espécies pertencentes à tribo Euglossini não tenham sido analisadas, os resultados sugerem que a ocorrência de novas regiões de atividade em pupas pode constituir um evento comum a todas as espécies do grupo dos corbiculados. Essa conclusão também é suportada pelos resultados de Contel (1975; 1980), que observou o mesmo fenômeno em todas as espécies analisadas de 10 gêneros da tribo Meliponini.

Embora não tenhamos observado nas seis espécies de vespas analisadas neste estudo, o fenômeno também ocorre em vespas esfecídeas (dados LGEH), provável grupo ancestral das abelhas. A ocorrência das isoformas adicionais não apresenta relação com a filogenia das abelhas. Portanto, caso elas sejam resultantes das mesmas causas, este achado pode ser interpretado como uma evidência de que o aparecimento de regiões extras na fase de pupa não deve ser devido à atividade de um novo gene neste estágio do desenvolvimento.

O peso molecular estimado (67 KDa) por filtração em gel de Sephadex G-100 confirma as estimativas apresentadas no Capítulo 1 com base na seqüência predita da proteína e os resultados de Snyder *et al.* (1979) que, através de eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo SDS-uréia, demonstraram que as subunidades de MDHc de larvas de *A. mellifera* apresentavam peso molecular de 34KDa. Os mesmos autores, utilizando filtração em gel de Sephadex G-150, verificaram que a enzima nativa apresentava peso molecular em torno de 70KDa, confirmando a estrutura dimérica da enzima (CONTEL *et al.*, 1977).

A indicação de que as duas isoformas da MDHc encontradas em pupas de *A. mellifera* possuem pesos moleculares similares demonstra que o aparecimento de regiões extras de atividade não deve ser devido à polimerização-despolimerização da molécula enzimática original, como uma das hipóteses sugeridas por Contel *et al.* (1977), nem à proteólise significativa do polipeptídeo original. Também sugere que a expressão de um novo gene codificante de um polipeptídeo que se ligaria aos

dímeros originais da MDHc não é responsável pelas novas regiões de atividade observados em pupa.

Os clones de cDNA não apresentaram variação no tamanho dos fragmentos nas três regiões do gene *Mdh-1* (com exceção de um clone que apresentou uma inserção, que discutiremos a seguir), indicando que um evento de *splicing* alternativo não ocorre no corpo gorduroso durante a fase de pupa de *A. mellifera*, tecido e fase do desenvolvimento no qual são observadas as isoformas adicionais da MDHc. Assim, o processamento diferencial do mRNA não deve ser a causa das novas isoformas da MDHc.

A clonagem do cDNA também revelou sítios polimórficos que ainda não haviam sido observados. Do total de 13 sítios polimórficos que observamos nos clones, apenas um na posição 1336 – que caracteriza o fenótipo M – já havia sido descrito (Capítulo 1). Também observamos a inserção de uma adenina – após uma seqüência de seis adeninas – em um dos clones da região F7R9. Na região F8R14, obtivemos seis haplótipos a partir de dez clones. Considerando-se que utilizamos cinco operárias de uma mesma colônia para a obtenção do cDNA, seria esperado, no máximo, a ocorrência de sete alelos. Embora a observação desse elevado número de haplótipos em uma única colônia e das várias substituições não conservativas possa indicar uma maior complexidade na diversidade alélica do loco *Mdh-1*, acreditamos que parte desses polimorfismos possam ser artefatos criados por erros resultantes da amplificação por PCR e clonagem direta dos produtos de PCR (ENNIS *et al.*, 1990; ECKERT; KUNKEL, 1991), fato que merece maiores investigações.

Com as evidências de que não há a expressão de um novo gene durante o desenvolvimento e de que não ocorre *splicing* alternativo do gene *Mdh-1*, o aparecimento das isoformas adicionais de MDHc deve ser atribuído à modificações pós-traducionais da enzima original. Estudos de interconversão enzimática realizados por Del Lama (1982), visando verificar se algum componente presente em extratos de pupas jovens poderia converter a isoforma da enzima presente em extratos de larvas nas isoformas adicionais não foram conclusivos.

Os resultados eletroforéticos que obtivemos quando extratos de pupas são submetidos a tratamento com neuraminidase sugerem que o aparecimento de novas regiões da MDHc não deve ser resultante de ligação de resíduos carboidratos carregados eletricamente (como o ácido siálico, por exemplo) à isozima original. O

aparecimento destas regiões parece não ser devido também a algum fator dialisável ou à fosforilação da enzima original, já que extratos submetidos à diálise exaustiva ou a tratamento com fosfatase não têm seu padrão eletroforético modificado.

Nossos resultados indicam que as isoformas adicionais de MDHc no desenvolvimento de *A. mellifera* não devem ser resultantes da expressão estágio e tecido específica de um novo gene e nem de um evento de *splicing* alternativo do gene *Mdh-1*. Embora apresentemos indícios que excluem a ocorrência de três dos principais eventos de modificação pós-traducional na MDHc de *A. mellifera*, a identificação da ocorrência de tais processos requer a caracterização completa da proteína utilizando uma combinação de técnicas para esse propósito específico (MANN; JENSEN, 2003; WITZE *et al.*, 2007), o que vai além do escopo deste trabalho.

6.6 Referências Bibliográficas

- ANDREWS, P. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochemical Journal*, v. 91, p. 222–232, 1965.
- AVISE, J.C.; MCDONALD, J.F. Enzyme changes during development of holo- and hemi-metabolic insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 53, n. 3, p. 393–397, 1976.
- BARCHUK, A.R.; BITONDI, M.M.G.; SIMÕES, Z.L.P. Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, v. 2, p. 1, 2002.
- CHO, S.; HUANG, Z.Y.; ZHANG, J. Sex-specific splicing of the honeybee *doublesex* gene reveals 300 million years of evolution at the bottom of the insect sex-determination pathway. *Genetics*, v. 177, p. 1733–1741, 2007.
- CONTEL, E.P.B. *Isoenzimas da malato desidrogenase (EC 1.1.1.37) em organismos haplo-diplóides*. 1975. 143 f. Tese (Doutorado em Genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 1975.
- CONTEL, E.P.B. *Variabilidade Proteica em Populações Naturais de Abelhas da Amazônia*. 1980. 120 f. Tese (Livre-Docência). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 1980.
- CONTEL, E.P.B.; MESTRINER, M.A.; MARTINS, E. Genetic control and developmental expression of malate dehydrogenase in *Apis mellifera*. *Biochemical Genetics*, v. 15, p. 859–875, 1977.
- DEL LAMA, M.A. *Estudos genéticos e bioquímicos das isoenzimas de malato desidrogenase de Apis mellifera*. 1982. 104 f. Tese (Doutorado em Genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 1982.
- ECKERT, K.A.; KUNKEL, T.A. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *Genome Research*, v. 1, p. 17-24, 1991.
- ENNIS, P.D. *et al.* Rapid cloning of HLA-A,B cDNA by using the polymerase chain reaction: Frequency and nature of errors produced in amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 87, p. 2833–2837, 1990.
- FOX, D.J. The soluble citric acid cycle enzymes of *Drosophila melanogaster*. I. Genetics and ontogeny of NADP-linked isocitrate dehydrogenase. *Biochemical Genetics*, v. 5, n. 1, p. 69–80, 1971.
- HEMING, B.S. *Insect development and evolution*. Ithaca(NY): Comstock Publishing Associates, 2003. 560 p.
- MANN, M.; JENSEN, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*, v. 21, n. 3, p. 255–261, 2003.

MICHELETTE, E.R.F.; SOARES, A.E.E. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, v. 24, p. 431–440, 1993.

SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. Calorimetric investigations on activity states and development of holometabolous insects. *Thermochimica Acta*, v. 349, p. 61–68, 2000.

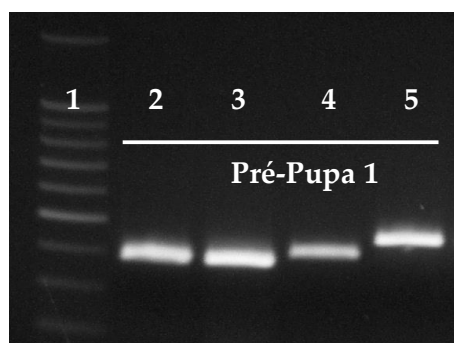
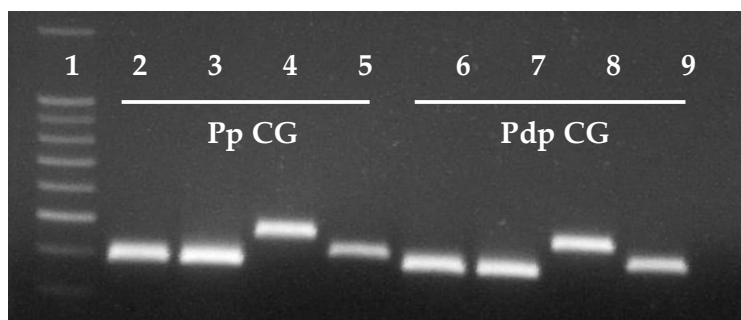
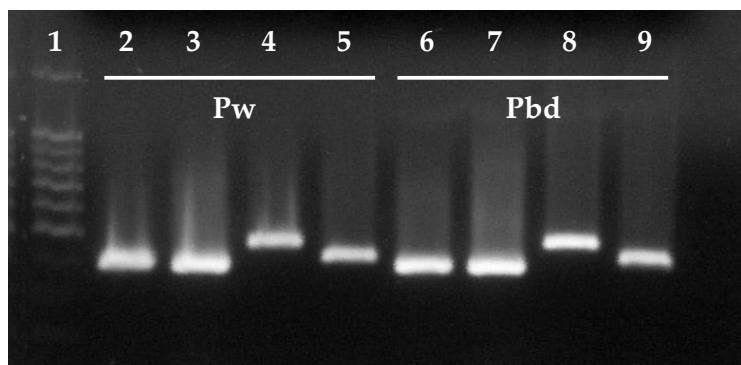
SNYDER, T.P.; CHAMBERS, G.K.; AYALA, F.J. Isolation of the cytoplasmic form of malate dehydrogenase from honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 88, p. 668–675, 1979.

WITZE, E.S. *et al.* Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nature Methods*, v. 4, n. 10, p. 798–806, 2007.

APÊNDICE A – Procedência e número de amostras analisadas em eletroforese em gel de amido para o sistema da malato desidrogenase NAD-dependente.

Espécie	Procedência	No. Ninhos Analisados	Número de Amostras Analisadas		
			Larvas	Pupas	Adultos
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	DG – FMRP	3		24	3
<i>Friesella schrottkyi</i>	DG – FMRP	1		10	5
<i>Leurotrigona muelleri</i>	DG – FMRP	1	5	9	2
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	Viçosa – MG	1		8	8
<i>Frieseomelitta varia</i>	DG – FMRP	3	12	47	29
	Brodosqui – SP	1	4	8	3
<i>Scaptotrigona</i> sp.	DG – FMRP	8	7	69	4
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	DG – FMRP	1	2	7	3
<i>Scaptotrigona tubiba</i>	DG – FMRP	1	2	7	3
<i>Bombus atratus</i>	DB – FFCLRP	1	4	4	2
	Viçosa – MG	1	4	6	5
<i>Xylocopa</i> sp.	DB – FFCLRP	1		4	
	Viçosa – MG	1		9	7
<i>Lithurgus corumbae</i>	DB – FFCLRP	1	2	4	
<i>Centris</i> sp.	DB – FFCLRP	1	1	3	
<i>Pseudaugochloropsis graminea</i>	Ribeirão Preto - SP	1	2	3	17
<i>Polistes versicolor</i>	Franca – SP	1	1	2	2
<i>Stelopolybia multipicta</i>	Ribeirão Preto - SP	1	4	8	1
<i>Protopolybia pumila</i>	Ribeirão Preto - SP	1	3	6	3
<i>Polybia paulista</i>	Ribeirão Preto - SP	1	4	6	4
<i>Polybia</i> sp1.	Ribeirão Preto - SP	1	3	4	4
<i>Polybia</i> sp2.	Ribeirão Preto - SP	1	2	2	3

APÊNDICE B – Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo para visualização de produtos de RT-PCR das regiões do gene *Mdh-1* em amostras de *Apis mellifera*. 1 – Ladder 100pb; 2 – F7+R9; 3 – F5+R6; 5 – F8+R14; 6 – F7+R9; 7 – F5+R6; 9 – F8+R14. 4 e 8 representam outras combinações de primers não utilizadas neste trabalho. Pw: Pupa de olho branco; Pbd: Pupa pigmentada; Pp CG: corpo gorduroso de pupa de olho rosa; Pdp CG: corpo gorduroso de pupa de olho rosa escuro.



*Conclusões e
Perspectivas*

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dados apresentados neste trabalho contribuem para maior compreensão da natureza e do significado funcional e evolutivo do polimorfismo alozímico do loco *Mdh-1* e do aparecimento de isoformas adicionais da MDHc durante o desenvolvimento de *A. mellifera*.

Nós identificamos o gene *Mdh-1* de *A. mellifera* e descrevemos os sítios polimórficos encontrados entre os três alelos comuns deste loco – *Mdh-1*¹⁰⁰, *Mdh-1*⁸⁰ e *Mdh-1*⁶⁵. Desta forma, pudemos determinar que a variação na mobilidade eletroforética é devido à substituição de um único aminoácido entre as alozimas F, M e S.

O conhecimento da seqüência nucleotídica do gene *Mdh-1* e dos aminoácidos da MDHc deve contribuir para futuros estudos da influência dos polimorfismos observados sobre a estrutura das alozimas, que associados com estudos bioquímicos, podem fornecer um melhor entendimento da atuação da seleção natural sobre os alelos deste loco.

Pela análise das seqüências dos alelos do loco *Mdh-1*, nós inferimos que o alelo *Mdh-1*¹⁰⁰, codificante da variante F, provavelmente deve ser o alelo ancestral que deu origem aos demais alelos. Uma análise da evolução molecular do gene *Mdh-1* nas subespécies de *A. mellifera* e nas espécies do gênero *Apis* poderia confirmar tais referências, além de demonstrar o padrão evolutivo de um gene sob pressão seletiva em diferentes ambientes.

A quantificação da expressão dos genes *Mdh-1* e *Mdh-2* e da atividade enzimática da MDH durante o desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera* demonstra o padrão clássico de alta expressão no início e final do desenvolvimento, com um decréscimo significativo durante a transição de larva a pupa. Discrepâncias entre a quantidade de mRNA e a atividade enzimática foram observadas em algumas fases do desenvolvimento, merecendo maiores estudos.

Com relação às isoformas adicionais da MDHc, determinamos que elas surgem a partir do final da fase larval e começam a desaparecer com o início da pigmentação das pupas, e que não são detectadas em outros tecidos senão a hemolinfa e o corpo gorduroso.

Nossos dados indicam que o aparecimento das isoformas adicionais de MDHc no desenvolvimento ontogenético ocorre em outros grupos de abelhas, e deve ser

um evento generalizado entre as espécies de corbiculados. Sob essa perspectiva, o estudo da evolução molecular do gene *Mdh-1* nos corbiculados, além de nos revelar a história evolutiva deste grupo inferida por um gene sob seleção, também poderia contribuir para os estudos das causas do aparecimento dessas isoformas adicionais.

O objetivo que deu origem a este projeto, investigar se as isoformas adicionais eram resultado de um evento de *splicing* alternativo do gene *Mdh-1*, foi alcançado com análises de RT-PCR e clonagem de cDNA. Os resultados indicam que as isoformas adicionais de MDHc não são resultantes de *splicing* alternativo e que, provavelmente, resultam de modificações secundárias da isoforma original. As causas desse fenômeno deverão ser esclarecidas com estudos utilizando técnicas voltadas para a identificação e mapeamento de modificações pós-traducionais.