

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

**DETECÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA
FORMIGA URBANA *Camponotus vittatus* (HYMENOPTERA, FORMICINAE)**

CYNARA DE MELO RODOVALHO

UBERLÂNDIA – MG

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**DETECÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA
FORMIGA URBANA *Camponotus vittatus* (HYMENOPTERA, FORMICINAE)**

CYNARA DE MELO RODOVALHO

Orientador: Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo

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

UBERLÂNDIA – MG

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

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

R695d Rodvalho, Cynara de Melo, 1981 -
Detecção de genes diferencialmente expressos na formiga urbana
Camponotus vittatus (Hymenoptera, Formicinae) / Cynara de Melo Ro-
dvalho. - Uberlândia, 2006.
42f. : il.
Orientador: Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Progra-
ma de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Formiga - Teses. 2. Formiga - Genética - Teses. I. Brandeburgo,
Malcon Antônio Manfredi. II. Universidade Federal de Uberlândia. Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 595.796

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

**DETECÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA
FORMIGA URBANA *Camponotus vittatus* (HYMENOPTERA, FORMICINAE)**

CYNARA DE MELO RODOVALHO

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo (Orientador)

Examinadores:

Dr. Odair Corrêa Bueno

Dra. Silvia das Graças Pompolo

Data da Defesa: 28 / 02 / 2006

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

Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo

*Aos meus tesouros: meus amados amigos
que mostraram tanto seu valor e brilho,
paciência e dedicação, amor e companheirismo,
sabedoria e paz durante esta jornada.*

*A todos eles, incluindo minha família,
dedico esta dissertação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida, enchendo-a de bênçãos, anjos e oportunidades, a cada dia. À minha Mãezinha do Céu, por sempre estar guiando o meu caminho e me livrando de todos os medos, anseios, dúvidas e de todo o mal.

Aos meus pais, por estarem sempre me apoiando e querendo o meu bem. Por me fazerem companhia, escutar, agüentar e não medirem esforços para me oferecer o melhor. Por sempre terem me proporcionado grandes oportunidades. Por serem exemplo de vida, de luta, de honestidade, felicidade, união, atitude, respeito, amizade e amor.

A minha querida irmã Maíra, por mesmo longe estar sempre ao meu lado, apoiando, conversando, fazendo farra, tocando violão, tendo paciência, ajudando no laboratório ou com as partes do computador.

À uma nova amiga conquistada, Luciana de Oliveira Almeida, que compartilhou comigo praticamente todos os momentos desse mestrado e entende melhor do que ninguém tudo o que passei. Sabe o valor e o sentimento presente em cada segundo, minuto ou hora de alegria, de dor, de desespero, de revolta, de quando as coisas deram certo e de quando deram errado, de frustração e de empolgação, de sono e cansaço, de coragem e ânimo, de vontade de desistir e gritar, de chorar e sorrir, de beber umas biritas, de jogar e festar, de dançar no laboratório, de realizar um experimento e aguardar torcendo os dedos e fazendo mandingas na espera de dar certo, de ter que sair correndo pra não perder uma compra de material, de fazer supecom e mandar um equipamento pro conserto, de voltar pro lab à noite, de ir embora de madrugada, de ir ao cinema enquanto espera a PCR, de dormir na casa do Fausto, de fazer planos pro futuro, de ... Passou tudo ali comigo, ensinou-me a fazer muitas coisas, desde géis a planos mirabolantes durante a madrugada; me mostrou como é ser uma pessoa de fé e de que como esse valor nunca pode ser abalado; me mostrou com simples atitudes a importância do caráter, da honestidade, da reflexão, da bondade, da ponderação e de muitos outros valores que não são vistos tão freqüentemente hoje em dia. Por tudo isso e por mais um trilhão de coisas que não se traduzem em palavras, muito obrigada!

A Ana Carolina Silva Siquieroli, ao Carlos Ueira Vieira e a Flávia Assumpção Santana, por terem sido muito mais que amigos. Foram orientadores, professores, companheiros e ajudantes, contribuindo com sabedoria, discernimento e muito conhecimento para esse trabalho. Estavam dispostos a ajudar e apoiar em qualquer momento necessário. Sem essas jóias, tal trabalho não teria chegado a esse ponto, com certeza!

Ao Fausto Emílio Capparelli por ser esse anjinho em minha vida. Por sua amizade e apoio para as horas difíceis, companhia e bom humor para as horas felizes, generosidade para me receber em sua casa, emprestando chuveiro, cama e cozinha durante os dias que tinha que trabalhar até tarde, por sua ajuda nas análises do seqüenciamento e bioinformática, enfim, por todo carinho, aprendizado e respeito doado, sou muito, muito grata.

Ao Marcus Teixeira Marcolino por ter me mostrado como é bom e maravilhoso trabalhar com formigas, por ter confiado, apoiado e me estimulado desde o primeiro dia que entrei no laboratório. Por estar sempre presente e disposto a ajudar mesmo morando longe agora. Por ajudar nas discussões, dúvidas, idéias e problemas. Por ser amigo, orientador, professor, companheiro. Obrigada, do fundo do coração!

Ao Waldesse Pirage de Oliveira Junior por estar sempre pronto e disposto, apoiando e ajudando na solução de eventuais problemas, mostrando-se um grande amigo que a distância nunca vai atrapalhar.

À Ana Paula Freschi, Andréia Capaneli, Camila Cologna, Cristina Soares de Sousa, Daniela Beraldo, Decivaldo Dias, Gabriel Costa Nunes da Cruz, Guilherme Rocha Sino de Souza, Hugo Cristiano, Humberto Gutierrez, Juliana Franco, Johara Boldrini, Leonardo Peixoto, Luciana Bueno, Paula Cristina, Renata Santos, Rogério de Freitas Lacerda, Rone Cardoso, Sílvia Ferreira e Vinícius Luis Duarte por todos os momentos de descontração, de aprendizado, de ajudas, de apoio, de refeições juntos, de brincadeiras, de reuniões, de empréstimos, de aulas... Não sei como agradecer todos vocês. Só espero que possa contar com vocês sempre, da mesma forma que vocês também podem sempre contar comigo.

Ao André de Souza Jorge, Antônio Daud Júnior, Cynthia Araújo Tinôco, Fernando Mattar Accetti, Leandro Teixeira de Moraes, Narcisa Silva Soares,

Paulo Emílio Alvarenga e Rodolfo Barbosa Mendes por serem essas jóias em minha vida. Vocês sabem da importância dessa amizade e de como são especiais pra mim.

À Alexandra Cardoso, Adriana Freitas Neves, Elisângela Rosa Cordeiro, Carlos Prudêncio por sempre estarem dispostos a ajudar quando precisei.

Aos amigos do laboratório Ana Lúcia Santos, Andréia Coutinho, Boscolli Barbosa Pereira, Cristiano Menezes, Gustavo Borges Pereira, Isabel Marques Rodrigues Amaral, Juliana Almeida Côbo, Luciana Londe, Marcela Silva, Milla Baffi, Patrícia Marteleto, Renato Pereira, Sérgio Lemos e Wellington Silva Gomes que sempre apoiaram, sofreram juntos, alegraram-se juntos, contribuíram com preparo de soluções, alguns experimentos, dicas, discussões... Foram muitos bons momentos vividos que certamente deixarão saudades!

Aos meus familiares que estavam sempre presentes, torcendo e sofrendo comigo durante toda esta etapa. Seu apoio foi fundamental.

Ao professor Luiz Ricardo Goulart por ter aberto seu laboratório para qualquer coisa necessária, tanto equipamentos quanto reagentes, e ter tido tanta paciência, esclarecendo dúvidas, explicando técnicas, buscando soluções para alguns problemas, indicando pessoas para ajudar... Foram muitas dicas valiosíssimas para a realização deste trabalho. Professor, muitíssimo obrigada!

À professora Ana Maria Bonnetti pelo fornecimento de tantos materiais, recursos financeiros e ajudas de bibliografia.

Ao Dr. Malcon Brandeburgo, por ter aceitado me orientar, contribuindo com experiência e conhecimentos importantes durante as discussões, ajuda na aquisição de vários materiais e apoio total para o desenvolvimento desta dissertação.

À Capes, pelo apoio financeiro durante todo o mestrado.

À UFU, pela estrutura e espaço físico, bem como pela provisão de todos materiais necessários.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	viii
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Figuras.....	xi
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
Introdução Geral.....	1
Referências Bibliográficas.....	9
Capítulo Único.....	15
Introdução.....	16
Material e Métodos.....	17
Material Biológico.....	17
Extração de RNA total.....	18
DDRT-PCR.....	18
Seqüenciamento.....	19
Análise das Seqüências.....	20
Resultados e Discussão.....	21
Referências Bibliográficas.....	28
Conclusões.....	32
Anexos.....	34
Anexo I.....	35
Anexo II.....	36
Anexo III.....	38
Anexo IV.....	39
Anexo V.....	40
Anexo VI.....	41
Anexo VII.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
A	Adenina
aa	Aminoácido
bp	Par de bases
C	Citosina
cDNA	DNA complementar
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	2'-deoxinucleosídeo 5'-trifosfato
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
g	Grama
G	Guanina
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	Nanogramas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
rDNA	DNA ribossômico
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
S	Soldados
Seg	Segundos

Sp	Espécie
T	Timina
TBE	Tampão tris-borato EDTA
U	Unidade
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
V	Volts

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO ÚNICO	Pág.
Tabela 1: Seqüência dos oligo-dT (HT11) e <i>primers</i> arbitrários (AP) utilizados nos experimentos de DDRT-PCR.	19

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO	Pág.
<p>Fig. 1: Ninho de <i>C. vittatus</i> mantido no laboratório. Pode-se observar a presença de larvas, pupa, operárias e soldados. (Foto: Cristiano Menezes)</p>	7
<h3>CAPÍTULO ÚNICO</h3>	
<p>Fig. 1: <i>C. vittatus</i>. A – Macho (alado) e operária. B – Rainha fisogástrica. C – Soldado. D – Pupa. (Foto: Cristiano Menezes)</p>	17
<p>Fig. 2: Extração de RNA total pelo método de Chomczynski e Sacchi (A) e pelo método do Trizol (B). R – rainhas virgens; M – machos; S – soldados; O – operárias.</p>	21
<p>Fig. 3: Gel de poliacrilamida 10%, não desnaturante, obtido pela combinação dos <i>primers</i> HT11G e AP03. 1 – banda casta específica de rainha. 2 – banda sexo específica. 3 – banda específica de um estágio de desenvolvimento (pupas) e diferencialmente expressa. 4 – banda casta específica de operária. BG – branco geral (sem RNA); B₋ – branco das amostras (sem RT-MMLV); R – rainhas virgens; M – machos; S – soldados; O – operárias; PM – pupas de macho; PS – pupas de soldado; PO – pupas de operária.</p>	22
<p>Fig. 4: Gel de agarose 1.5% mostrando a qualidade das 14 bandas submetidas ao seqüenciamento. N- bandas não seqüenciadas.</p>	22

- Fig. 5:** Seqüência do fragmento específico de operária de *C. vittatus* pela combinação dos *primers* HT11G e AP03. **25**
- Fig. 6:** BlastN da seqüência 4, mostrando a alta similaridade com chaperoninas de *Candidatus* Blochmannia. **25**

RESUMO

Insetos sociais despertam grande curiosidade, interesse e uma vontade de se compreender as bases moleculares da vida social. A identificação de genes diferencialmente expressos tem sido usada para o entendimento não só da função gênica, mas também dos mecanismos moleculares de diferentes processos biológicos. Nesse estudo, foram testados dois protocolos para extração de RNA total de *Camponotus vittatus* e a técnica de *Differential Display Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* (DDRT-PCR) foi utilizada para a identificação de genes diferencialmente expressos em casta, sexo e nos estágios de desenvolvimento dessa formiga. O método de extração de RNA baseado em Chomczynski e Sacchi (1987) demonstrou ser o mais eficaz. A técnica DDRT-PCR foi eficiente para a detecção de genes diferencialmente expressos de *C. vittatus*. Três *expressed sequence tags* (ESTs) foram seqüenciadas e análises por bioinformática não detectaram similaridade com seqüências depositadas em banco de dados, podendo ser novas e, talvez, específicas de *C. vittatus*. Essas seqüências foram depositadas no banco de dados dbEST. Um fragmento diferencialmente expresso em operária foi obtido com a combinação dos *primers*: HT11G e AP03. Os resultados do seqüenciamento e das análises por bioinformática revelaram que tal EST foi isolada da bactéria endossimbionte de *C. vittatus*, pois foi detectada a presença de um domínio *groL* e alta similaridade com diversas proteínas da família das chaperoninas, proteínas presentes nas bactérias endossimbiontes do gênero.

Palavras-chave: *Camponotus vittatus*, DDRT-PCR, Expressão gênica

ABSTRACT

Social insects inspire great curiosity, interest and a wish to know the social life molecular basis. Differentially expressed genes identification has been used with the objective to understand either the gene function and the molecular mechanisms of different biological processes. In this study, two protocols for the total RNA extraction from *Camponotus vittatus* were tested and the Differential Display Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR) technique was used with the aim to identify differentially expressed genes in caste, sex and development stages of this ant. The RNA extraction method, based in Chomczynski e Sacchi (1987), was the most efficacious. The DDRT-PCR technique was efficient for the detection of differentially expressed genes from *C. vittatus*. Three expressed sequence tags (ESTs) were sequenced and the analysis with bioinformatics tools failed in detect similarity with those sequences from data banks. These sequences may be new and, perhaps, specific of *C. vittatus*. They were deposited in dbEST database. A differentially expressed fragment, specific of works, was obtained with the primers HT11G and AP03. The results of its sequence and the analysis by bioinformatics revealed that this EST was, in fact, been isolated from the endosymbiotic bacteria of *C. vittatus* because a *groI* domain was detected and was observed high similarity with many proteins of the chaperonin family, a kind of protein present in the endosymbiotic bacterias of this genus.

Key words: *Camponotus vittatus*, DDRT-PCR, Gene expression

INTRODUÇÃO GERAL

As formigas pertencem à classe Insecta, ordem Hymenoptera, sendo agrupadas em uma só família, Formicidae. Estima-se que o número de gêneros possa ultrapassar 350 e o de espécies, 20.000 (Hölldobler e Wilson 1990, Bolton 1994, Brown-Jr 2000), das quais 11.844 já foram descritas (Agosti e Johnson 2005). No Brasil, estão catalogadas mais de 2.000 espécies (Bueno & Campos-Farinha 1998).

São insetos sociais, apresentando as três características que definem a eussocialidade: divisão de trabalho, com um sistema de castas envolvendo indivíduos estéreis assistindo aqueles que reproduzem; cooperação entre membros da colônia para o cuidado com a cria; e sobreposição de gerações capazes de contribuir para o funcionamento do ninho (Wilson 1971). Vivem em colônias, sendo que estas são formadas por indivíduos adultos e indivíduos em desenvolvimento, na forma de ovos, larvas e pupas. A maioria dos adultos constitui-se de fêmeas divididas em pelo menos duas castas: fêmeas férteis, as rainhas e fêmeas estéreis, as operárias (Bueno e Campos-Farinha 1998).

As fêmeas são diplóides e machos haplóides e a determinação da casta de fêmeas depende, em quase todos os casos, das condições ambientais de desenvolvimento (Wheeler 1986), principalmente relacionadas à dieta. Nesse sistema genético haplodiplóide, rainhas controlam o sexo de sua ninhada (Gullan e Craston 2005).

A rainha possui asas, que são perdidas após a cópula, e sua principal função é a reprodução. Todavia, em algumas formigas mais especializadas, a rainha cuida e alimenta sua primeira ninhada de operárias com secreções salivares. Pode viver por muitos anos e em algumas espécies é substituída por uma de suas rainhas filhas. A colônia pode abrigar uma (monogínica) ou mais (poligínica) rainhas (Koehler e Oi 2002).

Machos não formam castas, são infreqüentes e de vida curta (Gullan e Craston 2005). Após a maturidade, não permanecem na colônia por muito tempo. Possuem asas, retendo-as até a morte. Sua função consiste em acasalar com uma rainha para morrer logo depois. São produzidos em colônias velhas ou muito grandes, onde há abundância de comida (Koehler e Oi 2002).

Ao contrário das formas reprodutivas (sexuais), a casta de operárias não é alada e realiza todas as demais atividades da colônia: coleta água e alimento,

cuida da prole, alimenta os jovens e adultos da colônia, constrói, repara e defende o ninho. São muito variáveis em tamanho e aparência, podendo ser monomórficas, dimórficas ou polimórficas (Bueno e Campos-Farinha 1998, Koehler e Oi 2002).

Dois padrões gerais de divisão de trabalho são reconhecidos. Indivíduos de uma mesma casta (ou subcasta), normalmente apresentam uma diferenciação comportamental (polietismo), tanto por desempenharem funções distintas dependentes da idade (polietismo etário) ou por realizarem certas funções durante a vida, relacionadas com sua forma ou tamanho (polietismo morfológico) (Beshers e Fewell 2001). Apesar de serem geneticamente relacionados, membros de diferentes castas podem apresentar polifenismo, ou seja, polimorfismo ambiental (Gullan e Craston 2005).

Com relação ao desenvolvimento, é completo (holometábolo), com três estágios distintos (larva, pupa e adulto). Os ovos são quase microscópicos e originam larvas ápodas. Estas são alimentadas pelas operárias, o que pode acontecer de três formas: colocando o alimento próximo às larvas ou sob estas, em uma bolsa (*trophothylax* ou *praesaepium*) localizada na região ventral da larva ou regurgitando o conteúdo do papo na cavidade bucal da larva (Fowler et al. 1991, Koehler et al. 1997).

O desenvolvimento holometábolo permite que larva e adulto de um inseto especializem-se em recursos diferentes, contribuindo para o sucesso da radiação desse grupo (Gullan e Craston 2005). Segundo Fowler et al. (1991), as larvas de formigas necessitam de elementos nutricionais estruturais (proteínas, sais minerais e vitaminas), enquanto os adultos, por apresentarem alta atividade forrageira, suprem suas necessidades energéticas utilizando carboidratos e gorduras. As operárias filtram partículas sólidas de sua alimentação, ingerindo somente líquidos, ao passo que as larvas utilizam recursos tanto sólidos quanto líquidos. Segundo Hölldobler e Wilson (1990), a possibilidade de que larvas sirvam como uma casta especializada em digestão tem recebido apoio substancial de uma série de estudos com a subfamília Myrmicinae. No geral, o primeiro instar larval é alimentado por regurgitação, ovos tróficos ou ambos. A regurgitação de comida líquida continua por toda a vida da larva. Nos últimos instares, são alimentadas com pedaços de insetos ou sementes, dependendo dos

hábitos da espécie. As operárias cortam e mastigam o material antes de dá-lo às larvas.

Para Hölldobler e Wilson (1990), o sucesso ecológico das formigas por mais de 50 milhões de anos parece estar relacionado ao fato de terem sido um dos primeiros insetos predadores a explorar o solo e a vegetação da terra, desempenhando papel importante nos fluxos de energia e nutrientes, uma vez que constituem uma porção significativa da biomassa animal.

Como qualquer ambiente natural, os ambientes artificiais, inclusive os centros urbanos, podem ser colonizados e explorados por várias espécies de formigas. Muitas dessas espécies, que apresentam comportamento sinantrópico (encontram-se associadas ao homem e convivem em suas residências), tiveram sucesso em seus processos de dispersão e conseguiram distribuir-se por todo mundo através da atividade mercantil (Bueno e Campos-Farinha 1998). Essas formigas, chamadas de andarilhas (*tramp species*), conseguiram colonizar regiões em que as condições climáticas eram totalmente desfavoráveis sob o aspecto ecológico (Suarez et al. 2001). A maioria dessas espécies é exótica, devendo seu sucesso na colonização de tais ambientes de grande impacto antrópico (ambientes urbanos) a uma variedade de estratégias em sua adaptação ao novo habitat (Clark et al. 1982, Passera 1994).

Uma vez estabelecidas na área urbana, essas formigas podem causar grandes problemas ao se instalarem em fábricas de alimentos, padarias, restaurantes, escritórios, instituições de pesquisas, biotérios, zoológicos, museus, bibliotecas, centrais telefônicas, casas e hospitais pelo fato de nidificarem em instalações elétricas e danificarem estruturas, forragearem em áreas de risco, atuando como vetores mecânicos de microorganismos patogênicos e causando incômodo às pessoas (Fowler e Bueno 1998, Marcolino 1999, Bueno e Campos-Farinha 1999, Rodovalho et al. 2003).

As subfamílias de maior importância para o estudo de formigas urbanas são: Dolichoderinae, Myrmicinae e Formicinae (Hölldobler e Wilson 1990, Marcolino 1999, Bueno e Campos-Farinha 1999).

As formigas pertencentes à Formicinae são encontradas em qualquer lugar e, normalmente, em grande número. A maioria é *scavenger*, ou seja, alimenta-se de restos de animais ou frutos caídos, forrageando no solo ou vegetação, em

qualquer horário do dia ou da noite. São ativas, movem-se rapidamente e defendem a colônia vigorosamente, atacando intrusos com suas mandíbulas e *sprays* de ácido fórmico. Os ninhos são normalmente grandes, com centenas ou milhares de operárias (Shattuck e Barnet 2001).

A subfamília Formicinae é caracterizada pela presença de ácido fórmico, liberado como defesa e predomina nas regiões neoárticas e paleárticas. É muito bem representada na região Neotropical, por cerca de 400 espécies e entre as espécies urbanas, destacam-se *Paratrechina longicornis*, *Brachymyrmex* sp. e *Camponotus* sp. (Hölldobler e Wilson 1990, Bolton 1994, Caetano et al. 2002).

O gênero *Camponotus*, um dos maiores do mundo, é encontrado em uma grande variedade de habitats e possui cerca de 1500 espécies agrupadas em 46 subgêneros (Hedlund 2003). Somente na região Neotropical, estão descritas mais de 200 espécies de difícil identificação, principalmente, por serem polimórficas, de forma que a casta estéril é dividida em operárias e soldados (Hölldobler e Wilson 1990, Bueno e Campos-Farinha 1999, Caetano et al. 2002). Trabalhos recentes apontam o gênero *Camponotus* como um dos mais ricos em espécies dentro do Bioma Cerrado (Silva 2003).

Nesse gênero, as formigas são grandes, com adultos variando de 6 (operárias) a 12 mm (soldados) e mais de 18 mm para reprodutivos alados. Cada colônia possui uma rainha funcional e áptera com 20 mm de comprimento (Gold e Glenn 1999) que pode viver 10, 20 anos, fazendo dessas formigas um dos insetos mais longevos que se têm dados (Hölldobler e Wilson 1990).

Algumas espécies constroem seus ninhos no solo ou sob pedras (Hedlund 2003). Entretanto, são chamadas carpinteiras devido à sua preferência de nidificar em madeira podre ou em decomposição ou que possuam antigas galerias de térmitas, podendo construir seus ninhos em torno de residências ou mesmo dentro das mesmas. Todavia, o dano é limitado, pois essas formigas não se alimentam da madeira (Drees e Jackman 1999). Por esse motivo, e por forragearem em busca de água e alimento, adquiriram o status de praga, sendo excelentes indicadores de problemas estruturais em construções (Gold & Glenn 1999).

Camponotus são generalistas (onívoras), porém apresentam preferência por carboidratos e são freqüentes visitantes de nectários extraflorais (Longino

2002). Romero (2002) demonstrou que formigas *Camponotus* roubavam néctar de *Vochysia elliptica* (Vochysiaceae), mas exerciam um efeito protetor contra cupins. Os membros desse gênero possuem proventrículos desenvolvidos, uma adaptação morfológica para a retenção de alimento líquido em seu papo (Eisner e Wilson 1957). Forrageiras solitárias são capazes de carregar grandes quantidades de carboidratos para o ninho (Levieux e Louis 1975). Uma vez dentro deste, o fluido é regurgitado e transferido a outros indivíduos da colônia (Hölldobler e Wilson 1990).

Muitas das espécies de menor tamanho são forrageiras diurnas, com coloração escura ou preta, enquanto espécies maiores são normalmente de hábito noturno, com cores que vão do marrom avermelhado ao amarelo (Longino 2002).

O desenvolvimento do ovo para o estágio adulto leva, em média, dois meses. As larvas não possuem pernas e as pupas são de coloração creme a marrom, sendo muitas vezes chamadas erroneamente de ovos (Drees e Jackman 1999). A primeira geração de operárias é pequena e são chamadas nanicas. A colônia permanece com tamanho reduzido no primeiro ano, mas nos anos subsequentes a colônia cresce rapidamente, atingindo um máximo de 2000 a 3000 indivíduos. Isso acontece entre 3 e 6 anos, quando, então, as formas reprodutivas são produzidas. Ao atingir tal tamanho, raramente a colônia cresce, mas as operárias são produzidas continuamente para repor as mortas ou perdidas. Um ninho maduro produz de 200 a 400 indivíduos alados por ano, o que drena recursos e mantém os números baixos (Gold e Glenn 1999, Hölldobler e Wilson 1990).

A formiga *Camponotus vittatus* (Fig. 1) é predominante nos domicílios de Uberlândia-MG, não tendo sido registrada em outros levantamentos em áreas urbanas (Soares 2005). Trabalhos ao seu respeito são praticamente inexistentes.



Fig. 1 – Ninho de *C. vittatus* mantido no laboratório. Pode-se observar a presença de larvas, pupa, operárias e soldados. (Foto: Cristiano Menezes)

Os organismos superiores contêm milhares de genes diferentes, dos quais somente uma pequena fração é expressa em qualquer célula. Os processos da vida, como desenvolvimento e diferenciação, são determinados pela escolha de quais genes são expressos (Manniatis et al. 1987).

A investigação da expressão gênica nas últimas décadas levou ao desenvolvimento de técnicas capazes de identificar pequenas quantidades de mRNA ou proteínas que podem trazer novas informações relativas a processos biológicos, com objetivo de se identificar alvos farmacológicos, marcadores moleculares, dentre outros. A técnica de *differential display* (DD) está entre estas, sendo uma tecnologia que facilita a identificação de mRNA em células ou tecidos, identificando funções alteradas resultantes de diferenças na transcrição ou degradação do mRNA (Pardee e McClelland 1999), dependente do tipo celular e/ou células expostas a diferentes tratamentos ou condições fisiológicas.

Essa técnica consiste num processo de transcrição reversa acoplado a uma reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), cujos produtos são analisados em um gel (Liang e Pardee 1992). Tais reações geram fragmentos de cDNA que potencialmente correspondem às espécies de mRNAs diferencialmente expressos em cada um dos tipos celulares.

É um método muito sensível, podendo ser usado para três propósitos. Um refere-se à visualização do mRNA componente de células através de bandas

curtas de cDNA que correm em paralelo, revelando as diferenças dos padrões de mRNAs. O segundo diz respeito à rapidez com que tais fragmentos podem ser seqüenciados e comparados com seqüências de bancos de dados. Por fim, bandas individuais podem ser clonadas e usadas como provas para *Northern* ou *Southern blottings* e isolamento de genes a partir de bibliotecas genômicas ou de cDNA (Liang e Pardee 1992).

Inúmeros trabalhos podem e têm sido desenvolvidos utilizando-se tal técnica: estudos de desenvolvimento, processos fisiológicos e bioquímicos, genes relacionados ao ciclo circadiano, doenças, resistência e estresse, etc. (Liang e Pardee 1997).

Insetos sociais são também alvo de vários trabalhos utilizando DDRT-PCR. Em 1999, Corona *et al.* identificaram, em *Apis mellifera*, dois genes codificantes de proteínas mitocondriais, subunidade 1 citocromo-oxidase e citocromo c, os quais apresentaram expressão diferencial em rainha e operária. Oliveira-Junior (1999), também estudando *A. mellifera*, encontrou 6 genes diferencialmente expressos que foram relacionados à divisão de trabalho na colônia. Hepperle & Hartfelder (2001) empregaram tal técnica para analisar a expressão de genes envolvidos na regulação de ecdisteróide durante a diferenciação de casta dessa mesma abelha.

Em 2006, Santana *et al.* utilizaram DDRT-PCR para comparar o perfil de mRNA em *Melipona scutellaris* durante o desenvolvimento ontogenético pós-embriônico e em operárias adultas, rainha natural e induzida pelo hormônio juvenil III. Eles observaram a presença de um fragmento em larvas L1 e L2 com similaridade à proteína tiorredoxina redutase, importante durante os processos de oxido-redução, atribuindo um papel fundamental para os primeiros estágios de desenvolvimento, quando a comida é oferecida de uma só vez, implicando num intenso metabolismo energético.

Este trabalho teve como objetivo a identificação de genes diferencialmente expressos na formiga urbana *C. vittatus*, por meio da técnica de DDRT-PCR.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

AGOSTI D e JOHNSON NF. 2005. Antbase. World Wide Web electronic publication. antbase.org, version (05/2005). Acesso em: 13 dez. 2005.

BESHERS SN e FEWELL JH. 2001. Models of division of labor in social insects. *Annu Rev Entomol* 46: 412-40.

BOLTON B. 1994. Identification guide to the ant genera of the world. Harvard University Press, 222 p.

BROWN-JR WL. 2000. Diversity of ants. In: AGOSTI D, MAJER JD, ALONSO LE e SCHULTZ TR (Eds), Standard methods for measuring and monitoring biodiversity, Smithsonian Institution Press, p. 45-79.

BUENO OC e CAMPOS-FARINHA AE. 1998. Comportamento das espécies que invadem as cidades brasileiras. *Vetores & Pragas* 2: 13-6.

BUENO OC e CAMPOS-FARINHA AE. 1999. As formigas domésticas, In: MARICONI FAM (Coord), *Insetos e Outros Invasores de Residências*, Piracicaba: FEALQ, p. 135-180.

CAETANO FH, JAFFÉ K, ZARA FJ. 2002. *Formigas: biologia e anatomia*. Rio Claro: UNESP, 42 p.

CLARK DB, GUAYASAMIN C, PAZMINO O, DONOSO C e VILLACIS YP. 1982. The tramp ant *Wasmannia auropunctata*: autoecology and effects on ant diversity and distribution on Santa Cruz Island, Galapagos. *Biotropica* 14: 196-207.

CORONA M, ESTRADA E, e ZURITA M. 1999. Differential expression of mitochondrial genes between queens and works during caste determination in the honey bee *Apis mellifera*. *J Exp Biol* 202: 929-938.

DREES BM e JACKMAN J. 1999. Field guide to Texas insects. Gulf Publishing Company, Houston, Texas. Disponível em: <<http://entowww.tamu.edu/fieldguide/cimg356.html>>. Acesso em: 14 dez. 2005.

EISNER T e WILSON EO. 1957. Quantitative studies of liquid food transmission in ants. *Insect Soc* 4: 157-166.

FOWLER HG e BUENO OC. 1998. O Avanço das formigas urbanas. *Ciência Hoje* 23: 73-80.

FOWLER HG, FORTI LC, BRANDÃO CRF, DELABIE JHC e VASCONCELO HL. 1991. Ecologia nutricional de formigas. In: PANIZZI AR e PARRA JRP (Eds.), *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*, São Paulo: Manole Editora LTDA., p. 131-223.

GOLD RE e GLENN GJ. 1999. Carpenter Ants. Disponível em: <<http://entowww.tamu.edu/extension/bulletins/l-1783.html>>. Acesso em: 14 dez. 2005.

GULLAN PJ e CRASTON PS. 2005. *The insects: an outline of entomology*, 3a. ed., Blackwell Publishing, 505 p.

HEPPERLE C e HARTFELDER K. 2001. Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development. *Naturwissenschaften* 88: 113-116.

HEDLUND KS. 2003. Genus *Camponotus*. University of North Carolina. Disponível em: <<http://www.cs.unc.edu/~hedlund/dev/ants/GenusPages/Formicinae/Genus51-long.html>>. Acesso em: 14 dez. 2005.

HÖLLDOBLER B e WILSON EO. 1990. *The ants*. Massachusetts: Belknap – Harvard, 732 p.

KOEHLER PG, VAIL KM e CASTNER JL. 1997. Pests ants. SP-119. Department of Entomology and Nematology, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Disponível em: <<http://hammock.ifas.ufl.edu>>. Acesso em: 14/12/2005.

KOEHLER PG e OI FM. 2002. Ants. ENY-203. Department of Entomology and Nematology, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>. Acesso em: 14 dez. 2005.

LEVIEUX J e LOUIS D. 1975. La nutrition des fourmis tropicales – II. Comportement alimentaire et régime de *Camponotus vividus* (Smith) (Hymenoptera Formicidae). Ins Soc 22: 391-404.

LIANG P e PARDEE AB. 1992. Differential display of eukariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257: 967-971.

LIANG P e PARDEE AB. 1997. Differential display methods and protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press.

LONGINO JT. 2002. *Camponotus* overview. Disponível em: <<http://www.evergreen.edu/ants/GENERA/Camponotus/Camponotus.html>>. Acesso em: 14 dez. 2005.

MANNIATIS T, GOODBOURN S e FISCHER JA. 1987. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. Science 236: 1237-1245.

MARCOLINO MT. 1999. Estudos genéticos e comportamentais de formigas carpinteiras *Camponotus atriceps* Smith (Hymenoptera, Formicidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 62 p.

OLIVEIRA JR WP. 1999. Análise da Expressão Gênica diferencial na divisão de trabalho em *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) por DDRT-PCR. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 57 p.

PASSERA L. 1994. Characteristic of tramp species. In: WILLIAMS DF (Ed), Exotic ants: biology, impact and control of introduced species. Boulder, Colorado: Wetsview Press, p. 23-43.

PARDEE AB e MCCLELLAND M. 1999. Expression genetics: differential display. BioTechniques Books, Eaton Publishing, 488 p.

RODOVALHO CM, MARCOLINO MT e BRANDEBURGO MAM. 2003. Formigas como vetores de propagação de *Staphylococcus aureus* no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. In: SIMPÓSIO DE MIRMECOLOGIA, 16, Anais... Florianópolis: 464-466.

ROMERO GQ. 2002. Protection of *Vochysia elliptica* (Vochysiaceae) by a nectar - thieving ant. Braz J Biol 62: 371-373.

SANTANA FA, NUNES FMF, VIEIRA CU, MACHADO MAMS, KERR WE, SILVA JR WA e BONETTI AM. 2006. Differentially displayed expressed sequence tags in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) development. An Acad Bras Cienc. No prelo.

SHATTUCK SO e BARNET NJ. 2001. Australian ants online. CSIRO, Australia. Disponível em: <<http://www.ento.csiro.au/science/ants/formicinae/formicinae.htm>>. Acesso em: 26 dez. 2005.

SILVA RR. 2003. Diversidade de formigas do cerrado. In: SIMPÓSIO DE MIRMECOLOGIA, 16, Anais... Florianópolis: 17-20.

SOARES NS, ALMEIDA LO, GONÇALVES CA, MARCOLINO MT e BONETTI AM. 2005. Levantamento da diversidade de formigas na região urbana de Uberlândia, MG. *Neotrop Entomol. No prelo*

SUAREZ AV, HOLWAY DA e CASE TJ. 2001. Patterns of spread in biological invasions dominated by long-distance jump dispersal: insights from Argentine ants. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1095-1100.

WHEELER DE. 1986. Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. *Am Nat* 128: 13-34.

WILSON EO. 1971. *The insects societies*. Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press, 697 p.

CAPÍTULO ÚNICO

Detecção de genes diferencialmente expressos
na formiga urbana *Camponotus vittatus*
(Hymenoptera, Formicinae)

INTRODUÇÃO

A identificação de genes diferencialmente expressos tem sido usada para o entendimento não só da função gênica, mas também dos mecanismos moleculares de diferentes processos biológicos (Vedoy et al. 1999).

O comportamento social dos insetos é resultado de complexas interações em níveis diferentes da organização biológica. As principais características dos insetos sociais que fascinam os biólogos são: o altruísmo expressado por membros da colônia, a complexa divisão de trabalho e a grande plasticidade demonstrada frente a mudanças ambientais (Page Jr e Erber 2002).

Segundo Robinson (2002), esse interesse em insetos sociais reflete uma vontade de compreender as bases moleculares da vida social: como evoluiu, como é governada e como influencia todos os aspectos da estrutura genômica, expressão gênica e desenvolvimento, fisiologia e comportamento do organismo.

Sendo assim, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de se estudar a expressão gênica diferencial, especialmente em abelhas e formigas, de vários processos biológicos, como desenvolvimento e diferenciação de castas (Evans e Wheeler 1999, Evans e Wheeler 2000, Evans e Wheeler 2001, Liu e Zhang 2004), metamorfose (Goodisman et al. 2005), mudanças fisiológicas (Tian et al. 2004) e outros comportamentos sociais (Lobo et al. 2003).

Vários métodos têm sido empregados nessa análise de genes diferencialmente expressos, dentre eles, o método proposto por Liang e Pardee (1992) *differential display reverse transcriptional polymerase chain reaction* (DDRT-PCR).

Essa técnica, amplamente utilizada, também pode ser aplicada para o estudo em insetos sociais (Corona et al. 1999, Oliveira Jr 1999, Hepperle e Hartfelder 2001, Santana et al. 2006).

O presente trabalho teve como objetivo a identificação de *expressed sequence tags* (ESTs) diferencialmente expressas em casta, sexo e nos estágios de desenvolvimento de *C. vittatus* por meio de DDRT-PCR, bem como o teste de dois protocolos para extração de RNA total dessa formiga.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética do Comportamento do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Material Biológico

As formigas *C. vittatus*, utilizadas como material biológico desse estudo, foram provenientes de ninhos artificiais, mantidos em bandejas plásticas no laboratório, sob condições naturais de temperatura e umidade e alimentadas com larvas do besouro *Tenebrio*, como fonte protéica, e mel ou melado, como fonte de carboidratos.

Foram utilizados indivíduos (Fig. 1) de diferentes castas, sexo e níveis de desenvolvimento: rainhas virgens (R), machos (M), soldados (S), operárias (O) e pupas de macho (PM), de soldado (PS) e de operária (PO).

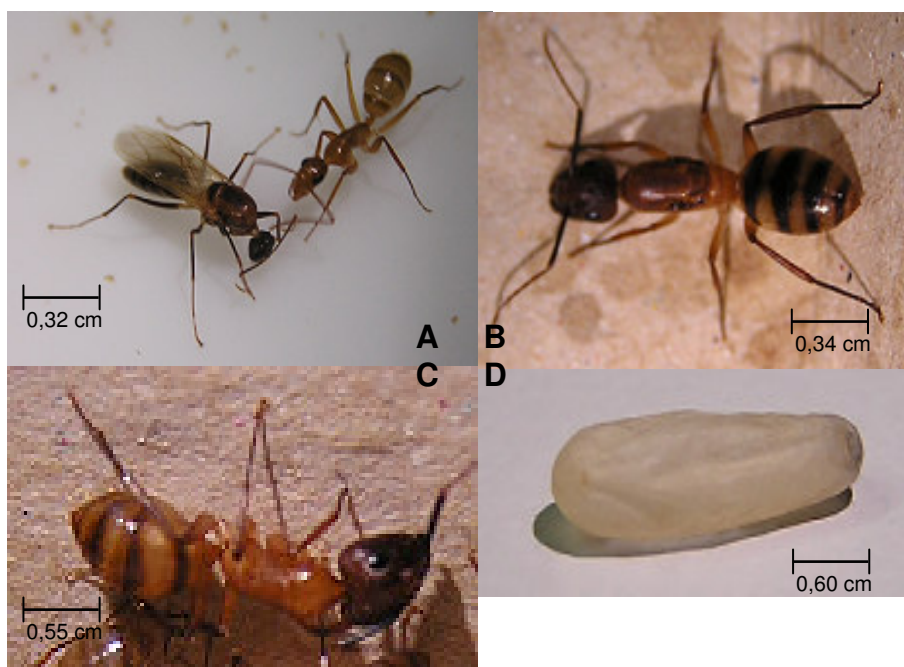


Fig. 1 – *C. vittatus*. **A** – Macho (alado) e operária. **B** – Rainha fisogástrica. **C** – Soldado. **D** – Pupa. (Foto: Cristiano Menezes)

Extração de RNA Total

Foram testados dois protocolos para extração de RNA total, sendo utilizados *pools* de 5 a 6 indivíduos.

O primeiro testado foi o método de Trizol (Invitrogen)(anexo I).

O segundo método foi baseado no protocolo de Chomczynski e Sacchi (1987), com algumas modificações (anexo II).

Após a extração, procedeu-se ao tratamento com DNase I (Sigma-Aldrich) (anexo III), quantificação em espectrofotômetro (*Ultrospec 1100 pro* – Amersham Biosciences) e a qualidade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% (anexo IV).

As amostras foram guardadas em freezer -80°C.

DDRT-PCR – *Differential Display Reverse Transcriptional Polymerase Chain Reaction*

Para as reações de transcrição reversa (RT) foram utilizados 200 ng de RNA total, 8 pmols de um dos *primers* oligo-dT ancorados (Tabela 1), 10 U de RNAsin (Amersham Biosciences), tampão da RT 1X, 500 µM de dNTPs e 200 U de RT-MMLV (Promega), num volume final de 30 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC-100 – MJ Research Inc.), programado para 37°C por 1 hora. Uma reação sem RNA foi feita como controle negativo geral. A enzima transcriptase reversa não foi adicionada aos controles negativos (branco das amostras) para verificação de possível contaminação com DNA.

As reações de amplificação por PCR foram feitas de acordo com o protocolo seguinte: 2 µL da reação de RT, tampão da Taq 1X, 2.5 mM de cloreto de magnésio, 200 µM de dNTPs, 8 pmol de *primer* oligo-DT, 8 pmol de *primer* arbitrário (Tabela 1) e 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Cenbiot), num volume final de 30 µL.

As amplificações foram realizadas em termociclador, programado para 40 ciclos de 94°C por 25 segundos, 40°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto, seguidos

por uma temperatura de extensão final de 72°C por 5 minutos e 4°C por tempo indeterminado.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida 10%, não desnaturante, em corrida a 250V, por 5 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados com AgNO₃ (anexo V).

As bandas representando genes diferencialmente expressos foram cortadas dos géis, o cDNA foi eluído e precipitado (anexo VI).

Os fragmentos purificados foram reamplificados utilizando-se as mesmas condições de PCR descritas, exceto pela quantidade de *primers* que foi reduzida para 6 pmol. As amostras reamplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1.5%, coradas com brometo de etídio. As bandas foram recortadas e purificadas para seqüenciamento (anexo VII).

Tabela 1 – Seqüência dos oligo-dT (HT11) e *primers* arbitrários (AP) utilizados nos experimentos de DDRT-PCR.

<i>Primers</i>	Seqüência 5' – 3'
HT11A	AAGCTTTTTTTTTTTTA
HT11C	AAGCTTTTTTTTTTTTC
HT11G	AAGCTTTTTTTTTTTTG
AP01	AAGCTTGATTGCC
AP02	AAGCTTGCACTGT
AP03	AAGCTTTGCTCAG
AP04	AAGCTTCTCAACG
AP05	AAGCTTAGTAGGC

Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado no Laboratório de Genética Molecular (UFU), utilizando-se o *kit Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems* (Amersham Biosciences) para seqüenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences).

Para cada amostra foram montadas duas reações (uma para o *primer* oligo-dT e outra para o *primer* arbitrário) contendo 4 µL de DNA (aproximadamente 400 ng), 1 µL de *primer*, 4 µL de reagente premix do *kit* e 1 µL de água, totalizando 10 µL. Foram feitos 35 ciclos iguais aos descritos para as reações de amplificação (PCR).

Análise das Seqüências

As seqüências obtidas foram alinhadas utilizando-se os programas BioEdit Version 7.0.0 (2004) e Multialin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) para obtenção de seqüências consideradas ESTs de alta qualidade.

Tais seqüências foram também traduzidas, utilizando-se o programa Expasy Proteomics Server (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>) e comparadas ao banco de dados GenBank utilizando as ferramentas de BLAST: BLASTN, BLASTX, TBLASTX, RPSBLAST (domínios conservados) e BLAST de peptídeos curtos (*short, nearly exact matches*), disponíveis em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

A análise de domínios e famílias de proteínas foi feita utilizando-se o site Prosite (<http://www.expasy.org/prosite/>).

Três ESTs foram depositadas no banco de dados dbEST.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para *C. vittatus*, o protocolo de Chomczynski e Sacchi (1987) mostrou-se o mais eficaz. O RNA obtido foi de alta qualidade com pequena ou inexistente contaminação por DNA (Fig. 2). A extração do RNA total de um *pool* de indivíduos também foi de relevância, evitando-se que a variação na expressão gênica individual pudesse interferir nos resultados, como dito por Oliveira Jr (1999).

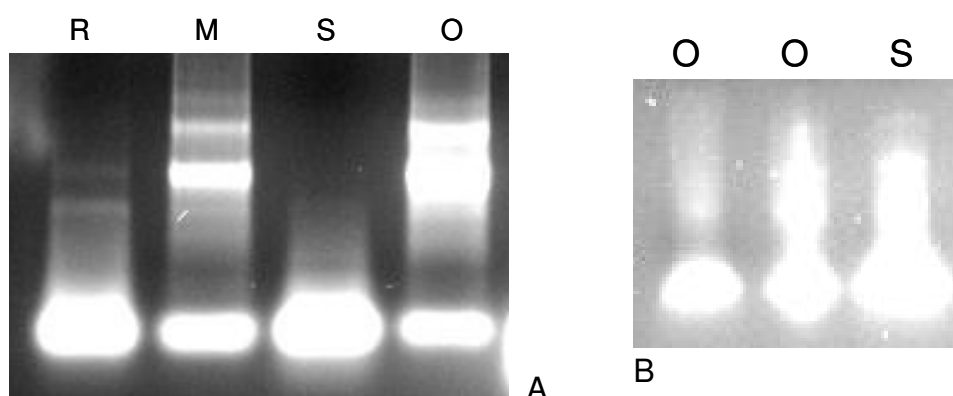


Fig. 2 – Extração de RNA total pelo método de Chomczynski e Sacchi (A) e pelo método do Trizol (B). **R** – rainhas virgens; **M** – machos; **S** – soldados; **O** – operárias.

Foram testadas 15 combinações de *primers*, sendo que os melhores resultados foram obtidos com o oligo-dT HT11G. Mou et al. (1994), em estudo com fibroblastos e tecido cardíaco de rato, também encontraram que *primers* ancorados com no mínimo uma base G foram mais eficientes que os com uma base C e que os *primers* terminados em A foram os menos eficientes em experimentos de amplificação.

Puderam-se verificar diferenças de intensidade em fragmentos durante os diferentes estágios de desenvolvimento, casta e sexo, sendo encontradas, ainda, bandas específicas para apenas uma das amostras (Fig. 3). Várias dessas bandas, observadas como sendo diferencialmente expressas, foram recortadas e reamplificadas. Todavia, devido à baixa quantidade obtida de algumas bandas (cDNA) e o tamanho reduzido (<200 pb) de outras, somente 14 foram seqüenciadas (Fig. 4). Destas, apenas 4 apresentaram-se como ESTs de alta qualidade e foram analisadas por bioinformática. ESTs provêm um método

econômico para identificar um grande número de genes que podem ser usados na expressão gênica e outros estudos genômicos (Gerhold e Caskey 1996).

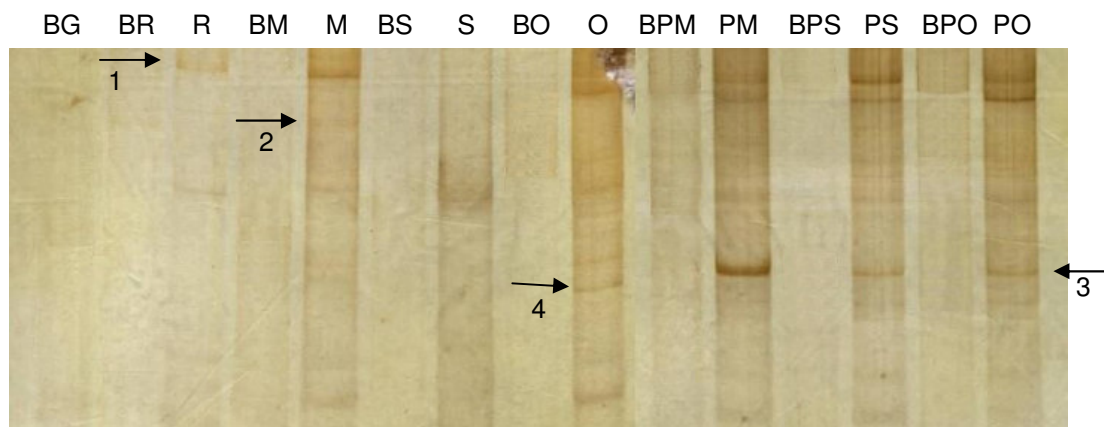


Fig. 3 – Gel de poliacrilamida 10%, não desnaturante, obtido pela combinação dos *primers* HT11G e AP03. **1** – banda casta específica de rainha. **2** – banda sexo específica. **3** – banda específica de um estágio de desenvolvimento (pupas) e diferencialmente expressa. **4** – banda casta específica de operária. **BG** – branco geral (sem RNA); **B_** – branco das amostras (sem RT-MMLV); **R** – rainhas virgens; **M** – machos; **S** – soldados; **O** – operárias; **PM** – pupas de macho; **PS** – pupas de soldado; **PO** – pupas de operária.

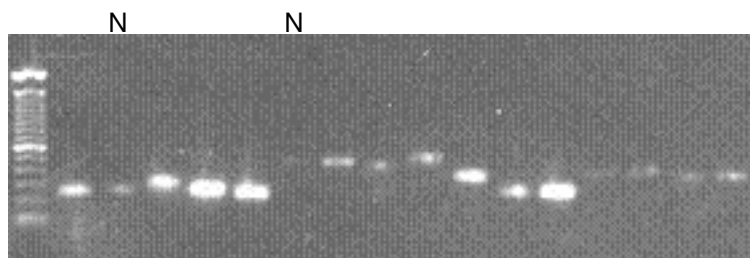


Fig. 4 – Gel de agarose 1.5% mostrando a qualidade das 14 bandas submetidas ao seqüenciamento. **N-** bandas não seqüenciadas.

A busca por domínios conservados das 3 primeiras seqüências não apresentou nenhum domínio já descrito ou domínio funcional. BLASTN, BLASTX, TBLASTX e alinhamentos com peptídeos curtos (*short, nearly exact matches*) não apresentaram resultados significativos de homologia a qualquer seqüência conhecida e depositada no GenBank.

A primeira seqüência (número de acesso DW183728) foi obtida pela combinação dos *primers* HT11G e AP01, sendo uma banda específica de rainha

virgem. A tradução da seqüência pelo programa Expasy, gerou um peptídeo de 34 aminoácidos (aas) (*frame 2*, sentido 5'3'). A busca por domínios e famílias de proteínas, utilizando-se o Prosite, indicou a presença de um sítio de fosforilação por caseína kinase II (aa 1 a 4) e de um sítio de N-glicosilação (aa 20 a 23).

A segunda seqüência (número de acesso DW183729) também foi obtida pela combinação dos *primers* HT11G e AP01, sendo uma banda específica de pupas de soldado e operária, podendo estar ligada à diferenciação de castas ou ao sexo, já que não foi observada em machos. Resultados mais conclusivos não puderam ser obtidos, pois não se trabalhou com pupas de rainhas. A tradução da seqüência pelo programa Expasy, gerou dois peptídeos de 9 e 12 aas (*frame 1* e *frame 3*, respectivamente, sentido 5'3'). O programa Prosite indicou a presença de um sítio de fosforilação por caseína kinase II (aa 2 a 5) no peptídeo de 12 aa. O programa não detectou nenhum sítio ou domínio para o peptídeo menor.

A terceira seqüência (número de acesso DW183730), proveniente de uma banda observada apenas em pupas, foi obtida pela combinação dos *primers* HT11G e AP02. O produto da tradução foi um peptídeo de 36 aas (*frame 2*, sentido 5'3'). A busca por domínios e famílias de proteínas, verificou a presença de um sítio de N-glicosilação (aa 11 a 14), de um sítio de fosforilação pela proteína kinase C (aa 13 a 15), de um sítio de fosforilação pela proteína caseína kinase II (aa 13 a 16) e de um sinal alvo de microcorpos C-terminal (aa 34 a 36). Microcorpos são uma classe de organelas pequenas e de membrana única, à qual pertencem peroxissomos, glioxissomos e glicosomos. Suas proteínas são sintetizadas em polissomos livres e importadas para a organela após a tradução, geralmente, não necessitando da clivagem da pré-seqüência (Prosite).

A maioria das seqüências não apresentou similaridade com nenhuma seqüência depositada no GenBank. Até o momento, estão depositadas em torno de 450 seqüências de *Camponotus* (Entrez, NCBI) referentes a citocromo, microsátélites, rRNA, abdominal-A, genes de bactérias endossimbiontes, entre outros.

Goodisman et al. (2005) construíram duas bibliotecas de cDNA para *C. festinatus* e não encontraram similaridade em 40% de suas seqüências. Como sugerido pelos mesmos autores, isso pode estar relacionado ao fato de serem seqüências relativamente curtas ou ricas em AT, o que indica regiões truncadas

ou não codificantes, como as regiões 3' não traduzidas (3'-UTRs). Analisando-se as seqüências obtidas no presente estudo, é possível verificar que variam de 190 a 388 pares de base (pb), com conteúdo de A+T variando entre 58.51% e 73.68%, inclusive com presença de cauda poliA. Essas regiões evoluem relativamente rápido devido à falta de confinamento funcional e, por isso, o alinhamento com seqüências existentes do GenBank é dificultado (Li 1997).

Lobo et al. (2003) seqüenciaram 81 kb do DNA genômico de *Apis mellifera*, sendo que 13 transcritos preditos não apresentaram semelhança a nível de nucleotídeos ou aminoácidos, quando analisados por BLASTN e BLASTX. Os autores sugerem que tais diferenças, principalmente quando comparadas aos genomas de *Drosophila* e *Anopheles*, possam estar relacionadas com a evolução de traços únicos, como comportamento social e haplodiploidia. Eles ainda concluem que esta grande variação possa representar uma região genômica ou genes perdidos durante a evolução desses dípteros.

Pode-se, ainda argumentar, que essas são seqüências ainda não estudadas em outras espécies e depositadas pela primeira vez num banco de dados público, ou que são seqüências específicas de *C. vittatus*, regulando processos biológicos restritos ao desenvolvimento e determinação de castas e sexo dessa formiga.

A quarta seqüência (Fig. 5) foi obtida pela combinação dos *primers* HT11G e AP03, sendo uma banda específica de operária. O produto da tradução foi um peptídeo de 43 aas (*frame 2*, sentido 5'3'). A busca por domínios conservados indicou a presença de um domínio *groI* da família das chaperoninas. As análises de BLASTN, BLASTX, TBLASTX e alinhamentos com peptídeos curtos (*short, nearly exact matches*) também foram similares a chaperoninas ou *heat shock proteins* de vários organismos, com E value < 1e-4, atingindo 4e-48 para o BLASTN (Fig. 6). O Prosite mostrou a presença de um sítio de N-miristoilação (aa 6 a 11), isto é, um apreciável número de proteínas são acetiladas pela adição covalente de miristato, um ácido graxo C14-saturado, ao resíduo N-terminal via uma ligação amida.

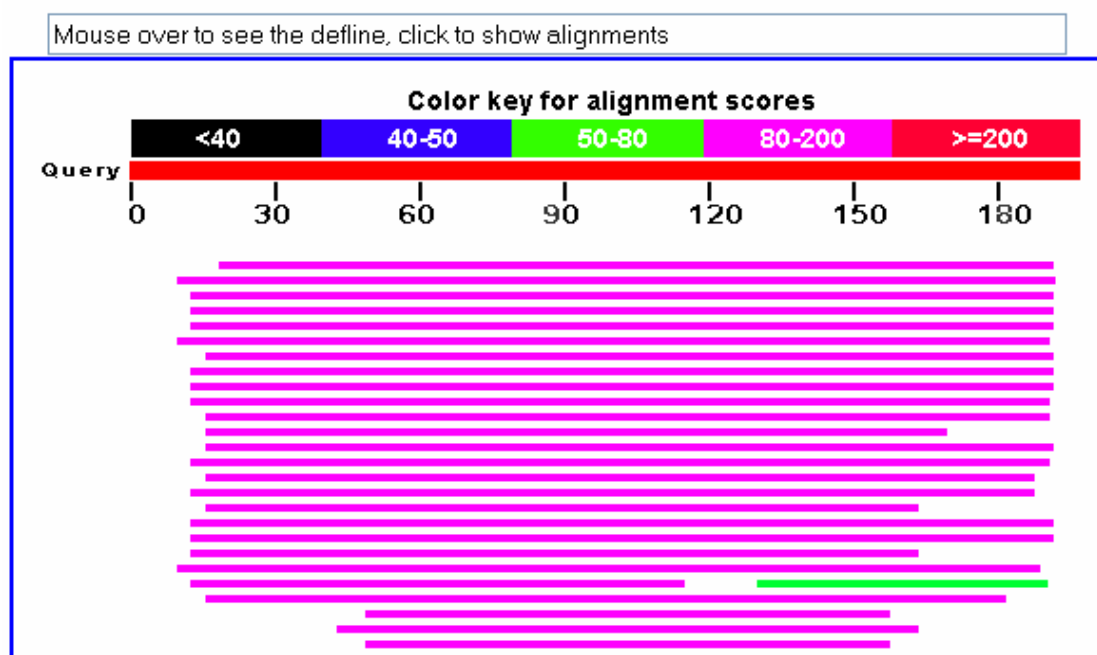
```

AGCTTTGCTCCAGGTAGGTACTATTTCTGCAAATTCTGATGAGACTGTAGGTAATTAATTGCT
CAAGCTATGGAACAAGGTTGGGAAAGAAGGAGTGATTACTGTAGAAGAAGGATCTGGGTTAC
AAGATGAGTTAGATGTAGTTGAAGGAATGCAGTTTGATCGTGGGTATCTTTCTCCGTATTTGT
TGAATA

```

Fig. 5 – Sequência do fragmento específico de operária de *C. vittatus* pela combinação dos *primers* HT11G e AP03.

Distribution of 120 Blast Hits on the Query Sequence



Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value
gi 41058609 gb AY334440.1	Candidatus Blochmannia ulcerosus i...		<u>198</u>	4e-48
gi 41058601 gb AY334436.1	Candidatus Blochmannia festinatus ...		<u>192</u>	3e-46
gi 33517146 emb BX248584.1	Blochmannia floridanus complete geno		<u>186</u>	2e-44
gi 41058623 gb AY334447.1	Candidatus Blochmannia floridanus ...		<u>186</u>	2e-44
gi 41058613 gb AY334442.1	Candidatus Blochmannia chromaiodes...		<u>186</u>	2e-44
gi 41058619 gb AY334445.1	Candidatus Blochmannia americanus ...		<u>174</u>	6e-41
gi 41058597 gb AY334434.1	Candidatus Blochmannia laevigatus ...		<u>172</u>	2e-40
gi 41058611 gb AY334441.1	Candidatus Blochmannia pennsylvani...		<u>170</u>	1e-39
gi 71795899 gb CP000016.1	Candidatus Blochmannia pennsylvani...		<u>170</u>	1e-39
gi 41058607 gb AY334439.1	Candidatus Blochmannia vicinus iso...		<u>168</u>	4e-39
gi 41058615 gb AY334443.1	Candidatus Blochmannia castaneus i...		<u>155</u>	6e-35
gi 21425626 emb AJ439085.1	BAP439085 Buchnera aphidicola (Thelax		<u>153</u>	2e-34
gi 41058617 gb AY334444.1	Candidatus Blochmannia novaboracen...		<u>149</u>	4e-33
gi 41058593 gb AY334432.1	Candidatus Blochmannia sansabeanus...		<u>145</u>	6e-32
gi 41058605 gb AY334438.1	Candidatus Blochmannia schaefferi ...		<u>141</u>	9e-31
gi 41058599 gb AY334435.1	Candidatus Blochmannia sayi isolat...		<u>139</u>	3e-30
gi 41058603 gb AY334437.1	Candidatus Blochmannia ocreatus is...		<u>133</u>	2e-28
gi 41058621 gb AY334446.1	Candidatus Blochmannia nearcticus ...		<u>131</u>	8e-28
gi 41058595 gb AY334433.1	Candidatus Blochmannia vafer isola...		<u>107</u>	1e-20

Fig. 6 – BlastN da seqüência 4, mostrando a alta similaridade com chaperoninas de *Candidatus Blochmannia*.

A partir desses resultados, buscou-se similaridade no banco de dados de chaperoninas cpnDB (<http://cpndb.cbr.nrc.ca>), que contém 2000 arquivos, aproximadamente um terço dos quais apresentam dados da seqüência completa de genes cpn60. Os dois terços restantes contêm dados exclusivamente de seqüências “alvo universais” (regiões que provêm dados filogenéticos mais informativos e discriminantes do que a região 16S do rDNA) (Hill et al. 2004.). Foi possível constatar 87.76% de similaridade com *Candidatus* Blochmannia floridanus e alinhamentos significativos com 10 proteínas provenientes de diferentes organismos (E value = 1e-07).

As chaperoninas são moléculas chaperonas presentes em praticamente todas as bactérias, alguns Archaea e plastos e mitocôndrias de eucariotos (Hill et al. 2004). Membros da família *heat shock protein* são moléculas chaperonas que impedem que polipeptídeos recém sintetizados agreguem-se, mediando seu enovelamento para o estado nativo (Ellis 1994). Tais proteínas são altamente conservadas e sintetizadas em resposta a exposição a temperaturas elevadas (Lindquist 1986, Peterson e Mitchell 1985). Um termo mais acurado seria proteínas induzidas pelo estresse, pois são também produzidas em resposta a uma variedade de condições de estresse metabólico e ambiental (Barettino et al. 1988, Tatem e Stollar 1989). A natureza universal dos genes das chaperoninas é útil para estudos filogenéticos e como alvo para detecção e identificação de organismos (Hill et al. 2004).

Existe uma hipótese de que proteínas chaperonas são requeridas, e por isso, produzidas em grandes quantidades, para a sobrevivência de bactérias parasitas, bem como para associações simbióticas. Charles et al. (1997), em um estudo com *Sitophilus oryzae* e respectiva bactéria endossimbionte, apoiaram essa hipótese de que chaperoninas possam ter uma função fisiológica essencial na manutenção de tal associação.

Bactérias endossimbiontes são comuns em várias ordens de insetos, estando envolvidas em interações desde mutualismo obrigatório a parasitismo reprodutivo. *Candidatus* Blochmannia é uma bactéria obrigatoriamente associada a *Camponotus* e gêneros relacionados. Provavelmente, esta associação é estável e antiga, já que a bactéria ocorre em todas as espécies do gênero, sendo transmitida matematicamente (Degnan et al. 2004).

Os dados obtidos através da bioinformática indicam que a quarta seqüência foi proveniente da bactéria endossimbionte *Candidatus Blochmannia floridanus* e não da formiga estudada. Como não foi feito nenhum tratamento, nem retirada de intestino (um dos órgãos habitados por tal bactéria) ou da gáster, é perfeitamente plausível que o mRNA foi obtido do organismo endossimbionte. A presença da banda somente em operária, ainda reforça tal hipótese. Em muitas dessas interações, o microorganismo parece estar envolvido em processos metabólicos, como suprimento com aminoácidos essenciais e vitaminas ou reciclagem do nitrogênio do ácido úrico para o organismo hospedeiro (Baumann et al. 1995, Cochran 1985, Douglas 1998, Heddi et al. 1999, Nogge 1982). As operárias são os indivíduos que desempenham o maior número de funções dentro da colônia, sendo responsáveis, inclusive, pela busca e distribuição do alimento para todos os demais membros.

A confirmação de todas as bandas por *northern blot* ainda não foi realizada, porém pretende-se fazê-la o mais rápido possível. A construção de *primers* para continuação de estudos com tais ESTs, buscando-se a caracterização dos genes inteiros, também é de grande interesse, sendo um dos próximos objetos de pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARETTINO G, MORCILLO G e DIEZ JL. 1988. Induction of the heat-shock response by carbon dioxide in *Chironomous thummi*. Cell Differ 23: 27-36.

BAUMANN P, BAUMANN L, LAI CY, ROUHBAKHSH D, MORAN NA e CLARK MA. 1995. Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. Annu Rev Microbiol 49: 55-94.

CHARLES H, HEDDI A, GUILLAUD J, NARDON C e NARDON P. 1997. A molecular aspect of symbiotic interactions between the weevil *Sitophilus oryzae* and its endosymbiotic bacteria: over-expression of a chaperonin. Biochem Biophys Res Comm 239: 769-774.

CHOMCZYNSKI P e SACCHI N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159.

COCHRAN DG. 1985. Nitrogen excretion in cockroaches. Annu Rev Entomol 30: 29-49.

CORONA M, ESTRADA E, e ZURITA M. 1999. Differential expression of mitochondrial genes between queens and works during caste determination in the honey bee *Apis mellifera*. J Exp Biol 202: 929-938.

DEGNAN PH, LAZARUS AB, BROCK CD e WERNEGREEN JJ. 2004. Host-symbiont stability and fast evolutionary rates in an ant-bacterium association: cospeciation of *Camponotus* species and their endosymbionts, *Candidatus* Blochmannia. Syst Biol 53: 95-110.

DOUGLAS AE. 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria. Annu Rev Entomol 43: 17-37.

ELLIS RJ. 1994. Roles of molecular chaperones in protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 4: 117- 122.

EVANS JD e WHEELER DE. 1999. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci* 96: 5575-5580.

EVANS JD e WHEELER DE. 2000. Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biol* 2: research 0001.1-0001.6.

EVANS JD e WHEELER DE. 2001. Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. *Bioessays* 23: 62-68.

GERHOLD D e CASKEY CT. 1996. It's the genes! EST access to human genome content. *Bioessays* 18: 973-981.

GOODISMAN MAD, ISOE J, WHEELER DE e WELLS MA. 2005. Evolution of insect metamorphosis: a microarray-based study of larval and adult gene expression in the ant *Camponotus festinatus*. *Evolution* 59: 858-870.

HEDDI A, GRENIER AM, KHATCHADOURIAN C, CHARLES H e NARDON P. 1999. Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont and *Wolbachia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6814-6819.

HEPPERLE C e HARTFELDER K. 2001. Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development. *Naturwissenschaften* 88: 113-116.

HILL JE, PENNY SL, CROWELL KG, GOH SH e HEMMINGSEN SM. 2004. cpnDB: a chaperonin sequence database. *Genome Res* 14: 1669-1675.

LI WH. 1997. *Molecular evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

LIANG P e PARDEE AB. 1992. Differential display of eukariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.

LINDQUIST S. 1986. The heat shock response. *Annu Rev Biochem* 55: 1151-1191.

LIU N e ZHANG L. 2004. CYP4AB1, CYP4AB2 and Gp-9 gene overexpression associated with workers of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. *Gene* 327: 81-87.

LOBO NF, TON LQ, HILL CA, EMORE C, ROMERO-SEVERSON J, HUNT GJ e COLLINS FH. 2003. Genomic analysis in the sting-2 quantitative trait locus for defensive behavior in the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res* 13: 2588-2593.

MOU L, MILLER H, LI J, WANG E e CHALIFOUR L. 1994. Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochem Biophys Res Com* 199: 564-569.

NOGGE G. 1982. Significance of symbionts for the maintenance of an optimal nutrition state for successful reproduction in hematophagous arthropods. *Parasitol* 82: 299-304.

OLIVEIRA JR WP. 1999. Análise da Expressão Gênica diferencial na divisão de trabalho em *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) por DDRT-PCR. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 57 p.

PAGE JR RE e ERBER J. 2002. Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. *Naturwissenschaften* 89: 91-106.

PETERSON NS e MITCHELL HK. 1985. Heat shock proteins. In: KERKUT GA e GILBERT LI (Eds) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Nova York: Pergamon Press, Elmsford p. 347-366.

ROBINSON GE. 2002. Development: sociogenomics takes flight. *Science* 297: 204-205.

SANTANA FA, NUNES FMF, VIEIRA CU, MACHADO MAMS, KERR WE, SILVA JR WA e BONETTI AM. 2006. Differentially displayed expressed sequence tags in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) development. *An Acad Bras Cienc. No prelo.*

TATEM J e STOLLAR V. 1989. Effect of *Sindbis* virus infection on the induction of heat shock proteins in *Aedes albopictus* cells. *J Virol* 63: 992-996.

TIAN H, VINSON SB e COATES CJ. 2004. Differential gene expression between alate and dealate queens in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Biochem Mol Biol* 34: 937-949.

VEDOY CG, BENGTON MH e SOGAYAR MC. 1999. Hunting for differentially expressed genes. *Braz J Med Biol Res* 32: 877-884.

CONCLUSÕES

O método de extração de RNA baseado em Chomczynski e Sacchi (1987) demonstrou ser o mais eficaz para *C. vittatus*, quando comparado com o método de extração por Trizol.

A técnica DDRT-PCR foi eficiente para a detecção de genes diferencialmente expressos em casta, sexo e estágios de desenvolvimento de *C. vittatus*.

A combinação de *primers* com oligo-dT HT11G foi a que apresentou os melhores resultados.

As três seqüências obtidas para as quais não houve similaridade com seqüências depositadas em banco de dados, podem ser novas e, talvez, específicas de *C. vittatus*.

A combinação dos *primers* HT11G e AP03 permitiu a amplificação de um transcrito da bactéria endossimbionte, cuja seqüência apresentou alta similaridade com proteínas da família das chaperoninas.

ANEXOS

Anexo I

Extração de RNA pelo método do Trizol

- Macerar o tecido em 1 mL de Trizol/ 100 mg de tecido;
- Vortexar. Deixar a 30°C por 5 min;
- Adicionar 0,2 mL de clorofórmio/ mL de Trizol;
- Vortexar por 15 seg. Deixar a 30°C por 2 min;
- Centrifugar por 15 min, a 12.000g, a 4°C;
- Transferir a fase aquosa para tubo tipo *eppendorf*;
- Adicionar 0,5 mL de isopropanol/ mL de Trizol;
- Misturar e incubar em temperatura ambiente por 10 min;
- Centrifugar por 10 min, a 12.000g, a 4°C;
- Lavar o *pellet* com 1 mL de etanol 75%/ mL de Trizol, centrifugando por 5 min, a 7.500g, a 4°C;
- Secar o *pellet* ao ar;
- Ressuspender o *pellet* em água tratada com DEPC.

Anexo II

Extração de RNA pelo método de CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987), com algumas modificações.

Colocar 800 μ L de solução D em tubo tipo *ependorf* de 2 mL;
Macerar o material com ponteira;
Adicionar 6,4 μ L de β -mercaptoetanol;
Agitar levemente e mergulhar em gelo;
Adicionar 80 μ L de acetato de sódio 2M, pH 4.0;
Adicionar 800 μ L de fenol saturado em água (pH = 4 a 5);
Acrescentar 160 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (49 : 1);
Vortexar cuidadosamente a suspensão por 10 seg;
Colocar em gelo por 15 minutos;
Centrifugar por 15 min a 12000 g, 4°C;
Transferir 750 μ L do sobrenadante para microtubo de 1,5 mL.
Adicionar igual volume de isopropanol.
Manter à -20°C *overnight* (15 horas);
Centrifugar por 15 min a 12000 g, 4°C;
Lavar o pellet com 800 μ L de etanol 75%;
Centrifugar por 5 min a 12000 g, 4°C;
Deixar o pellet secar a temperatura ambiente por no mínimo 15 min e no máximo 30 min (tubos invertidos em papel toalha);
Ressuspender a amostra em 30 μ L de água;
Armazenar a -80°C.

OBS.: Para obtenção de uma mostra de RNA de qualidade, a água utilizada no preparo de todas as soluções (com exceção do FENOL) e na ressuspensão da amostra deve ser previamente tratada com DEPC.

SOLUÇÃO D: 50g de tiocianato de guanidina 4M
3,52 mL de citrato de sódio 0,75M, pH 7
5,3 mL de sarcosil 10%
58,6 mL de água DEPC

FENOL TAMPONADO EM H₂O: 50 mL de fenol liquefeito
50 mL de água

Colocar o fenol em banho-maria para facilitar a dissolução;

Agitar com a bailarina e deixar em repouso pelo mesmo tempo que agitou (\pm 20 min) para separar as 2 fases;

Trocar a água umas 3 vezes e medir o pH com a fita (pH 4).

OBS: trabalhar sempre na câmara de fluxo com muito cuidado, reagente altamente corrosivo.

Anexo III

Tratamento do RNA com DNase I

- Colocar em novo microtubo tipo *ependorf* 10 μ L de RNA;
- Acrescentar 2,2 μ L de água tratada com DEPC;
- Colocar 1,5 μ L do tampão da enzima (1/10 do volume final);
- Adicionar 0,3 μ L de RNAsin;
- Colocar 1 μ L de DNase (1/10 do volume de RNA);
- Deixar em banho-maria por 15 min, a 37°C.
- Deixar em banho-maria por 15 min, a 65°C.

Anexo IV

Visualização de RNA em gel de agarose 1%

Colocar em um microtubo tipo *ependorf* 2 μ L de load;

Adicionar 2 μ L de formamida;

Acrescentar 3 μ L de RNA;

Aplicar no gel.

Tampão da cuba: TBE 0,5X

GEL DE AGAROSE 1%: 1 g de agarose

100 mL de TBE 0,5 X

1,5 μ L de Brometo de etídio

TBE 5X: 54 g de Tris

27,5 g de Ácido Bórico

20 mL de EDTA (0,5M pH 8)

volume total de 1L

EDTA 0,5M: 18,61 g de EDTA

100 mL de água destilada

2 g de NaOH

Anexo VColoração de gel de poliacrilamida por AgNO_3

Fixar o gel em solução de ácido acético glacial a 10% por no mínimo 30 min;

Lavar 2 vezes com água destilada por 2 min;

Emergir em solução 0,012M de nitrato de prata (200mg/100mL de água) e 0,056% de formalina (150 μ l de formaldeído/100mL), por 20 min, no escuro;

Lavar 2 vezes por 30 seg em água destilada;

Revelar com solução gelada 0,28M de carbonato de sódio anidro (3g/100ml), 0,056% de formalina (150 μ l de formaldeído/100mL) e 4 μ M de tiosulfato (20 μ l de tiosulfato – 10mg/100mL) até a imagem ser alcançada;

Adicionar o formaldeído e o tiosulfato imediatamente antes do uso;

A revelação é parada com ácido acético glacial 10%.

Anexo VI

Reamplificação de bandas de cDNA diferencialmente expressas

Recortar do gel de poliacrilamida as bandas de interesse, usando alfinetes autoclavados, e colocar em um microtubo tipo *eppendorf*;

Macerar as bandas com auxílio de uma ponteira nova autoclavada;

Adicionar 100 μL de água, ferver por 15 min;

Centrifugar por 3 min, a 14.000 rpm, 4°C e coletar o sobrenadante;

Adicionar 5 μL de glicogênio (20 mg/mL), 10 μL de acetato de amônio 3M (pH 5,2) e 450 μL de etanol 100% gelado;

Deixar a -20°C *overnight*;

Centrifugar por 20 min, a 14.000 rpm, 4°C;

Lavar o *pellet* com 500 μL de etanol 85% gelado, centrifugar por 7 min, a 14.000 rpm, 4°C;

Secar o *pellet* ao ar;

Dissolver o *pellet* em 10 μL de H₂O.

Anexo VII

Eluição de bandas de gel de agarose

Recortar do gel de agarose as bandas de interesse, utilizando estilete limpo, e guardar em microtubos tipo *ependorf*;

Fazer 3 furos pequenos no microtubo de 0.5 mL. Colocar algodão de vidro no fundo; Colocar essa “coluna” em um tubo de 1.5 mL.

Acrescentar as bandas recortadas;

Centrifugar por no mínimo 5 min, a 5.000 rpm;

Acrescentar 1/10 do volume de acetato de amônio 7.5M ou acetato de sódio 3.5M, ao centrifugado.

Adicionar 2 volumes de etanol 100% gelado;

Colocar 10 μ L de glicogênio 10 mg/mL;

Deixar precipitando *overnight*;

Centrifugar por 15 min, a 13.000 rpm, a 4°C;

Lavar o *pellet* com etanol 70% (\pm 200 μ L) gelado;

Centrifugar por 5 min, a 13.000 rpm, a 4°C;

Deixar o *pellet* *secar*;

Ressuspender o *pellet* em 15 μ L de água.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)