



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

**Fator FOXO e sinalização nutricional na
reprodução de *Blattella germanica*.**

JULIANA ALMEIDA COBO

ORIENTADORA: Dra. Ana Maria Bonetti / UFU

CO-ORIENTADOR: Dr. José Luís Maestro/ CSIC-BARCELONA

UBERLÂNDIA – MG

2008

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

Fator FOXO e sinalização nutricional na reprodução de *Blattella germanica*.

JULIANA DE ALMEIDA COBO

ORIENTADORA: Dra. Ana Maria Bonetti / UFU

CO-ORIENTADOR: Dr. José Luís Maestro/ CSIC-BARCELONA

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

UBERLÂNDIA – MG
2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Fator FOXO e sinalização nutricional na reprodução de *Blattella germanica*.

JULIANA ALMEIDA COBO

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dra. Ana Maria Bonetti (Orientadora)

Examinadores: Dr. Carlos Ueira Vieira

Dra. Cristina Soares Souza

Dra. Sandra Morelli

Dra. Zila Luz Paulino Simoes

Data da defesa: 31-03-2008

As sugestões da Comissão Examinadora e as normas PGGB para o formato da dissertação foram contempladas.

Dra. Ana Maria Bonetti

**Aos meus Pais William e Maria
Por me oferecerem tudo que sempre
quis da maneira que eu precisava e não
que queria, obrigado por me ensinar, me educar
e por estar presentes em todos os tijolinhos da minha vida,
porque em cada conquista minha, foi para dar um sorriso a vocês.**

Não há nada de nobre em sermos superiores ao próximo. A verdadeira nobreza consiste em sermos superiores ao que éramos antes.

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo o que ele faz por mim e pela minha família.

Aos meus pais, A Vivi, ao Junior e a Gabriela e a minha Vó Vera vocês são as pessoas que mais amo na vida. Muito obrigado por me proporcionarem tudo para garantir minha felicidade e formação.

Aos meus avós (Antonio, Silvério e Maria) que não podem estar presente neste momento tão importante, mas vocês moram no meu coração.

À meu marido Rodrigo, que me apoiou, me auxiliou, e foi meu grande companheiro nos momentos mais difíceis nesta caminhada. Te amo.

A Thais, minha cunhada, pela atenção, carinho e toda ajuda, sem vc com certeza não conseguiria terminar a tese, muito obrigada.

Aos meus sogros Eny e Dalton por sofrerem comigo e serem um apoio fundamental para completar essa etapa na minha vida. Obrigada!!!

Aos grandes e sinceros amigos que me ajudaram muito na realização deste trabalho, em especial, , Carlos Ueira e Roni,

Aos amigos do Laboratório de Genética (Rafael, Luciana Londe, Carol, Flávia, Tininha e Cynara) e de Genética Molecular (Todos - já que são muitos) pelo convívio e apoio.

À Dra. Ana Maria Bonetti, por ter aceitado me orientar, pelo carinho, atenção, conselhos, correções do trabalho e pelo seu conhecimento.

Al Dr. Jose Luis Maestro, por todo cariño, y atencion, por todo conocimiento que mi há proporcionado, a ti mas que há nadie agradezco mi tesis.

A todos mis amigos del laboratorio de biologia molecular de Barcelona, Ferran, Oscar, Claudia, Dani, Laura, Paula, Viviana, Santiago, Marisol, e Marc por toda ayuda prestada. Gracias muchas gracias..

Al Dr. Davi Marti por las risas y el serio de la ciência.

Al Dr. Xavier Bellés por ter- me aceptado en su laboratorio y me ensinar a respectar y amar aun mas a la ciencia.

A Dra. Dolors Piulachs por ser mi primeira voz en el laboratorio, por siempre contestarme tan pronto en todo que necesitaba, gracias..

A mis amigas LLuisa Vilaplana y Nuria Pascual, por seren mis hermanas mayores, mis companeras del laboratorio y amigas no lo se como agradecer todo que han hecho por mi..

A mi amiga Natty, por todas las sonrisas, por todo el carino, por todo que me ha ensinado, por la paciência te echo de menos.. te amo amiga.

À Dra. Zilá Simões, por ter me ensinado pacientemente algumas etapas do trabalho e pela amizade formada. Muito Obrigado.

À Marlene, pelo carinho e apoio em tudo. Sua benção.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Genética e Bioquímica, por disponibilizarem o laboratório no qual a pesquisa foi desenvolvida.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado, me ajudando a alcançar mais este objetivo (meu pessoal de Uberaba). Meu muito obrigado!

ÍNDICE

	Pág
Lista de Abreviaturas	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Figuras	vi
Apresentação	01
Capítulo 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXO E A SINALIZAÇÃO NUTRICIONAL NA REPRODUÇÃO PARA O ORGANISMO <i>Blattella germanica</i>.	04
1.1 OS INSETOS COMO MODELO PARA ESTUDOS DOS SINAIS NUTRICIONAIS	05
1.2 VIAS METABÓLICAS IMPLICADAS NA SINALIZAÇÃO NUTRICIONAL	11
1.3 FOXO	14
1.4. OBJETIVOS	18
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
Capítulo 2: CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO cDNA DE FOXO, CICLOS DE EXPRESSÃO E EXPRESSÃO COM ANIMAIS ALIMENTADOS E NÃO ALIMENTADOS	24
2.1 RESUMO	25
2.2. INTRODUÇÃO	26
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
2.4.1 CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO cDNA DE FOXO	31
2.4.2 CICLOS DE EXPRESSÃO	38
2.4.2.1 CORPORA ALLATA	38
2.4.2.2 CORPO GORDUROSO	40
2.4.2.3. OVÁRIO	42
2.4.3 ANIMAIS ALIMENTADOS E NÃO ALIMENTADOS COM 3 DIAS DE ADULTO.	44
2.4.4 ALIMENTADAS, NÃO ALIMENTADAS E NÃO ALIMENTADAS	49

EXPOSTAS A 6 HORAS DE ALIMENTOS A 5 DIAS DE ADULTA	
2.5. CONCLUSOES	52
2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	54
CAPITULO 3: ESTUDO DA INTERFERENCIA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXO EM <i>B. germanica</i>.	57
3. RNA DE INTERFERENCIA <i>IN VIVO</i>	58
3.1 RESUMO	58
3.2 INTRODUÇÃO	59
3.3 MATERIAIS E METODOS	60
3.4 RESULTADOS E DISCUSSAO	62
3.4.1 INTERFERENCIA FOXO ANALISADAS AO QUINTO DIA DE ADULTO.	62
3.4.2 INTERFERENCIA PARA FOXO EM ANIMAIS ALIMENTADOS E NAO ALIMENTADOS ANALISADOS AO QUINTO DIA DE ADULTO	66
3.5 CONCLUSOES	72
3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	73
4. ANEXO: MATERIAL E METODOS	I

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ml	Militro
µL	Microlitros
M	Molar
Mm	Milimolar
Ng	Nanogramas
µg	Microgramas
g	Grama
g/	Grau de Liberdade
α	Nível de Significância (confiança)
U	Unidade
λ	Absorbância
UV	Ultra-Violeta
nm	Nanômetro
h	Hora
min	Minuto
seg	Segundos
rpm	Rotações por minuto
pmol	Picomol
pH	Potencial Hidrogeniônico
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
V	Volts
DO	Densidade ótica
pb	Par de Base
PCR	Reação em cadeia de polimerase (<i>Polimerase chain n</i>)
OV	Ovario
CA	Corpora Allata
CG	Corpo Gorduroso

TOR	<i>target of rapamycin</i>
IR	receptor de insulina
Vg	Vitelogenina
SIN	hidroximetilglutamil-CoA sintasa
RED	hidroximetilglutamil-CoA-reductasa
PV	Proteínas Vitelogenicas
HJ	hormônio juvenil

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2		Página
Tabela 3.1:	Nucleotídeos utilizados para amplificar o duplo RNA.	59
Tabela 3.2:	Nucleotídeos utilizados para amplificar a região utilizada para verificar a eficácia da técnica de RNAi	60

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1, 2 e 3		Página
Fig. 1.1:	Fig. 1.1: Esquema da interação de Síntese HJ pelo corpora allata (CA), e de vitelogenina (Vg) pelo corpo gorduroso (C.G)	08
Fig. 1.2:	Relação entre alimentação e desenvolvimento do ovário na <i>B. germânica</i> A. Longitude basal do oócito em fêmeas alimentadas (circulo preto) e fêmeas não alimentadas (circulo branco) durante os primeiros oito dias da vida de adulto. (Osório <i>et al.</i> , 1998). B Longitude basal do oócito em fêmeas adultas alimentadas, não alimentadas e não alimentadas tratadas com 10 µg em duas doses de HJ. (Piulachs, 1988).	10
Fig. 1.3:	Esquema com alguns dos transcritos da Via de Receptor de Insulina. (Puig and Tjian 2003)	12
Fig. 1.4:	Modelo de regulação da atividade do fator de transcrição FOXO. (Segundo Greer and Brunet, 2005).	15
Fig. 1.5:	Esquema da regulação de FOXO para IR	16
Fig. 2.1:	Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos obtidas para FOXO no organismo modelo <i>B. germânica</i> , A. temos a seqüência completa de nucleotídeos inicio em vermelho temos a	29

primeira metionina e ao final em verde temos o STOP codon. **B.** temos a seqüência da proteína para FOXO de *B. germânica*.

- Fig. 2.2** **A** Comparação das seqüências de aminoácidos pelo programa Clustal X. Em verde podemos ver os aminoácidos em comum entre um organismo e outro. **B** Esquema com porcentagens de similaridade comprando os nucleotídeos entre os organismos. 33
- Fig. 2.3** Arvore filogenética comparando a seqüência da *B. germânica* com outros organismos. A arvore filogenética foi construída usando o método de maximim-likelihood. A longitude das ramas é proporcional a diferença da seqüência. A barra representa 0.1 substituições por lugar. 36
- Fig. 2.4** Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR SIN e o controle AC (Actinas) no tecido Corpora Allata. Para ter como referencia adicionamos o perfil de produção de HJ (segundo Maestro *et al* 1994). 38
- Fig. 2.5** Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR e o controle AC (Actinas) no tecido CG. Como referencia acrescentamos os níveis de vitelogenina hemolinfatica durante o primeiro ciclo gonadotrofico. Martin *et al.*, 1995 40

Fig. 2.6	Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR e o controle AC (Actinas) no tecido Ovário. Como referencia acrescentamos o perfil da longitude basal do oocito, como medida do desenvolvimento do ovário, segundo Bellés <i>et al.</i> , 1987.	43
Fig. 2.7	Gráfico demonstrando a diferença entre a longitude basal do oocito (LOB) de animais alimentados (AL+) e animais não alimentados (AL-) de 3 dias de adulto. Medida em milímetros dos oocitos. Diferença significativa estatisticamente (<i>test-t</i> , $p < 0.0001$). Resultados com media +/- SEM	45
Fig 2.8	Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, VIT e o controle AC (Actinas) para fêmeas adultas de 3 dias de <i>B. germânica</i> sem alimento (AL-) e alimentados (AL+) no tecido corpo gorduroso	46
Fig. 2.9	Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, e o controle AC (Actinas) para animais sem alimento (AL-) e alimentados (AL+) no tecido Ovário	47
Fig. 2.10	Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, VIT e o controle AC (Actinas) para animais sem alimento (AL-) e alimentados (AL+) e não alimentadas e depois alimentadas por 6 h (AL- 6h) no tecido CG.	49

Fig. 2.11	Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, e o controle AC (Actinas) para animais sem alimento (AL-) e alimentados (AL+) e mantido sem alimento e depois alimentados no tecido Ovário	50
Fig. 3.1	Modelo de inserção da amostra de duplo RNA corresponde a idade do animal, ao primeiro dia de ninfa 6 e novamente ao primeiro dia de adulto	60
Fig. 3.2	Longitude basal do oocito (LOB) em fêmeas adultas de 5 dias de <i>B. germânica</i> tratados com DsRNA control (DsCON) e tratados com DsRNA para FOXO (DsFOXO) (<i>test-t</i> , $p < 0.0001$). 1 DsCON e 2 DsFOXO. Resultados expressados como media +/- SEM.	62
Fig. 3.3	Níveis de mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, Vg e actinas no CG em fêmeas adultas de 5 dias	63
Fig. 3.4	Níveis de mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, Vg e actinas no OV em fêmeas adultas de 5 dias	64
Fig. 3.5	Valores de LOB em fêmeas adultas de 5 dias de <i>B. germânica</i> alimentadas (AL+) ou não alimentadas (AL-) e tratadas com dsRNA para FOXO (DsFOXO) ou com dsRNA controle (DsCON). Resultados expressados como media +/- SEM. 1-DsCON AL-, 2-DsFOXO AL-, 3-DsCON AL+, 4-DsFOXO AL+	66
Fig 3.6:	Níveis mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, Vg	68

e actinas no CG de fêmeas adultas de B. germânica de 5 dias DsCON e DsFOXO e alimentados e não alimentados.

Fig 3.7

Níveis mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, e actinas no OV de fêmeas adultas de B. germânica de 5 dias DsCON e DsFOXO e alimentados e não alimentados

69

APRESENTAÇÃO

A *Blattella germanica* se caracteriza por ser um inseto com um aspecto repugnante para o ser humano, e como importante disseminadora de organismos patogênicos, como: bactérias (salmonelas), vírus e protozoários, responsáveis por doenças como cólera, difteria, diarreia, toxoplasmose, herpes, gastroenterocolites, lepra, pneumonia, intoxicação alimentar, infecções respiratórias. Habitualmente associadas a más condições de higiene, este inseto pode estar presente nos mais diversos ambientes, infestando os mais diferentes pontos. A maioria vive em regiões tropicais, porém podem ser encontrados nos mais diversos lugares do mundo (pólo norte e pólo sul), devido a sua grande capacidade de adaptação, prova deste fato e que alguns fósseis mostram que as baratas existem a mais de 300 milhões de anos. São citadas mais de 3500 espécies de baratas, sendo que somente 1% do total de espécies é descritas como praga urbana. Devido a sua importância no cenário mundial, e sua existência em quase todos os lugares do mundo nosso trabalho foi desenvolvido para possibilitar um maior conhecimento da estrutura fisiológica e genética da *Blattella germanica*.

O presente trabalho foi desenvolvido em três capítulos, sendo que o primeiro relata os aspectos gerais dos fatores FOXO, “target of rapamycin” (TOR), “receptor de insulina” (IR), S6K, “vitelogenina” (Vg), “hidroximetilglutamil-CoA sintase (SIN) e “hidroximetilglutamil-CoA-reductase (RED), e aspectos gerais da fisiologia e estrutura do animal estudado. O segundo capítulo mostra os resultados obtidos, por meio da seqüência realizada, clonando e caracterizando os homólogos do Fator de transcrição FOXO, em *B. germanica*, com a finalidade de descrever sua função. Neste capítulo também medimos os níveis de expressão de FOXO e outros fatores relacionados com as vias de sinalização nutricional, em tecidos implicados na função reprodutiva de fêmeas de *B. Germânica* (corpora allata, corpo gorduroso, e ovário). Estudamos os níveis de expressão desses fatores em indivíduos expostos a alimento e não expostos, com a finalidade de verificar os processos de regulação que ocorre, nessas situações, no primeiro ciclo gonodotrófico da fêmea adulta da *B. germanica* via técnicas de RT-PCR e southern blot, assim como realizamos uma análise com animais ao terceiro

dia de adulto em suas condições normais e na falta de alimento, esse mesmo experimento foi realizado com animais ao quinto dia de adulto com animais alimentados, não alimentados, e não alimentados por 5 dias de adulto e expostos a comida por seis horas. O material biológico utilizado foram adultos de *B. germanica* de 0 a 7 dias. O terceiro capítulo mostra os resultados obtidos pela técnica de RNAi interferência utilizando uma fita dupla de RNA do transcrito FOXO, para o seu silenciamento e assim mediante a técnica de interferência do RNA (RNAi), estudar a função da proteína FOXO em relação aos processos reprodutivos, analisando os fenótipos provocados pela interferência, podendo analisar não somente a sua função no organismo estudado como também verificar se existe alguma outra ligação entre a sua transcrição e a dos outros fatores estudados target of rapamycin (TOR), receptor de insulina (IR), S6K, vitelogenina (Vg), ao quinto dia de adulto da fêmea adulta da *B. germanica*.

CAPITULO 1:

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXO E A SINALIZAÇÃO NUTRICIONAL NA REPRODUÇÃO PARA O ORGANISMO *Blattella germanica*.

1.1 OS INSETOS COMO MODELO PARA ESTUDOS DOS SINAIS NUTRICIONAIS

A *Blattella germanica* foi inicialmente descrita por Linnaeus, (1767) a partir de espécies coletadas na Dinamarca como *Blatta germanica* e posteriormente o gênero foi mudado por Caudell em 1903. (Cornwell 1968).

Essas baratas possuem um tamanho pequeno (1,5 a 3,0 cm de comprimento), coloração castanho-amarelada com duas faixas longitudinais mais escuras no pronoto, com machos e fêmeas inteiramente alados. Seu ciclo de vida pode ser completado em 100 dias de vida sob condições favoráveis de desenvolvimento. As fêmeas são ovíparas e carregam a ooteca (resultante do alargamento do 7° esternito abdominal) até quase o momento da eclosão das ninfas produzindo de 4 a 8 ootecas durante sua vida. Dentro de cada ooteca existem de 24 a 28 embriões que se desenvolvem em aproximadamente 28 dias. A ooteca é delgada, com a base e parte superior paralelas, de coloração marrom clara e medindo cerca de 8mm de comprimento, com denteações distintas contornando cada um dos ovos (Bennett *et al.*, 1996).

A fêmea pode produzir sua primeira ooteca aos 10 ou 11 dias de idade do estágio adulto reduzindo consideravelmente sua alimentação alguns dias antes da eclosão das ninfas. Uma nova ooteca é formada em duas semanas após a eclosão das ninfas (Bennett *et al.*, 1996)

As baratas são onívoras e segundo Brenner (1995), as peças bucais mastigadoras permitiram uma adaptação mais rápida á evolução das fontes de alimentos. A alimentação e seleção do alimento envolve quimiorreceptores a qual estão localizados nas antenas e partes das peças bucais. As baratas preferem dietas ricas em carboidratos a dietas ricas em gorduras e proteínas (Cornwell, 1968) e o canibalismo pode ocorrer quando a população é exposta a deficiências nutricionais.

Segundo o tipo de metamorfose que apresentam, os insetos podem ser divididos em três grupos. Os insetos que não passam por metamorfose é por isso se denominam ametabolas. As formas imaturas desses insetos são

morfologicamente idênticas a sua forma adulta, a única exceção de que não possuem genitália funcional. Outro grupo representado pelos insetos que passa por uma metamorfose incompleta, os hemimetabolos, cujas formas imaturas, denominadas ninfas, apresentam morfologia muito similar a da sua forma adulta. As ninfas não possuem genitália funcional, e suas asas somente se transformam em asas funcionais durante a transição para a forma adulta. Por último, os insetos com metamorfose completa, os holometabolos, que apresentam os quatro estágios de desenvolvimento morfológico diferenciados: embrião, larva, pupa e adulto. A peculiaridade desses animais é que larvas e adultos ocupam nichos ecológicos diferentes e, assim não competem pelos mesmos recursos alimentícios, o que permite a estes animais colonizar novos habitats e diversificar rapidamente. Seu êxito é tal que o número de espécies de insetos holometabolos é maior que o resto do que as demais espécies de animais, plantas e fungos juntos.

De acordo com as estratégias reprodutivas, os insetos podem ser divididos em autogênicos, conseguem iniciar ou ter seu primeiro ciclo reprodutivo sem a necessidade de comer, utilizando somente suas reservas e anautogênicos, que necessitam se alimentar para ter seu primeiro ciclo reprodutivo. Estes termos foram primeiro em 1929 por Rouboud, logo depois muitas espécies de mosquitos foram caracterizadas baseadas nesse tipo de estratégia reprodutiva (Vinogradova, 1965; Rioux *et al.*, 1975).

Junkum *et al.*, (2003), realizaram estudos com *Aedes togoi*, que possuem os dois modelos de reprodução, autógeno e anautogeno, analisando várias características como as taxas de reprodução, de oviposição, de desenvolvimento do embrião, a facilidade com que o embrião rompe o ovo, as dimensões do ovo, as dimensões das asas tanto de machos como de fêmeas, a longevidade entre machos e fêmeas e a quantidade de ovos depositados para verificar diferenças entre um modelo e outro de reprodução. Os resultados mostraram que a diferença mais significativa entre as subcolônias está na quantidade de ovos depositados, que é mais baixa em autógenos que em anautogenos o que representa uma desvantagem deste tipo de reprodução.

Comparações matemáticas entre estes dois modelos de reprodução demonstraram suas vantagens e desvantagens. Tsuji *et al.*, 1990,

analisaram, matematicamente os tipos de reprodução e verificaram que os autógenos tem mais vantagens do que os anautógenos, com relação ao tempo de busca de um hospedeiro, quantidade de ovos da primeira oviposição autógena que é maior do que na oviposição anautógena e quanto a taxa de sobrevivência, que nos anautógenos é baixa. Com base nesses resultados não se pode generalizar o melhor modelo de reprodução e sim dizer que, dependendo de variáveis, um modelo pode ser mais eficaz do que o outro.

Um fator importante no estímulo para desenvolvimento, são os determinantes genéticos, são importantes estímulos para o desenvolvimento em determinadas espécies de mosquitos. Analisando alguns experimentos *cross breeding*, entre cepas de autógenos e anautógenos de *Culex pipiens*, verifica-se que em esses mosquitos possuem múltiplos genes que são responsáveis por conferir uma tendência autogênica ou anautogênica, apesar desses genes ainda não se encontrarem totalmente identificados (Spielman, 1957).

Um importante processo fisiológico na reprodução dos insetos é a vitelogênese, com síntese em larga escala e secreção de proteínas vitelogenicas (PV) no corpo gorduroso e seu acúmulo nos oócitos em crescimento. Os principais genes de PV ativados durante a vitelogênese são: vitelogenina (Vg), Carboxipeptidase vitelogenica (Vcp), Catepsina B vitelogenica (Vcb) e Lipoforina (Lp). A Vg é a proteína que mais se expressa e se acumula nos oócitos, servindo como uma reserva nutricional para o desenvolvimento dos embriões (Raikhel *et al.*, 2002).

O hormônio juvenil (HJ) é uma molécula de natureza sesquiterpenoide, e determina o fenótipo das correspondentes mudas nos insetos. As mudas são determinadas por hormônios do tipo esteroíde, mas em presença de HJ, a muda dá lugar a novas formas imaturas, sendo que em sua ausência inicia-se a metamorfose em insetos holometabolos ou na muda imaginal dos hemimetabolos (Riddiford, 1993, 1994, 1996). O HJ é sintetizado em uma glândula chamada corpora allata (CA). Esta glândula esta situada na porção retro cerebral, unida ao cérebro por nervos.

Em fêmeas adultas da maioria dos insetos, o HJ é o maior controlador da reprodução e regula, entre outros, o processo de expressão da Vg no

corpo gorduroso e a incorporação de Vg nos oocitos em crescimento (Wyatt and Davey, 1996; Engelmann, 1983; Bellés, 2004). (Fig.1.1)

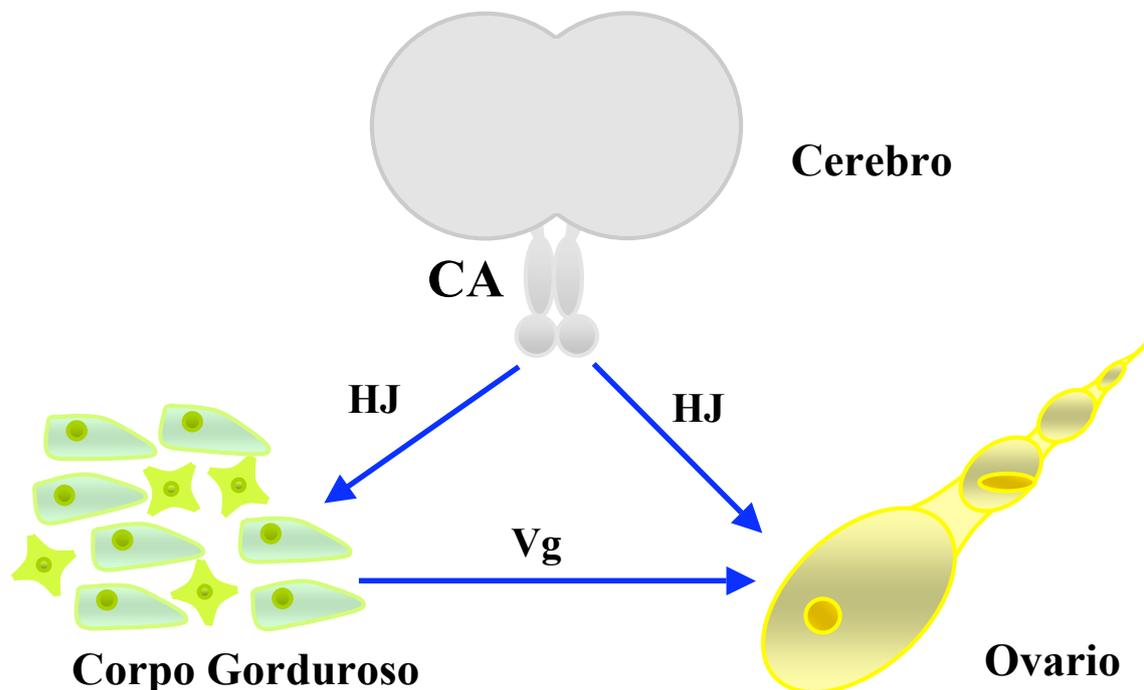


Fig. 1.1: Esquema da interação de Síntese HJ pelo corpora allata (CA), e de vitelogenina (Vg) pelo corpo gorduroso (C.G).

Baratas (Dictyoptera) são um clássico modelo de estudo de vitelogênese, dependente de HJ. Com a extração de CA não há síntese de HJ, e conseqüentemente bloqueia a produção de Vg, e o crescimento dos oocitos e ooteca. Essas fêmeas quando tratadas com HJ, reverte-se o processo e recupera-se o crescimento dos oocitos (Weaver and Edwards, 1990, Piulachs, 1988).

Na barata *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blatellidae), depois da muda imaginal, os CA das fêmeas começam sintetizar o HJIII, característico

das baratas e da maioria dos insetos (Maestro *et al.*, 1994, Camps *et al.*, 1987). O HJIII ativa a produção de Vg no CG, a qual é liberada na hemolinfa e incorporada aos oocitos. Além disso, o HJ induz o processo de patência nos oocitos, com abertura de espaços entre as células foliculares, que permite a incorporação de Vg e outras proteínas vitelogenicas aos oocitos para seu crescimento.

Ao finalizar o ciclo gonadotrófico que dura entre 7 e 8 dias a síntese de HJ baixa e cessa a produção de Vg, e os oocitos são depositados em uma ooteca, a qual é transportada durante o desenvolvimento dos embriões, de aproximadamente 15 dias. Durante todo esse tempo de transporte da ooteca os CAs, permanecem inativos. Logo depois da eclosão das ninfas recomeça o processo reprodutivo com uma nova síntese de HJ, produção de Vg e crescimento de um novo ciclo de oocitos.

Experimentos realizados com a *B. germanica* confirmam que é um inseto anautogênico, ou seja se não comer não se desenvolvem os oocitos (Osório, 1998) (Fig.1.2A). Experimentos realizados com *B. germanica* confirmam que quando esta espécie não se alimenta, porém recebe tratamento com HJ, os oocitos desenvolvem normalmente (Piulachs, 1988) o que demonstra a ligação da alimentação com a produção de HJ (Fig. 1.2B) . Por esses resultados fazemos da *B. germanica* um bom modelo para se estudar a relação entre sinais nutricionais e reprodução.

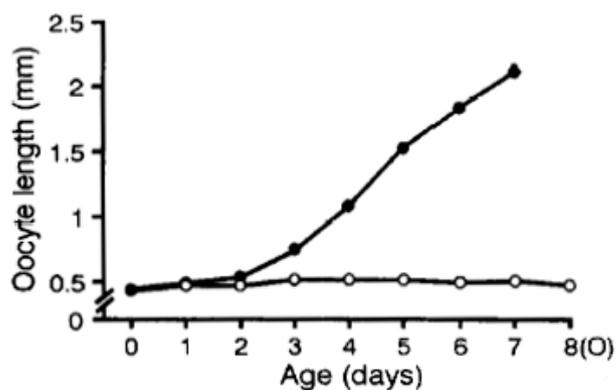
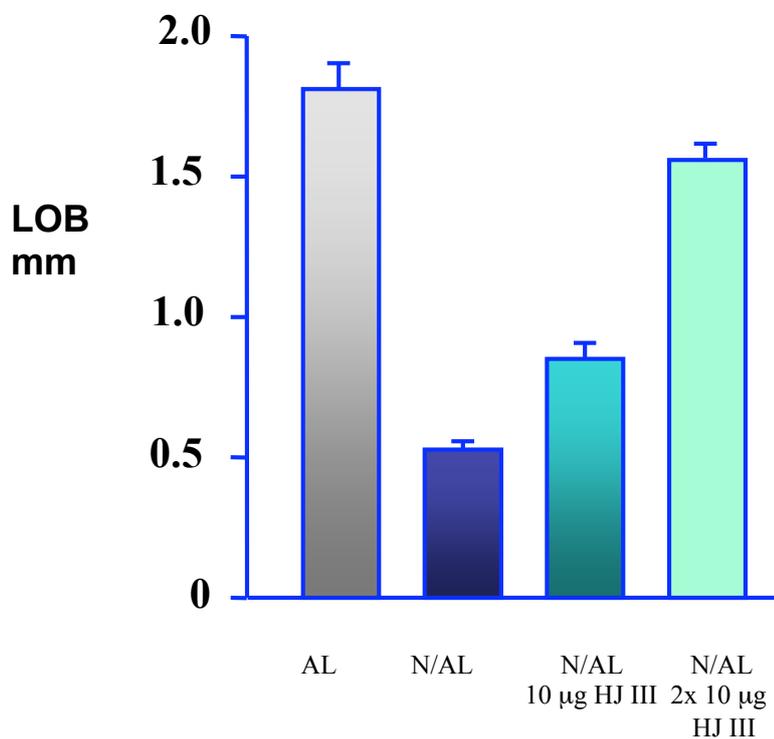


Fig. A



AL: Alimentados N/AL: Nao Alimentados.
 N/AL 10 µg HJ III: Nao alimentados com introdução de HJ.
 N/AL 2 x 10 µg HJ III: Nao alimentados com introdução de HJ.

Fig.B

Fig.1.2: Relação entre alimentação e desenvolvimento do ovário na *B. germânica* **A.** Longitude basal do oocito em fêmeas alimentadas (circulo preto) e fêmeas não alimentadas (circulo branco) durante os primeiros oito dias da vida de adulto. (Osório *et al.*, 1998). **B** Longitude basal do oocito em

fêmeas adultas alimentadas, não alimentadas e não alimentadas tratadas com 10 µg em duas doses de HJ. (Piulachs, 1988).

1.2 VIAS METABOLICAS IMPLICADAS NA SINALIZAÇÃO NUTRICIONAL

Durante o desenvolvimento de organismos multicelulares, o crescimento é regulado pelo controle do número e tamanho celular para que se obtenha apropriadas dimensões, de acordo com cada organismo. Muitos estudos indicam que o crescimento e a proliferação são coordenados por processos distintos. O crescimento do organismo é controlado pela coordenação entre a progressão do ciclo celular e sobrevivência, que é modulado por quantidades de nutrientes, fatores de crescimento e temperatura. A função reguladora primária do crescimento em mamíferos é mediada por hormônios de crescimento produzidos pela glândula pituitária. Estes hormônios induzem a expressão de fatores de crescimento insulin-like 1 e 2 em tecidos, (IGF1 e IGF2) ligam e ativam IGF receptor (IGFR1). A eliminação da função de IGF1 ou IGF2 ou o seu correspondente receptor resulta em atraso do crescimento e, também, redução do tamanho corporal.

Em *Drosophila* o receptor de insulina (IR) regula o crescimento celular e a proliferação via (fosfoinositol-3-Kinase) (dPI3K/dAkt). Perda da função ou mutações em genes que codificam InR, chico (IRS em *Drosophila*), dp110PI3K ou o SH2 adaptador dp60 e PKB causam um fenótipo muito similar entre eles, para o crescimento. (Brogiolo *et al.*, 2001; Verdu *et al.*, 1999; Weinkove *et al.*, 1999).

A ativação gênica e reprodução tem sido bastante estudados nos insetos e os resultados indicam que estes processos passam pela ativação da via do IR e, também, pela ativação da via do gene “*target of rapamycin*” (TOR). Ambas as vias estão correlacionadas e sabe-se que realizam uma ponte entre o estado larval, a ativação metabólica e o crescimento das células (Brogiolo *et al* 2001, Ikeya. *et al* 2002, Zhang *et al.*, 2000).

De acordo com Teleman *et al.*, (2005); em estudos com *Drosophila*, observou que a quinase TOR é ativada em presença de suficientes nutrientes, fosforilando S6K, dirigindo a síntese protéica e facilitando o

crescimento. Em adição, a Akt, também chamada PKB, media a fosforilação de uma efetiva chave transcrricional do sinal de Insulina, FOXO, que se mantém inativo por restrição no citoplasma. Em contraste, em condições de falta de nutrientes, a não fosforilação de FOXO o transporta para o núcleo realizando sua transcrição que incluem a alta regulação de 4E-BP, com controles de mobilização de lipídios.

A figura 1.3, um esquema com alguns transcritos implicados na tradução do sinal nutricional e suas prováveis funções e ligações entre os mesmos.

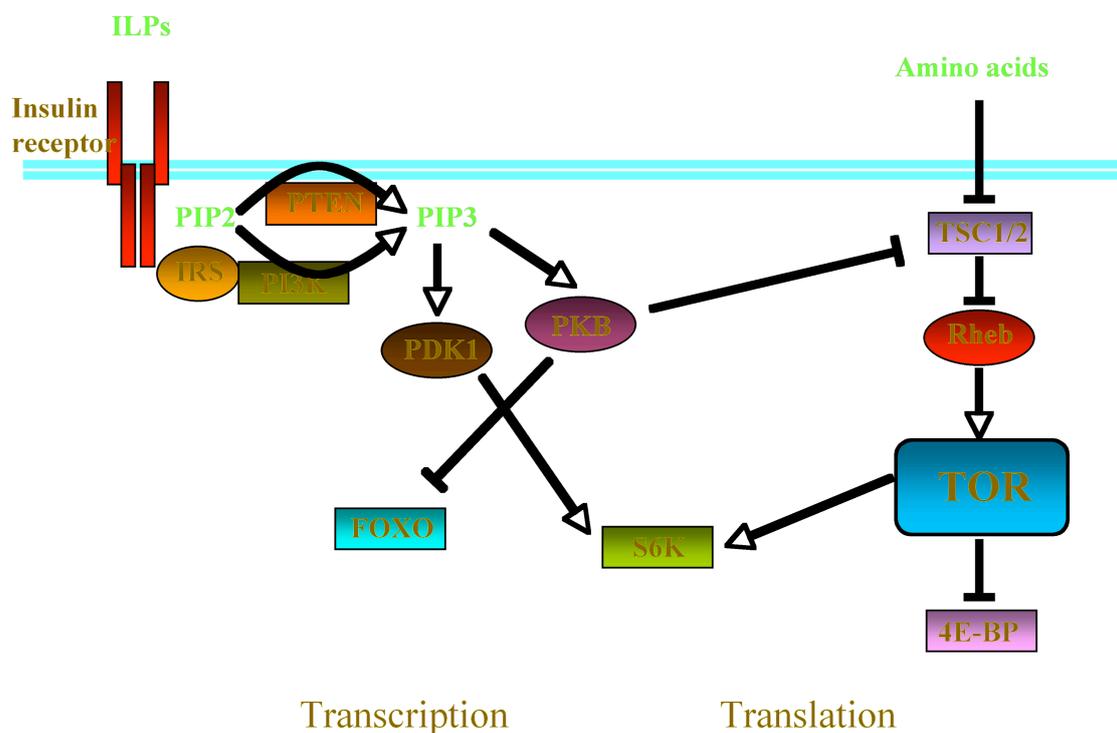


Fig. 1.3: Esquema com alguns dos transcritos da Via de Receptor de Insulina. (Puig and Tjian 2003).

A TOR é um fator que as células utilizam para sensibilidade nutricional, uma proteína quinase que media diversos efeitos sobre o metabolismo celular incluindo síntese protéica, importe de aminoácidos, biogênese ribossômica e autofagia (Raught., 2001; Schmelzle and Hall., 2000).

A proteína TOR é altamente conservada e sua região C-terminal mostra significativa conservação entre espécies relativamente distantes como *Sarcharomyces cerevisiae* e *Aedes aegypti*. TOR também está caracterizado no papel como nutriente sensor nos animais primitivos monocelulares como leveduras, assim como em insetos e vertebrados, e também integra sinais de receptor de insulina e insulina-like fator de crescimento como sinal nutricional (Hansen *et al.*, 2004).

S6K é fosforilado e ativado por TOR mas também requer fosforilação por PI3K e outras quinases para total atividade. Em *Drosophila*, S6K tem sido descrito como um importante regulador positivo do tamanho celular e corporal. Mostrou-se letal quando inativado na fase embrionia, e na fase adulta a inativação de S6K produziu tamanho corporal reduzido e um decréscimo no tamanho e numero de células, assim como em fêmeas estéreis (Montagne, *et al.*, 1999). Em células de *Drosophila*, se expressa uma simples proteína S6K (dS6K), entretanto, células de mamíferos expressam duas formas dessa quinase, S6K1 e S6K2 (também conhecidas como S6K α e S6K β , respectivamente)(Ruvinsky and Meyuhas, 2006)

1.3 FOXO

As proteínas FOXO pertencem a um subgrupo da família dos fatores de transcrição Forkhead, características por possuírem o domínio “forkhead box” que em humanos contem mais de 100 membros classificados de FOXA ate FOXR, com base na similaridades das seqüências. Essas proteínas possuem diversas funções, como por exemplo, FOXE3 e necessário para o desenvolvimento dos olhos e a FOXP2 tem um papel na aquisição da linguagem. Membros da classe “O” tem como característica fazer parte da regulação da via Insulina/PI3K/AKT.

A família FOXO foi inicialmente identificada em humanos por tres membros dessa família, FOXO1/FKHR, FOXO3/FKHRL1 E FOXO4/AFX, ligados a translocações cromossomais em tumores (Parry *et al.*, 1994; Borkhardt *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1998). Estes dados podem sugerir que fatores de transcrição FOXO tem um papel importante no crescimento e desenvolvimento de tumores. Os Invertebrados possuem somente uma proteína da família FOXO denominado Daf 16, identificado em *C.elegans*, e dFOXO em *Drosophila*.

O fator de transcrição FOXO é um dos principais substratos da proteína quinasa Akt em resposta à estimulação celular por fatores de crescimento ou insulina. Em presença de insulina e fatores de crescimento, a proteína FOXO é fosforilada, mantendo-se inativa no citoplasma, e em ausência de fatores de crescimento, a FOXO é desfosforilada e transportada ao núcleo onde regula uma serie de genes alvos assim como, também promove o atraso do ciclo celular, resistência ao stress, ou apoptose. Em resposta ao stress, a proteína FOXO permanece localizada no núcleo permitindo uma resposta adaptativa à estimulação por stress, Fig. 1.4 (Greer and Brunet, 2005).

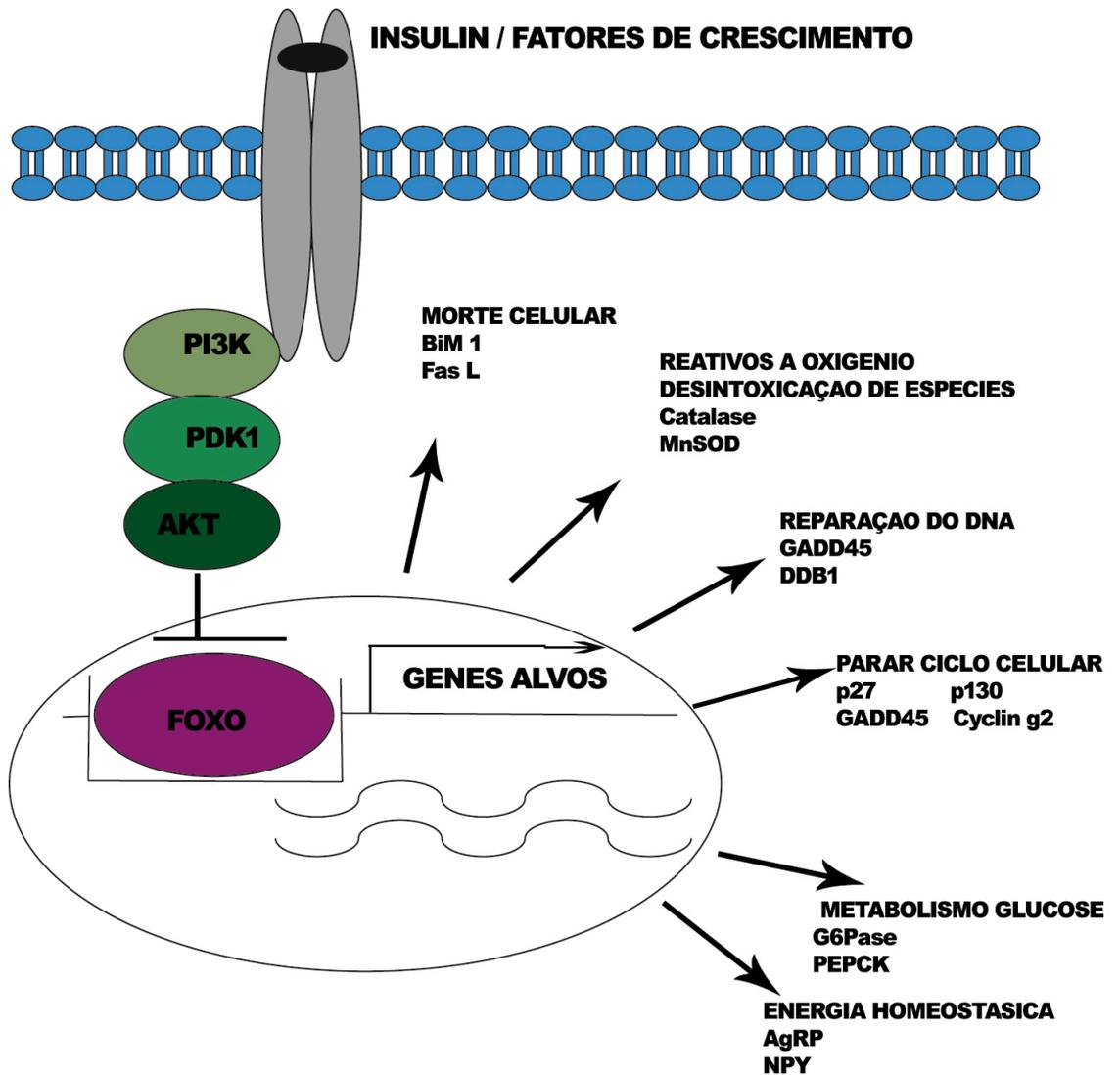


Fig. 1.4: Modelo de regulação da atividade do fator de transcrição FOXO. (Segundo Greer and Brunet, 2005).

Fatores FOXO podem iniciar apoptose pela ativação da transcrição de FasL, o ligante para a via de morte celular Faz dependente e por ativação do pré apoptótico Bcl-2 membro da família Bim. Os fatores FOXO podem promover a parada do ciclo celular, inibindo p27Kip1 para induzir G1, ou parando GADD45 para induzir G2. Também estão envolvidos, também, na resistência ao stress via auto-regulação da catalase e MnSOD. Outra de suas funções seria a reparação do DNA danificado por alta regulação de genes como GADD45 e DDB1.

Tanto em *Drosophila* ou em mamíferos, o receptor de Insulina (IR) regula sua própria síntese por um mecanismo de feedback, pela ação do

fator dFOXO/FOXO1. Em *Drosophila*, dFOXO é responsável pela ativação da transcrição de IR, e em condições nutricionais pode modular este efeito. Em *Drosophila*, uma análise demonstrou que, ocorre regulação do mRNA de IR no tipo selvagem mais não em dFOXO deficientes. Interessantemente, a insulina é capaz de reverter este efeito. Por tanto dFOXO/ FOXO 1 atua como um sensor de insulina para ativar seu sinal permitindo uma rápida resposta para o hormônio depois da alimentação pela acumulação de IR produzido durante o período de não alimentação. A via de insulina está conservada na evolução entre os metazoos, constituindo-se em exemplo de uma chave de mecanismos regulatórios envolvidos em processos que permitem a esses organismos se adaptarem a mudanças bruscas com relação a disponibilidade de nutrientes (Puig and Tjian, 2005).

dFOXO/FOXO1 regula o Receptor de Insulina

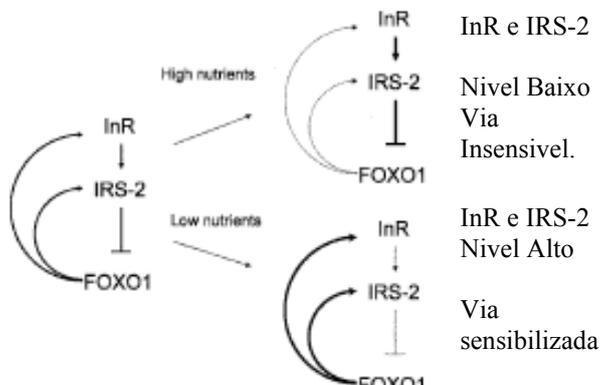


Fig. 1.5: Esquema da regulação de FOXO para IR.

A figura 1.5, apresenta um esquema do mecanismo proposto para a regulação e sensibilização da via de sinalização IR através de um mecanismo feedback, que envolve regulação de IR e IRS-2 a sensibilização por nutrientes com uma alta velocidade de resposta. Quando há nutrientes na via de IR, abaixa a atividade de FOXO 1 e os níveis de IR e IRS-2 diminuem, com o sinal vindo através do IR. Quando as condições de nutrientes mudam, FOXO1 é ativado e sensibiliza a via por ativação da transcrição de IR e IRS2.

É sugerido, também que os fatores FOX podem estar envolvidos na regulação da reprodução do mosquito. *In vitro* FOXA expressa em *Drosophila* pode-se ligar ao promotor do gene de Vg e, também, junto com outros reguladores transcricionais, pode coordenar a expressão específica de genes YPP no corpo gorduroso dos mosquitos (Kokoza *et al.*, 2001)

1.4. OBJETIVOS

Os objetivos propostos para esse trabalho, são:

- Clonar e caracterizar os homólogos do Fator de transcrição FOXO, em *B. germanica*, com a finalidade de descrever sua função.
- Medir os níveis de expressão de FOXO e outros fatores relacionados com as vias de sinalização nutricional, em tecidos implicados na função reprodutiva de fêmeas de *B. Germânica* (corpora allata, corpo gorduroso, e ovário).
- Estudar os níveis de expressão desses fatores em indivíduos expostos a alimento e não expostos, com a finalidade de verificar os processos de regulação que ocorre, nessas situações. Estudar modelos com indivíduos mantidos sem alimento e realimentados, para implementar o estudo da função fisiológica de FOXO.
- Mediante técnicas de interferência do RNA (RNAi), estudar a função da proteína FOXO em relação aos processos reprodutivos, analisando os fenótipos provocados pela interferência.

1.5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Anderson, K.E., Coadwell, J., Stephens, L.R. and Hawkins, P.T. (1998). *Curr. Biol.* **8**, pp 684-691.
- Bellés X. (2004). Vitellogenesis directed by juvenile hormone. In: Raikhel A, editor Reproductive biology of invertebrates. Progress in vitellogenesis, XII, part B: pp 157–197. Science Publisher, Inc.
- Bennet, G.W.;Owens, J.M.;Coorrigan, R.M (1996). Guia cientifica de Truman para operaciones de control de plagas. 4.ed. Trad. De Trad. De R. Ituarte. Cleveland: Advanstar Communications. 510p.
- Borkhardt, A., Repp, R., Hass, O.A., Leis, T., Harbott, J., Kreuder, J., Hammermann, J., Henn, T and Lampert, F. (1997). *Oncogene*, **14**, pp 195-202.
- Brenner, R.J. Economics and medical importance of German cockroaches. (1995) In: Rust, M.K.; Owens, J.M.; Reiersen, D.A. Understanding and controlling the German cockroach. Cambridge: Oxford University Press. pp. 77-92.
- Broggiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., and Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* **11**: pp 213-221.
- Camps F, Casas J, Sánchez FJ, Messeguer A. (1987). Identification of juvenile hormone III in the hemolymph of *Blattella germanica* adult females by gas chromatography–mass spectrometry. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **6**: pp 181-189.

- Cornwell, P.B. (1968). The cockroach: a laboratory insect and an industrial pest. London: The Rentokil Library. v.1, pp 391p.
- Engelmann, F. (1983). Vitellogenesis controled by juvenile hormone. In Endocrinology of insects, Alan R. Liss., pp 259-270.
- Greer, E., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogenes* **24**, pp 7410-7425.
- Hansen, I.A., Attardo, G. M., Park, J.H., Peng, Q., Raikhel, A.S., (2004). Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **101**, pp 10626-10631.
- Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., and Hafen, E. (2002). Nutrient-dependet expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in Drosophila. *Curr. Biol.* **12**: pp 1293.
- Junkum, A., Choochote, W., Jitpakdi, A., Leemingsawat, S., Komalamisra N., Jariyapara, N., Boonyatakorn, C. (2003). Comparative studies on the biology and filarial susceptibility of selected blood-feeding and autogenous *Aedes togoi* sub-colonies. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*.
- Kokoza, V., A. Ahmed, E.A. Wimmer & A.S. Raikhel. (2001). Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the *piggyBac* transposable element vector pBac[3xP3-EGFP afm]. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31** 1137-1143.
- Maestro, J. L., Danes M.D., Piulachs M. D., Cassier P. and Belles X. (1994). Juvenile hormone inhibition in corpora allata from ovariectomized *Blattella germanica*. *Physiological Entomology* **19**, pp 342-348.

- Montagne, J., Stewart, M., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S., and Thomas, G. (1999). Drosophila S6 Kinase: A regulator of cell size. *Science* **285**, pp 2126-2129.
- Osorio, S., Piulachs, M.D., Bellés, X. (1998). Feeding and Activation of Corpora Allata in the Cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *J. insect Physiol.* pp 31-38.
- Parry, P., Wei, Y. , and Evans, G. (1994). *Genes Chromosomes Cancer*, **11**: pp 79-84.
- Piulachs M.D. (1988). Accion gonadotrofica de la hormona juvenile en hembras de *Blattella germanica* alactectomizadas o sometidas a ayuno prolongado. *Miscel.lania Zoologica (Barcelona)* **12**, pp 121-124.
- Puig, O. and Tjian, R. (2005). Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes & dev.* **19**: pp 2435-2446.
- Raikhel, A.S., Kokoza, V.A., Zhu, J., Martin, D., Wang, S.F., li, C., Sun, G., Ahmed, A., Dittmer, N., Attardo, G., (2002). Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, pp 1275-1286.
- Raught, B., Gingras, A. C. and Sonenberg, N. (2001). The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: pp 7037-7044.
- Riddiford, L.M. (1993). The development of *Drosophila melanogaster*. Hormones and *Drosophila* Development. pp 899-939.
- Riddiford, L.M., (1994). Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect Physiol.* **24**, pp. 213–274.

- Riddiford, L.M., (1996). Juvenile hormone: the status of the “status quo” action. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **32**, pp. 271–286.
- Rioux, J.A., Crost, H., Pech-Perieres, J., Guilvad, E., Belmonte, A., (1975). L'autogenese chez le moustique commun *Culex pipiens*. *Ann Parasit. Hum. Comp.* **50**, pp 134-140.
- Ruvinsky, I. and Meyuhas O. (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Biochem. Sciences.*
- Schmelzle, T. and Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**: 253-262.
- Spielman, A., (1957). The inheritance of autogeny in the *Culex pipiens* complex of mosquitoes. *Am. J. Hyg.* **65**, 404-425.
- Teleman, A.A., Chen, Y.W., and Cohen, S.M. (2005). 4E-BP function as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes & dev.* **19**: 1844-1848.
- Tsuji, K., (1990). Reproductive division of labour related to age in the Japanese queenless ant, *Pristomyrmex pungens*. *Anim. Behav.* **39** :843–849
- Verdu, J., Buratovich, M.A., Wilder, E.L., and Birnbaum, M.J. (1999). Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in *Drosophila* by Akt/PKB. *Nat. Cell Biol.* **1**: 500-506.
- Vinogradova, E.B., (1965). Autogenous development of ovaries in blood-sucking mosquitoes. *Zoologische Zhurnal* **44**, 210-219.
- Zhang, P., Zhang, X., Iwama, A., Yu, C., Smith, K.A., Mueller, B.U., Narravula, S., Torbett, B.E., Orkin, S.H., Tenen, D.G., (2000). PU. 1

inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood* **96**, 2641-2648.

Weaver and Edwards, (1990). R.J. Weaver and J.P. Edwards, The role of the corpora allata and associated nerves in the regulation of ovarian cycles in the oviparous cockroach *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* **36**, pp. 51–59.

Weinkove, D., Neufeld, T.P., Twardzik, T., Waterfield, M.D., Leever, S.J., 1999. Regulation of imaginal disc cell size, cell number and organ size by *Drosophila* class I(A) phosphoinositide 3-Kinase and its adaptor. *Curr Biol* **9**: 1019-1029.

Wyatt, G.R. and Davey, K.G., 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Adv. Insect Physiol.* **26**, pp. 1–155

CAPITULO 2:
CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO cDNA DE FOXO,
CICLOS DE EXPRESSÃO E EXPRESSAO COM ANIMAIS
ALIMENTADOS E NAO ALIMENTADOS

2.1 RESUMO

A barata *Blattella germanica* é um clássico modelo de estudo de vitelogeneses dependente HJ os experimentos realizados com este inseto confirmam que é um inseto anautogenico, sendo que se este não come não se desenvolve seus oocitos Esse animal possui um período de 8 dias como adulto no qual ocorrem transformações reprodutivas, como crescimento dos oocitos e maturação dos mesmo assim como mudanças na alimentação na *B. germânica*. Tanto a expressão gênica como a reprodução vem sendo bastante estudados nos insetos e os resultados indicam que estes processos passam pela ativação da via do IR e, também, pela ativação da via do gene “target of rapamycin” (TOR). Ambas as vias estão correlacionadas e sabe se que realizam uma ponte entre o estado larval a ativação metabólica e o crescimento das células. O fator de transcrição FOXO e um dos principais substratos da proteína quinasa Akt em resposta a estimulação celular por fatores de crescimento ou insulina. Com a clonagem de FOXO em *B. germânica*, com o objetivo obter a seqüência completa e de estudar sua regulação por transcrição, realizamos ciclos de expressão de mRNAs para diferentes tecidos e diferentes fatores da via de insulina FOXO, “target of rapamycin” (TOR), “receptor de insulina” (IR), S6K, “ vitelogenina” (Vg), “hidroximetilglutamil-CoA sintasa (SIN) e “hidroximetilglutamil-CoA-reductasa (RED) em três tecidos diferentes, corpora allata (CA), ovário (OV) e corpo gorduroso (CG), via técnica de RT-PCR e Southern Blot para quantificar a expressão, sendo que os transcritos demonstraram, diferentes padrões de expressão para os diferentes tecidos, assim também analisamos o fator alimentação para diferentes dias de adulto comprovando uma diferente expressão dos transcritos entre animais alimentados e não alimentados.

Palavras-chave: *Blattella germanica*, FOXO, TOR, IR, S6K, Vg, SIN, RED RT-PCR, Southern Blot, regulação por transcrição.

2.2. INTRODUÇÃO

O Fator de Transcrição FOXO foi primeiramente descrito em *C. elegans* como Daf-16, uma mutação que pode reprimir ou aumentar o nível de lipídeos e a longevidade, causado pela perda de Daf-2 (ortólogo de IR em *C. elegans*) (Lin *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1997). Em humanos são descritas três isoformas para FOXO: FOXO I (FKHR), FOXO 3a (FKHRLI) e FOXO4 (AFX) que controlam a homeostases da glicose em ambos tecidos peritonais e células β do pâncreas (Accili and Arden, 2004). Em *Drosophila* o gene dFOXO consiste de 10 exons, e uma proteína de 600 aa, com 27% de similaridade com a proteína FOXO 3a, e 82% idêntica em seus aminoácidos. Além disso dFOXO codifica uma proteína que contem sites conservados fosforilados PKB (Alessi *et al* 1996). O sitio destes três sites consensos PKB relativos à domínios forkhead esta conservado entre a proteína FOXO de mamíferos, DAF-16, e dFOXO de *Drosophila* (Junger *et al.*, 2003).

Os CAs são glândulas situadas na posição retro cerebral e unidas por conexões nervosas ao cérebro, ao sistema nervoso central e ao sistema nervoso gástrico. A presença de HJIII, (forma de HJ das baratas e da maioria dos insetos), durante a mudança de fases determina que a mudança produza uma nova ninfa, entretanto ausência de HJ e de uma nova ninfa essa, se transforma em adulto. Em fêmeas adultas o HJ ativa a produção de Vg no CG e sua absorção nos oocitos para seu crescimento

A função do CG é armazenar e metabolizar proteínas durante a maioria dos ciclos vitais. As proteínas vitelogenicas, sao processadas e secretadas, pelo CG, na hemolinfa onde são absorvidas para o desenvolvimento dos oocitos, mediado via receptor de endocitoses (Raikhel, 1992).

O OV é o órgão responsável pela reprodução e maturação dos oocitos. O HJ induz o processo de patencia nos oocitos, no qual se abrem espaços entre as células foliculares que permite a incorporação de Vg e outras proteínas vitelogenicas aos oocitos em crescimento.

De acordo com Teleman *et al.*, 2005, em estudos com *Drosophila* a quinase TOR é ativada em presença de suficientes nutrientes, fosforila S6K,

dirigindo a síntese protéica e facilitando o crescimento. Em adição a AKt media a fosforilação de uma efetiva chave transcricional do sinal de Insulina, FOXO, que se mantém inativo, por restrição, e fosforilado no citoplasma. Em condições de restrição nutricional, FOXO é desfosforilado e é transportado ao núcleo onde ativa a transcrição de diferentes fatores.

Junger *et al.*, (2003), propuseram que, em resposta ao estresse celular, como a privação de nutrientes, a proteína dFOXO de *Drosophila* está ativada e inibindo crescimento através da ação em genes alvos como 4E-BP. Gershman *et al.*, (2006) sugerem que dFOXO pode estar ativado em fêmeas de *Drosophila* privadas de alimento e pode estar relativamente inativado em fêmeas adultas alimentadas. Verificaram que genes alvo de dFOXO correspondem a 28% do total de genes nutrientes - dependentes, implicando dFOXO como o maior fator na regulação transcricional em resposta a nutrientes. Quando o animal se encontra em situações de restrição de nutrientes, dFOXO se encontra ativo e diminui a transcrição de peptídeos insulín-like, e a oogenese fica totalmente reprimida em todas as fêmeas. Quando as fêmeas são alimentadas, nas 12 horas primeiras horas ocorrem uma resposta rápida produzindo a secreção de insulina e a vitelogênese é ativada. Essa análise descreve uma resposta transcricional de redes metabólicas e fisiológicas entre as primeiras 12 horas.

Em fêmeas adultas de *B. germanica* não se verifica o crescimento dos oócitos quando o animal não recebe alimento e, também, foi demonstrado que esse alimento deve ter uma concentração mínima de proteína (Osorio *et al* 1998, Schal *et al.*, 1993).

2.3. MATERIAIS E METODOS

A clonagem do homólogo FOXO em *B. germanica* foi realizada pela técnica RT-PCR seguido por 5' e 3' RACE. Em primeiro lugar foram desenhados primers degenerados com base em seqüências conservadas descritas de *D. melanogaster*, *A. aegypti*, *M. sexta* e *A. mellifera*. Com a RT-PCR a partir de cDNA de células UM-BGE-1 conseguimos o primeiro clone de 240 pb, esta seqüência então foi analisada por alinhamento com outras seqüências via Blast, confirmando que se tratava de um fragmento de FOXO. A partir de esta técnica de RT-PCR, mais as técnicas 5' e 3', foram seqüenciados vários trechos ate se obter a cauda poli A. As extrações de RNA com o Kit de Sigma GenElute Mammalian Total RNA seguindo as instruções do fabricante sendo que a clonagem dos homólogos de FOXO em *B. germanica* foi realizada com PCRs, e complementadas com 5' e 3' RACE, (*Rapid Amplification of cDNA End*), seguindo instruções do 5' RACE, Version 2.0 (Invitrogen), e seguindo as instruções do 3' RACE f, Version 2.0 (Invitrogen), todas as PCRs foram realizadas com a enzima Accutaq (Sigma), segundo normas do fabricante, a partir de 2µg de RNA total obtido de células UM-BGE-1 de *B. germânica*, a eletroforese se realizou em gel de agarose 1% (p/v), preparados com tampão TBE 0,5X (Sambrook *et al.*, 1989). Todas os fragmentos de DNA conseguidos por PCR foram ligados em pSTBlue-I seguindo as instruções do pAcceptor Vector Kit (Novagen). As transformações do DNA plasmidico foram realizadas com células competentes Novablue de *E.coli* (Novagen), seguindo o procedimento descrito por Sambrook (1989).

A purificação do DNA plasmidico se realizou seguindo as instruções de Gen Elute Plasmid Miniprep KIT (SIGMA) a partir de cultivos líquidos incubados overnight a 37°C com agitação constante (250 r.p.m).

O sequenciamento do DNA se realizou com o método de terminação da cadeia de dideoxynucleotideos. Os diferentes clones foram seqüenciados em ambos os sentidos utilizando os oligonucleotideos T7 e SP6 (presentes no vetor de clonagem), assim como outros internos específicos, com o sistema ABI de sequenciamento automática por fluorescência. Estas

seqüências se realizaram no Servicio de secuenciamento de DNA do Instituto de Biologia Molecular de Barcelona do CSIC de Barcelona.

As seqüências de proteínas foram alinhadas usando Clustl X (Thompson *et al.*, 1997). As regiões divergentes ou deficientes alinhadas foram eliminadas usando Gblocks 0.9 1b (Castresana, 2000).

Depois de obter e confirmar a seqüência para FOXO passamos para a caracterização da expressão de mRNAs para os transcritos FOXO, TOR, IR, S6K, Vg, SIN e RED em três tecidos diferentes, corpora allata (CA), ovário (OV) e corpo gorduroso (CG) no primeiro ciclo gonodotrofico da fêmea adulta da *B. germanica*. As seqüências de S6K, TOR, SIN, RED, Vg e IR em *B. germanica*, foram clonadas no laboratório do CSIC, Barcelona, e cedidas pelo Prof. Jose Luis Maestro, para isso foram utilizados fêmeas de *B. germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae), Depois de extraídos os tecidos foram realizados as extrações dos ácidos ribonucléicos e sua quantificação.

Para determinar as quantidades relativas mRNAs se realizou a técnica de RT-PCR semiquantitativa. Previamente a retro transcrição o RNA foi tratado com DNasa para eliminar qualquer traço de DNA genômico. A eletroforese foi realizada seguindo instruções de Sambrook *et al.*, 1989. Logo depois foram realizados os experimentos com a técnica Southern blot seguindo instruções do fabricante Amersham Pharmacia.

Foram desenhados modelos de estudos com fêmeas *B. germanica*, no qual foram retirados os alimentos, uma ração canina, comida utilizada como alimento diário no insetario, lugar aonde e mantida a colônia de *B. germânica*, no ultimo dia de larva da *B. germanica* sendo que estes animais foram mantidos sem alimento ate o terceiro dia de adulto, tendo somente água. Ao completar 3 dias de adulto, foram realizadas as disseções dos tecidos do corpo gorduroso e ovário, estes tecidos foram congelados em freezer -80 C, e posteriormente foram realizadas extrações de RNA, e analises das expressões destes transcritos via técnicas de RT-PCR e Sourthern Blot. Apos o primeiro experimento com animais alimentados foram desenhados outros experimentos com, fêmeas de *B. germanica*, no qual os animais foram divididos em três grupos: 2 compartimentos contendo 4 animais em cada compartimento foram retirados os alimentos, no ultimo dia de larva sendo que estes animais foram mantidos sem alimento ate o quinto

dia de adulto, com somente água. O terceiro compartimento que pertence a este experimento possuía a mesma quantidade de animais sob as mesmas condições, mas com nutrientes como controles. Ao completar 5 dias de adulto, foram realizadas as dessecações dos tecidos do corpo gorduroso e ovário, pela manhã dos botes de animais alimentados e não alimentados estes tecidos foram congelados em freezer -80 C, e posteriormente foram realizadas extrações de RNA, e análises das expressões destes transcritos via técnicas de RT-PCR e Sourthern Blot. Ao terceiro compartimento foram colocados alimentos e mantidos desta maneira por 6 horas, ao final desse período foram realizadas as dessecações e análises descrita acima, para os outros animais.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSAO

2.4.1 CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO cDNA DE FOXO

Abaixo temos a seqüência para FOXO em *B. germanica*, com a pauta de leitura escolhida.

```
"TGAAGTGAGTGCGTGCTAGACTTATGTGTTATTTCTCTTCTACGAAAATTAGCACCTGTTCA  
ACCCTAGAGGGGGCGTGTTTCGTAGTTGACATTGACAGTTTTATAACATGGAACCAACGC  
TCGCTGAACTGGACTCTGGGTTTCGAGCCTCAGCAACGTGCCAGGTCGAACACGTGGCCCTTG  
CCAAGACCTGATAATTTTCGTTGATATAAAAGAGGAACCGGGGATAAAATGTCCCGGAGGGGT  
GGTTCCTCCCTTGCGGGGGTGTGATGGGCCCGGAAGGCACCCTGGCGGGCGGTCTCCAGCTGC  
CCACGGCCACCAAGAAGAACTCAAGTCGCCGCAACGCGTGGGGCAACTTGTCTATGCAGAT  
CTCATCACGCAGGCCATCACCTCCGCTCCTGAGAAGAGGCTCACGCTCTCGCAGATCTACGA  
ATGGATGGTCCAGAACGTGCCCTACTTTAAGGACAAGGGGACAGCAACAGCTCGGCCGGAT  
GGAAGAACTCCATCAGACACAACCTGTTCGTTACACAACCGCTTCATGCGCGTCCAAAATGAA  
GGCACAGGAAAATCATCCTGGTGGATGATTAACCCGGACGCCAAACCCGGAAAAGCGCTCG  
ACGCAGAGCGACTTCAATGGAGACTTCGAAAATTTGAAAAACGTTCGTGGAAGAGTCAAGAAGA  
AGGTGGATGCCTTGAGGAACGGCTTACAAGCCGCCACTGACGCTACACCGAGCCCTAGCTCC  
TCAATTTTCGGAAGGACTGGACCTGTTCCCGGATTCGCCTCTTCACAACACTAGCTTCCAATT  
GAGTCCAGATTTCCGGCCAAGGGCATCGTCTAATGCGTCCTCTTGCGGCCGGCTCTCACCTA  
TTCCGGCCGTCTGGGGGAACCCGATTGGGGGTACCTTCACCATACTGGAGGCTATGGA  
CCAGAGCAGCTGGCTGGCAACCTGGCCGAGGGGATGAAGCTTCAAGGTGGAGAGTTCCTACA  
GACTTACGGAGGCAGCAACGGGGGGCAGCAGCAGGCACAGCCCCCGCCACCCCGTACCAGC  
CGACTTACGACTTCAGTGGCGGCTCCCGCCTGGGCCAGCACGACCTGAGTACGCTCCACGCA  
GCGTCCCCTTACGGCCTCTCGCAGTGCCACCTGCACAGGATGCAGCCGTGTTTCGTGCCACTT  
ACAGCAACAGCAGCACTCGCCCGCGGGGATGTCCCCTTCGTATCCACAGTCCGAGCCGTCCC  
CAGACCCCATGAGCGGGCAGCAGCAGAACCACCGGCGCCCAGTTCATGCCGCCCCGTGCC  
TTGCGCCCTCCGCCTCCAGGGGGCAGTAACCACAGCGAGAGCCCACCGGACACCCCAACGCC  
CTCCACGATGATGGGCCAGCTCATGGGCGCCCTAAACAACAGCACACTCCTGGACGATCTTA  
ACCTCAACATCGAGACTCTCCACGGGGGCTTTGATTGCAATGTGGACGAGGTCATCAAGCAC  
GAGTTGAGCATGGACGGGAGCCTGGACTTCAACTTCTCCCAGCACAACCATCACCATAACCA  
TCACCACCAAGCGACTTCGGGAGCGGGGAGCGTCCCTCAGAACCAAGAACTGCAACAGGGCG  
TAGTCCCCCAGCAAGCGACGAGTTCTTACTCCACTACTGTGTCCACGGGGCCATCTTGGGTC
```

```
CACTAACAAACATAGAAGAAGATGTTTATCAAATATGTTGGTGACTGCATTGTGTATTGAA  
GTTGTACAATAGAAAGAGAGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA"
```

A

```
MMEPTLAELDSGFEPQQRARSNTWPLPRPDNFVDIKEEPIKCPGGVVLPCG  
GVMGPEGTLAGGLQLPTATKKNSSRRNAWGNLSYADLITQAITSAPKRLTLSQIYE  
WMVQNVFYPFKDKGDSNSSAGWKNSIRHNLSLHNRFMRVQNEGTGKSSWWMINPDAKP  
GKSARRRATSMETSKFEKRRGRVKKKVDALRNGLQAATDATPSPSSSISEGLDLFPD  
SPLHNTSFQLSPDFRPRASSNASSCGRLSPIPAVLGEPDWGSPSPYTGGYGPEQLAG  
NLAEGMKLQGGFLQTYGGSNGGQQQAQPPPPYQPTYDFSGGSRLGQHDLSLHAA  
SPYGLSQCHLHRMQPCSCHLQQQHQHSPAGMSPSPYQSEPSDPMSGQQQNPPAPQFM  
PPRALRPPPPGGSNHSESPDTPPTSTMMGQLMGALNNSTLLDDLNLNIETLHGGFD  
CNVDEVIKHELMDGSLDFNFSQHNHHHHHHQATSGAGSVPQNQELQQGVVPPQAT  
SSYSTTVSTGPSWVH.
```

B

Fig. 2.1: Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos obtidas para FOXO no organismo modelo *B. germânica*, **A.** temos a seqüência completa de nucleotídeos início em vermelho temos a primeira metionina e ao final em verde temos o STOP codon. **B.** temos a seqüência da proteína para FOXO de *B. germânica*.

O cDNA de FOXO da *B. germânica* constava de 1773 nucleotídeos e sua proteína 536 aminoácidos.

Com a ajuda do programa Clustal X, foi possível calcular as similaridades da seqüência de nucleotídeos entre *B. germanica* e os organismos *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, *Nasonia vitripennis*, *Tribolium castaneum*, *Homo sapiens*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis*, FOXO4 e FOXO1. Assim como as porcentagens dessas similaridades.

Abaixo vemos a figura com as seqüências de FOXO para *B. germanica* comparada com as outras seqüências de todos os outros organismos, assim também como as porcentagens das similaridades.

	1					50
Aedes	.MDSFGSPWP	ASPRGGLEGL	SNDGVPM	DAL	AELR..DGAF	EP.QTRARSN
Drosophila	MMDGYAQEWP	RLTH.....	TDNGLAMDQL		GGDLP	LDVGF EP.QTRARSN
Blattella	MMEPT	LA..ELDSGF	EP.QQRARSN
Nasonia	.MD.....F	AESSAM	DMSM	GGGYD	LDSGF EP.QTRARSN
TriboliumMNLNIM		EPLAELD	G.F EP.QTRARSN
HomoMAE	AP.ASPAPLS		PLEVELD	PEF EP.QSRPRSC
GallusMTPLDPYQE	VPRGSGAPRS		DGEQRAGIRA	PLGASRRRD
XenopusMAE	ALPPRSPP..		.DDVDIDPF	GP.QSRPRSC
FOXO4MD	PGNENSATEA		AAIID	LPDF EP.QSRPRSC
FOXO1MAE	AP.....		.QVVEIDPF	EP.LPRPRSC
	51					100
Aedes	TWPLPRFENF	VEPEAE			
Drosophila	TWPCPRFENF	VEPTDE			
Blattella	TWPLPRPDNF	VDIKEEP			
Nasonia	TWPCPRPDSE	PDGTG			
Tribolium	TWPLPRFENY	VEPNE			
Homo	TWPLQREFELQ	ASPAK	PSGETAADSM	IPEEEDDED	EDGGGRAGSA
Gallus	SSASPRDERR	TARGREGTRR	PPRPGTARTQ		PERPHGVKHH	KQTHTRTAER
Xenopus	TWPLQRLDSQ	GSPGK	PNSGAGEAAD	TSSMIPEED	DDYEGAASTA
FOXO4	TWPLRPEIA	NQNSE		PPEVEPDLGE	KVHTEGRSEP
FOXO1	TWPLRPEFS	QSNSATSSPA	PSGSAANPD	AAAGLPSASA	AAVSADFMSN	
	101					150
AedesS	ESNKC	SNQQL	ASAGV
DrosophilaL	DSTKASNQQL	AFG..	DSQQA
Blattella	GIKCPGG	VVLPCG	GVM GPEG TLGG
NasoniaGAVG	PGG	APKEP	CGES GSTP.PQQPS
Tribolium	EGNKCG	...L	PAAP.APTVA
Homo	MAIGGGGGSG	TLGS..GLL	EDSARVLAPG		GQDPGSGPAT	AAGLSSGGTQ
Gallus	TPAPRSGAPP	DLIAFFALHE	EGSEAPLAVG	GAAPAG	CGKAA	AAGGPEEAAR
Xenopus	TVLGTAGD..	KGTLVLLSGG		ESGQLAVLAS	PVGG.VETLQ
FOXO4	ILLP.....SRLPE		PAGGPQPGIL
FOXO1	LSLLESEDF	PQAPG	SVAAAVAAAA	AAAAT	GGLCG DFQGP
	151					200
Aedes	QSASS.....	AT	KNNSRRNAW
Drosophila	IQNAN.....	AA	KNNSRRNAW
Blattella	LQLPT.....	AT	KNNSRRNAW
Nasonia	SLLP.....	V	KNNSRRNAW
Tribolium	AIVP.....	A	KNNSRRNAW
Homo	ALLQ.....P	QQPLPPP..Q	PGAAGGSGQ.	PR	KCSS.RRNAW
Gallus	PPVPLPGGGP	EGPGPAPGGA	AAAAGGGGLS	GGGPAAAA	APR	KCSS.RRNAW
Xenopus	VSLG.....	...GEGAGGA	VSGAGGQQQ.	QR	KCSS.RRNAW
FOXO4	GAVTG.....	PR	KGGS.RRNAW
FOXO1	HPAPPQPPP	GPLSQHPPVP	PAAAGPLAQ	PR	KSSSRRNAW
	201					250
Aedes	GNLSYADLIT	QAISSAGDNR	LTLSQIYEM	VQNVPYFKDK	GDSNSSAGWK	
Drosophila	GNLSYADLIT	HAIQSATDKR	LTLSQIYEM	VQNVPYFKDK	GDSNSSAGWK	
Blattella	GNLSYADLIT	QAITSAPDKR	LTLSQIYEM	VQNVPYFKDK	GDSNSSAGWK	
Nasonia	GNLSYADLIT	QAITSAPDKR	LTLSQIYEM	VQNVPYFKDK	GDSNSSAGWK	
Tribolium	GNLSYADLIT	QAITSAPDKR	LTLSQIYEM	VQNVPYFKDK	GDSNSSAGWK	
Homo	GNLSYADLIT	RAIESSPDKR	LTLSQIYEM	VRCVPYFKDK	GDSNSSAGWK	
Gallus	GNLSYADLIT	RAIESSPEKR	LTLSQIYDWM	VRCVPYFKDK	GDNNSSAGWK	
Xenopus	GNMSYADLIT	RAIESTQDKR	LTLSQIYDWM	VRSVPYFKDK	GDSNSSAGWK	
FOXO4	GNQSYAELIS	QAIESAPEKR	LTLSQIYEM	VRTVPYFKDK	GDSNSSAGWK	
FOXO1	GNLSYADLIT	KAIESSAEKR	LTLSQIYEM	VKSVPYFKDK	GDSNSSAGWK	
	251					300

Aedes	NSIRHNLSLH	NRFMRVQNEG	TGKSSWWMLN	P.DAKPGKSV	RRRAASMETS
Drosophila	NSIRHNLSLH	NRFMRVQNEG	TGKSSWWMLN	P.EAKPGKSV	RRRAASMETS
Blattella	NSIRHNLSLH	NRFMRVQNEG	TGKSSWWMIN	P.DAKPGKSA	RRRATSMETS
Nasonia	NSIRHNLSLH	NRFMRVQNEG	TGKSSWWMIN	P.DAKPGKSA	RRRATSMETS
Tribolium	NSIRHNLSLH	NRFMRVQNEG	TGKSSWWMIN	P.DAKPGKSV	RRRAASMETS
Homo	NSIRHNLSLH	SRFMRVQNEG	TGKSSWWIIN	PDGGKSGKAP	RRRAVSMDNS
Gallus	NSIRHNLSLH	SRFIRVQNEG	TGKSSWWMIN	PDGGKVGKAP	RRRAVSMDNS
Xenopus	NSIRHNLSLH	SRFIRVQNEG	SGKSSWWMIN	PEGGKGGKAP	RRRAVSMDNS
FOX04	NSIRHNLSLH	SKFIKVHNEA	TGKSSWWMLN	PEGGKSGKAP	RRRAASMDSS
FOX01	NSIRHNLSLH	SKFIRVQNEG	TGKSSWWMLN	PEGGKSGKSP	RRRAASMDNN
	301				350
Aedes	.KYEKRRGRV	RKRVEAIRQQ	AALGLATTSL	NDATPSPSSS	VSENLDSFPE
Drosophila	.RYEKRRGRA	KKRV EALRQA	GVVG....L	NDATPSPSSS	VSEGLDHFPE
Blattella	.KFEKRRGRV	KKKV DLRNG	LQAAT....	.DATPSPSSS	ISEGLDLFPD
Nasonia	.KFEKRRGRV	KKKV EALRNG	SLQA.....	.DATPSPSSS	VSEGLDLFPD
Tribolium	.KFEKRRGRV	KKKV DLMRNG	..ALP....	.DTTPSPSSS	VSESLDLFPE
Homo	NKYTKSRGRA	AKKKAALQTA	P..ESADD..S	PS.QLSKWPG
Gallus	NKYTKSRGRA	AKKKAALQTA	Q..EASED..S	PS.QLSKWPG
Xenopus	NKYTKSRGRA	AKKASLQAS	S..DATDD..S	PS.QLSKWPG
FOX04	SKLLRGRSKA	PKKKPSVLP	PPEGATPT..S	PVGHFQKWSG
FOX01	SKFAKRSRA	AKKASLQSG	Q..EGAGD..S	PGSQFSKWP
	351				400
Aedes	SPLHSG..NF	QLSPDFRQRA	SSNASSCG.R	LSPIQSIVGI	ENTWYTPPDL
Drosophila	SPLHSG.GF	QLSPDFRQRA	SSNASSCG.R	LSPTR.AQDL	EPDWGFP...
Blattella	SPLH.NT.SF	QLSPDFRPA	SSNASSCG.R	LSPIPAVLG.	EPDWGSPS..
Nasonia	SPLHPAS.SF	QLSPDFRPA	SSNASSCG.R	LSPIPAVLS.	EPEWTPN...
Tribolium	SPIHSGT.GF	QLSPDFRPA	SSNTSSCG.R	LSPIPAVVGV	EPDWSSEFG..
Homo	SPTSRSDEL	DAWTFRSRT	NSNASTVSGR	LSPIMASTEL	DEVQDDAPL
Gallus	SPTSRSDEL	DAWTFRSRT	NSNASTISGR	LSPILASTEL	DDVQDDAPL
Xenopus	SPTSRSDEL	DTWTFRSRT	NSNASTISGR	LSPIPATTEL	DDVQDDASPL
FOX04	SPCS RNREEA	DMWTFRPRS	SSNASSVSTR	LSPLRPESE.	..VLAE EIPA
FOX01	SPGSHSNDDE	DNWTFRPR	SSNASTISGR	LSPIMTEQDD	LGEDEVHSMV
	401				450
Aedes	AELADNPDAG	QTVETELNAQ	GQAQLDQLAG	SLADDLTLHQ	TDFFKGFSON
DrosophilaVDYQ	NTTMTQAHAQ	..ALFELTG	TMADELTLCN	.QQQGFSA
BlattellaPY	TGG.....	..YGPEQLAG	NLAEGMKLQG	GEFLQTYGGS
NasoniaY	AST.....	..YSPEHRLQ	N..KNLELFG	.DLTQPQQQ
TriboliumQF	NSANYSPEMP	GNYS PDQLAG	NLEQGMKLQP	...DAYMGY
Homo	SPMLYSSAS	LSPSVSKPCT	VELPRLTDMA	GTMNLNDGLT	ENLMDLLDN
Gallus	SPMLYSSPS	LSPSVNKPCT	VELPRLTDMA	GTMNLNDGLT	DNLMDLLDN
Xenopus	SPMLYNSPGS	LSPSISKPCT	VEMPRITDMA	ETMNLNDGLP	ENLMDLLDD
FOX04	S..VSSYAGG	VPP.....TLNEGL.ELLDG
FOX01	YPPSAKMAS	TLPSLS....EISNPE	NMENLLDNLNLLSSP
	451				500
Aedes	TS..MHNQPP	FF...YQFPQPYSLHATV	AQPFQFPQQ
Drosophila	SG..LPSQPP	PPP..YQFPQ	HQQAQQQQQ	QSPYALNGPA	SG.YNTLQPQ
Blattella	NGGQQQAQPP	PPP..YQPTY	DFSGGSR LQG	HDLSTLHAAS	PY.....GL
Nasonia	PQQQAQQSG	PPSYFEAQY	QRNNALRSTT	TPYGLPPTPQ	SS.....SQ
Tribolium	INGTQPQPP	PP...YTAPY	EQFPGRRE..	..INSIHATS	PY.....GL
Homo	ITLPPSQPSP	TGGLMQRSS	FPYTCKGSGL	GSPTSSFNST	VFGPSSLNSL
Gallus	ITLPPSQSP	TGGMQRSS	FPYCKGSGL	GSPSSFNNA	VFGPSSLNSL
Xenopus	ISLTSSQSS	PGVLMQRSS	FTYCKGSGI	GSPSNFNNT	GSFNFLTSL
FOX04	LNLTS SHS..	..LLSRSGL	SGFSLQHPGV	TGPLHTYS..	...SSLFSP
FOX01	TSLTVSTQSS	PGTMMQQTPC	YSFAPPNTSL	NSPSPNYQKY	TYGQSSMSPL
	501				550
Aedes	NQCPIHRLQQ	CTCMLQNTR	ESMSFASGTG	.MSPSYPHSE	PSPD.....
Drosophila	SQCLLHRSLN	CSCMHN..AR	DGLSPNSVTT	TMSPAYPNSE	PSSD.....
Blattella	SQCHLHRMQP	CSCH..LQQ	QQHSP...A	GMSPSYPQSE	PSPDPMSSGQ
Nasonia	QRCPLHRLQP	CAC.....TQ	MQNLS....L	NMSPTYQQPE	PSPSLTSQQQ
Tribolium	SQCPIHRMIS	CSCIQVPCKV	ESMSF....A	GMSPSYPHSE	PSPD.....
Homo	RQSPMQTIQE	NKPATFSSMS	HY..GNQTLQ	DLTSDLSL	HSDVMMTQSD
Gallus	RQSPMQTIQE	NKQATFSSIS	HY..NNQTLQ	DLLASDALS	HSDVMMTQSD
Xenopus	RQSPMQTIQE	NKQATFSSMN	HY..SNQSLQ	DLLNTDTLS	HSDVLMTQSD

FOX04	AEGPLSAG..	..EGCFSS.QALE	ALLTSDT	PTPP	PADVLM	TQVD
FOX01	PQMPIQTLQD	N.KSSYGMS	QYNCAPLLK	ELLTSD	SPP.	.HNDIM	PVD
	551						600
AedesY	AMLVGARVIQ	RTPS...	ASP	PLTPST	VCNM
DrosophilaS	LNTYSNVVLD	G.....	P	ADTAAL	MVQQ
BlattellaQ	NPPAPQFMPP	R.....	A	LRPPPPGGSN	
Nasonia	SIQQYLLQQQ	QQQQQADQSQ	TQAQPQTLQ	QQQQQQQQQT	QQT	PQQQT	TQ
TriboliumPLNSQYLIN	R.....	ST	MPR	SSSP
Homo	P.....L	MSQASTAVSA	QNSRRNVMLR		NDPMS	SFAAQ
Gallus	P.....L	MSQASTAVSA	QNSRRNIMLR		NDPMS	SFAAQ
Xenopus	P.....L	MSQASTAVTA	QNSRRNIILR		NDPMS	SFAAQ
FOX04	P.....I	LSQAPTLLLL	GGLPSSSKLA	TG..	VGLCPK	
FOX01	P.....G	VAQPNSRVLG	QN....	VMMG	PNSVM	STYGS
	601						650
Aedes	VT....	ATP	QSDNSPQTLM	GQFMEALNNQ	TN.IDDLNIN	LESFPGG	LE
Drosophila	QQ....	QQQ	QQQLSASLE	GQCLEVLNNE	AQPIDEF..N	LENFPVGNLE	
Blattella	HS....	ESP	PDTPTPSTMM	GQLMGALNNS	TL.LDDLNLN	IETLHGG.FD	
Nasonia	QSQVSSGNP	PDSPIPSTMM	GQLMGALNNT	AL.LDDLNIN	IETLHG..	FD	
Tribolium	LT....	PQ	FSQGTPTSTMM	GQLMGALNNS	TV.LDDLNIN	VESFQGG.FD	
Homo	PNQGS.LVNQ	NLLHHQHQTQ	G.ALGGSRAL	SNSVSNMGLS	E.SSSLG	SAK	
Gallus	SSQGG.LVNQ	SLPHHQHQS	SSPLSGSRAL	SNSISNIGLN	D.SNSLG	SK	
Xenopus	PNQGGNLVNQ	NSLHQQ.QSL	NSFQGGSRAL	SNNLSNTGLN	D.SSILE	STK	
FOX04	PLEAP....GPSSL	VPTLSMIAP.	
FOX01	QASHNKMMP	SSHTEPHGAQ	QTSAVNGRPL	PHTVSTMPHT	SGMNRL	TQVK	
	651						700
Aedes	CNV DEVIKHE	LSMEGSLDFN	FPMSNHSTYT	PTNSS.....	
Drosophila	CNV DEVIKHE	MSYGGLLDIN	IPLATVNTNL	VNSSSGPLSI	SNISNLSNIS		
Blattella	CNVDEVIKHE	LSMDGSLDFN	FSQHNHHNH	
Nasonia	CDI DEVIKHE	LLINGTLDIN	FQNPVLPNI	GLPNIPVTD	TGIVD.....		
Tribolium	CNV ELIKHE	LSMEGSLDFN	FAN.....	
Homo	HQQQSPVSQS	MQTLSDS.LS	GSSLYSTSAN	LPVMG.....	
Gallus	HQQ.SPVNQS	MQTLSDP.LS	GSSLYSSMN	LPVMG.....	
Xenopus	HQQQSSVSHS	MQTISDT.LS	G.SLYSSGVT	LPTLG.....	
FOX04	PPVMA	SAPIPKA.LG	TPVLTTP...TEAAS	
FOX01	TPVQVPLPHP	MQMSALGGYS	SVSSCNGYGR	MGLH.....	
	701						750
Aedes	NS
Drosophila	SNSGSLSLN	QLQAQLQQQ	QQQQAQQQQ	AQQQQQQHQ	HQQQLLLNN		
Blattella	HHQAT
NasoniaQLVDTT	AAVSAH	HQAT	
Tribolium	QQQ
HomoHEK	FPSDDL	DMF	
GallusHEK	FPSDDL	DIF	
XenopusHEK	FPTDDL	DIF	
FOX04QDR	MPQDDL	DMY	
FOX01QEK	LPSDDL	MG	
	751						800
Aedes	LDSTISAIAA	TPNQATAPHN	HGQYTARTSV	T.....	
Drosophila	NNSSSSLELA	TQTATTNLNA	RVQYSQPSVV	TS.....	
Blattella	SGAGSVPQNO	ELQQGVVPOQ	ATSSYSTVTS	T.....	
Nasonia	AQAAAAAVS	NVASSNAASA	AAVYASTNAA	TPA.....A	
Tribolium	SVVPQSETIS	GITS..TQAS	APPYSTTAT	T.....	
Homo	NGSLECDMES	IIRSELMDAD	GLDFNFDSL	STQNVVGLNV	GNFTGAKQAS		
Gallus	NGSLECDMES	IIRSELMDAD	GLDFNFDSL	SAQNVVSLNV	GNFTGAKQAS		
Xenopus	NGSLECDMET	IIRNDLMDAD	GLDFNFDTLI	SAQNVV.LSV	GSFTGAKQTS		
FOX04	MENLECDMDN	IISDLMDEGE	GLDFNFEPDP	
FOX01	IERLDCDMES	IIRNDLMDGD	TLDFNFDNVL	PNQ.....	.SFP	SVKTT	
	801	807					
Aedes	PSWVH.						
Drosophila	PSWVH.						
Blattella	GPSWVH.						
Nasonia	SPSWVH.						

Tribolium	.PSWVH.
Homo	SQSWVPG
Gallus	SQSWVPG
Xenopus	SQSWVPG
FOXO4
FOXO1	THSWVSG

A

	AEDES	DROS	BLATT.	NASONIA	TRIBOLIUM	HOMO	GALLUS	XENOPS	FOXO4	FOXO1
AEDES	100%									
DROS.	48%	100%								
BLATTELLA	46%	40%	100%							
NASONIA	39%	37%	53%	100%						
TRIBOLIUM	50%	40%	59%	45%	100%					
HOMO	22%	21%	22%	22%	23%	100%				
GALLUS	19%	20%	21%	19%	20%	72%	100%			
XENOPS	21%	20%	22%	23%	23%	69%	63%	100%		
FOXO4	20%	20%	21%	20%	22%	33%	29%	33%	100%	
FOXO1	22%	20%	23%	21%	23%	41%	37%	39%	30%	100%

B

Fig. 2.2 **A** Comparação das seqüências de aminoácidos pelo programa Clustal X. Em verde podemos ver os aminoácidos em comum entre um organismo e outro. **B** Esquema com porcentagens de similaridade comprando os nucleotídeos entre os organismos.

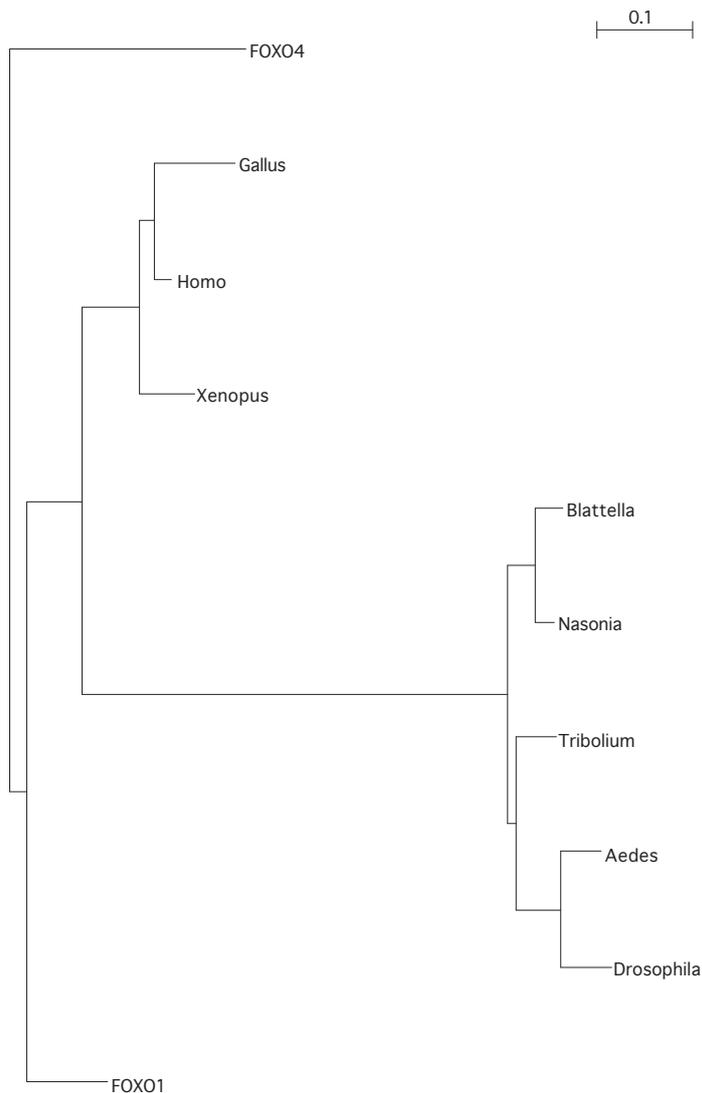


Fig. 2.3 Arvore filogenética comparando a seqüência da *B. germânica* com outros organismos. A arvore filogenética foi construída usando o método de maximim-likelihood. A longitude das ramas é proporcional a diferença da seqüência. A barra representa 0.1 substituições por lugar.

Apesar de que toda a seqüência foi realizada com cDNA de células UM-BGE 1, foram realizados também sequenciamentos nos tecidos de OV, e CG, sempre obtendo as mesmas seqüências para todos os tecidos. De todas as seqüências realizadas nunca foi notado nenhuma discrepância no anelamento das bases, deixando clara a não existência de isoformas de FOXO em *B. germânica*

A análise filogenética da seqüência obtida nos indica que esta seqüência corresponde a uma proteína da família FOXO

A obtenção da seqüência de FOXO de *B. germanica* nos permitira realizar estudos da expressão, assim também como permitira estudar a função de FOXO realizando experimentos de interferência de RNA (RNAi).

2.4.2 CICLOS DE EXPRESSAO

2.4.2.1 CORPORA ALLATA

Analisamos os padrões de expressão de FOXO, TOR, IR, S6K, e SIN e RED por RT-PCR/Southern Blot em adultos de a 0 a 7 dias, marcando sua idade a partir do primeiro dia de mudança para adulto, utilizando a comprimento basal do oocito (LOB) como medida da idade fisiológica.

Quando analisamos os resultados obtidos na *B. germanica*, observamos o mesmo padrão, sendo constante a expressão em todos os transcritos, da fig. 01, os níveis de expressão não apresentam variações significativas para os transcritos (TOR, S6K, IR, e FOXO) sem aumento ou diminuição, na fase adulta de *B. germanica*, sugerindo uma regulação pós-transcricional, destes transcritos para este tecido. Foram utilizadas como controle as actinas.

Ao contrario SIN e RED possuem um perfil muito similar ao perfil de produção de HJ. Na Fig. 2.4 vemos o perfil de produção do HJ nos CAs durante o primeiro ciclo gonadotrofico (Maestro *et al*, 1994), para poder comparar os níveis de expressão dos diferentes transcritos com o nível de atividade da glândula.

As enzimas “hidroximetilglutamil-CoA sintasa (SIN) e “hidroximetilglutamil-CoA redutasa (RED) são duas enzimas consecutivas na via de biosíntese do HJ em insetos, além de estar implicados na síntese de ubiquinona e na glicolização de proteínas, Couillaud, F. 1991, Martin, D. *et al* 1998. Além disso estas duas enzimas são consideradas chaves na via de síntese do HJ, no primeiro ciclo gonodotrofico da *B. germanica*, a expressão destas enzimas

seguem o perfil da produção de HJ, o que reforça a idéia destas enzimas serem chaves na regulação dessa via.

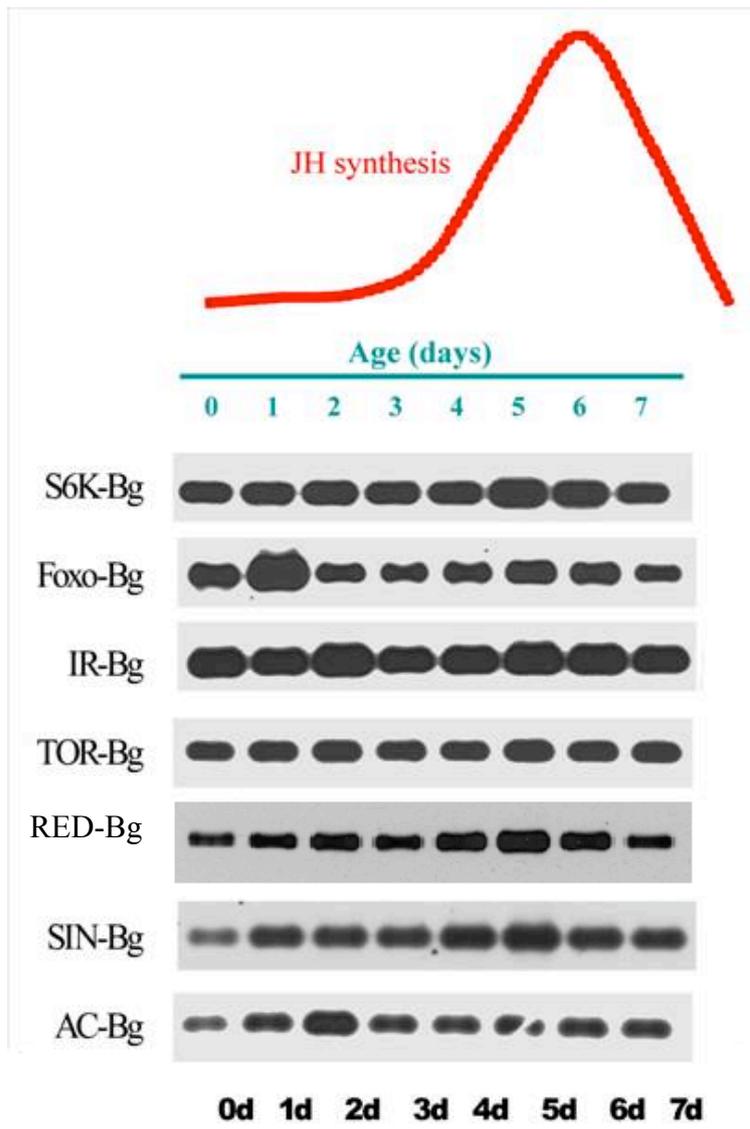


Fig. 2.4: Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR SIN e o controle AC (Actinas) no tecido Corpora Allata. Para ter como referencia adicionamos o perfil de produção de HJ (segundo Maestro *et al* 1994).

2.4.2.2 CORPO GORDUROSO

Quando analisamos os resultados obtidos na *B. germânica*, observamos o mesmo padrão, sendo constante a expressão em alguns dos transcritos analisados, os níveis de transcrição como se pode demonstrar pela Fig. 2.5, sendo os níveis de expressão similares ao da actina utilizada como controle para os transcritos (TOR, IR, e FOXO) sugerindo uma regulação pos-transcricional para estes fatores em questão neste tecido assim como no CA .

O transcrito S6K, demonstra um decréscimo significativo a partir do segundo dia de adulto, uma explicação seria uma maior sensibilidade à presença ou ausência de alimentos já que a *B. germânica*, nos seus dois primeiros dias de adulto não possuem o aparelho bucal totalmente formado, impossibilitando uma alimentação completa, deixando o animal em completa (0 dias) e parcial (1 dia) sem comida (Osorio *et al.*, 1998). Esta não alimentação por impossibilidades físicas estaria sendo notada na transcrição do fator S6K, para o tecido do CG.

Para este tecido também foi analisado a expressão do fator Vg, Como demonstra o gráfico da figura a expressão de Vg, é baixa ou quase nula ao principio do ciclo de adulto, 0 e 1 dia de adultos e vai aumentando com um pico de síntese entres os dias 5 e 6.

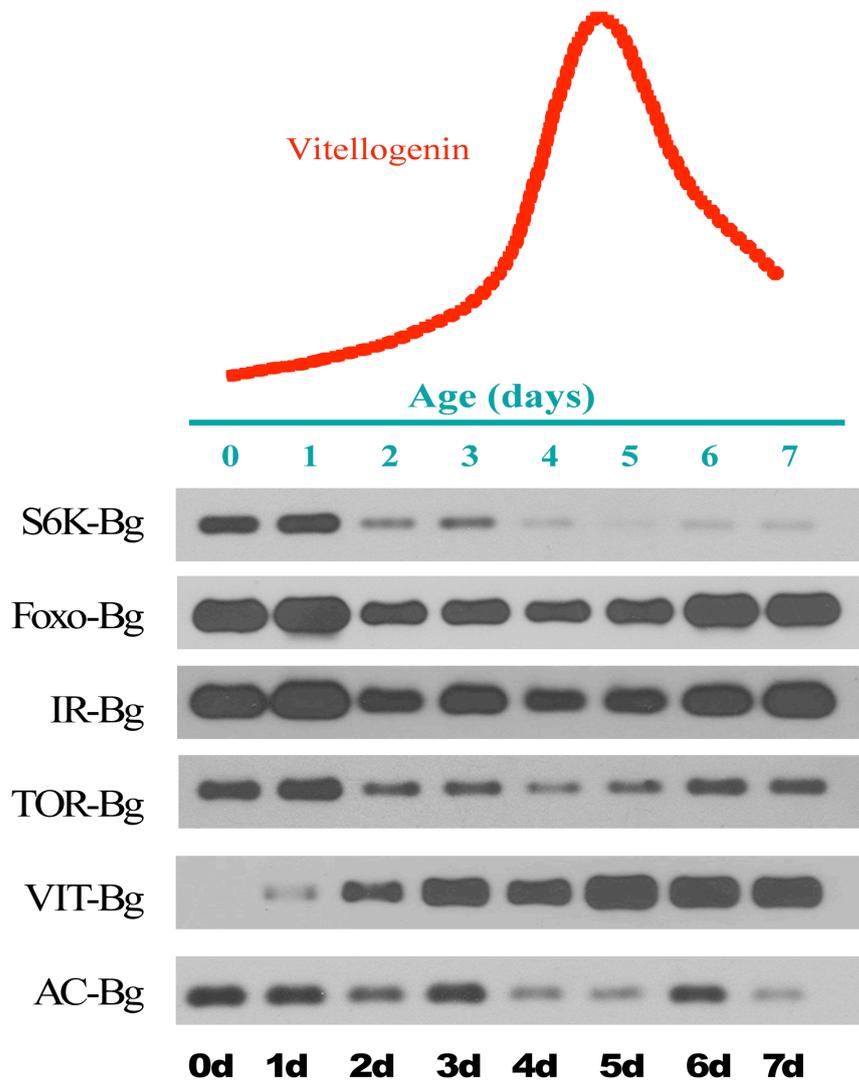


Fig. 2.5: Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR e o controle AC (Actinas) no tecido CG. Como referencia acrescentamos os níveis de vitelogenina hemolinfática durante o primeiro ciclo gonadotrófico. Martin *et al.*, 1995

2.4.2.3. OVARIO

Quando analisamos os resultados obtidos na *B. germânica*, para o tecido do OV, observamos o mesmo padrão encontrado anteriormente para os tecidos CA e CG, sendo constante a expressão em alguns dos transcritos, o nível de transcrição como se pode demonstrar pela fig. 2.6, não observamos diferenças significativas com respeito às actinas, que foram utilizadas como controles, para os transcritos TOR e IR sem aumento ou diminuição, na fase adulta de *B. germânica*, sugerindo uma regulação pós-transcricional para estes dois fatores em questão.

Tanto transcrito S6K, como o fator de transcrição FOXO foram observados um decréscimo significativo a partir do segundo dia de adulto, uma explicação para este ocorrido, como descrito anteriormente seria uma maior sensibilidade à presença ou ausência de alimentos já que a *B. germânica*, nos seus dois primeiros dias de adulto não possuem o aparelho bucal totalmente formado, o que impossibilita o animal de ser alimentado de uma forma normal, e uma ligação direta destes fatores na reprodução e alimentação com esta espécie *B. germânica*, já que em muitas outras espécies a disponibilidade de alimentos é essencial para a oogenese (Wheeler, 1996). Esta evidencia é especialmente clara nas baratas. Em alguns estudos, tem sido demonstrado que a abstinência de alimento reprime o crescimento de oócitos em *B. germanica* e *Leucophaea maderae* (Roth and Stay, 1962; Engelmann and Rau, 1965).

Em *Drosophila* S6K tem sido implicado como um importante regulador positivo do tamanho celular e corporal. Em estudos mostrou-se letal quando inativado na fase embrionica, e na fase adulta a inativação de S6K produzia tamanho corporal reduzido e um decréscimo no tamanho e número de células, assim também como fêmeas estéreis (Montagne, *et al.*, 1999). O transcrito S6K é fosforilado e ativado por TOR mais também requer fosforilação por PI3K e outras quinases para total atividade.

De acordo com Junger *et al.*, 2003, em resposta ao stress celular, como a privação de nutrientes, em *Drosophila* a proteína dFOXO está ativada e inibe o crescimento através da ação de genes alvo como 4E-BP, o que explicaria o aumento aos primeiros dias de sua transcrição, quando

ainda não comeram e uma diminuição da expressão ao longo do ciclo e a exposição a comida.

Os fatores de transcrições FOXO são um dos principais substratos da proteína quinasa Akt em resposta a estimulação celular por fatores de crescimento ou insulina, quando esta em presença de insulina e fatores de crescimento, a proteína FOXO é transportada do núcleo para o citoplasma, sendo que em ausência de fatores de crescimento FOXO é retido no núcleo e auto-regula uma série de genes alvos, assim como também promove o arrastamento do ciclo celular, resistência ao stress, ou apoptose. (Greer and Brunet, 2005). Isto não é percebido por análise de transcrição no CG, mais sim no ovário para *B. germânica*.

De alguma maneira se pode medir esse decréscimo no tecido do OV, para FOXO diferenciando nesse ponto esse tecido dos outros dois estudados.

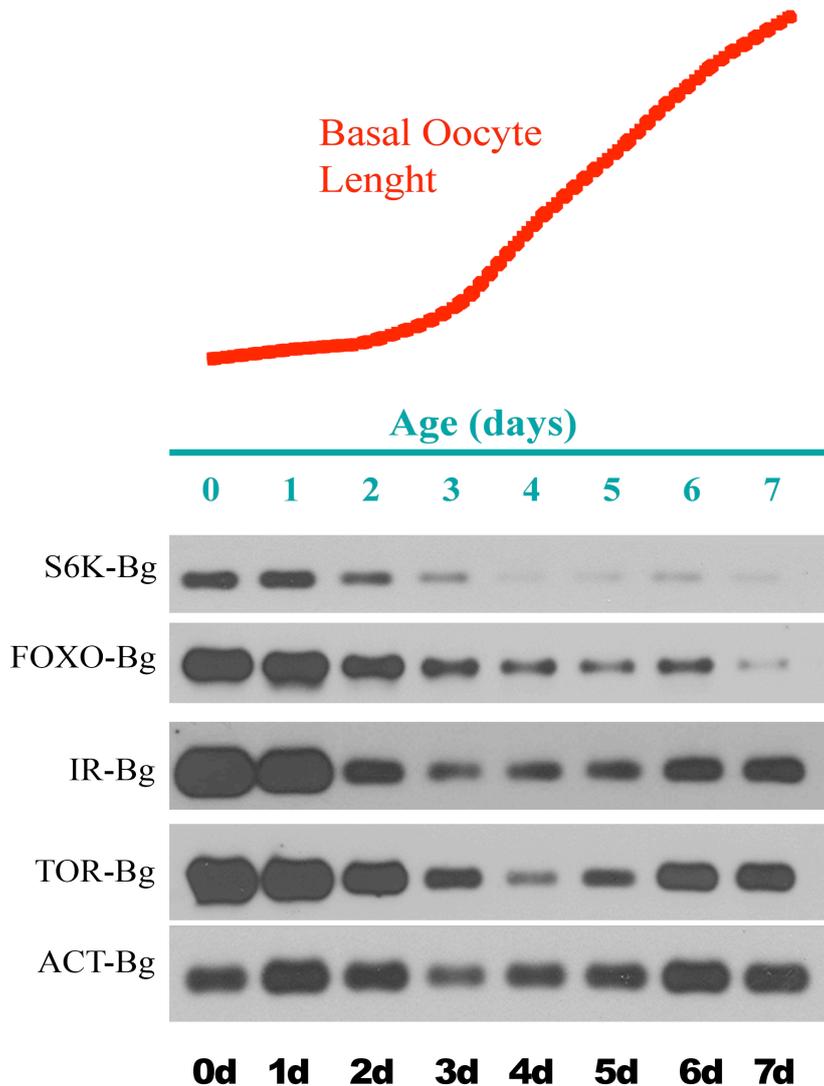


Fig. 2.6: Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR e o controle AC (Actinas) no tecido Ovário. Como referencia acrescentamos o perfil da longitude basal do oocito, como medida do desenvolvimento do ovário, segundo Bellés *et al.*, 1987.

2.4.3 ANIMAIS ALIMENTADOS E NAO ALIMENTADOS COM 3 DIAS DE ADULTO.

Realizamos um primeiro experimento com dois grupos de animais, os animais não alimentados (AL-), no qual foram retirados os alimento (fonte de nutrientes), no ultimo dia de larva da *B. germanica* ate o terceiro dia de adulto tendo somente água, e o outro grupo de animais que foram alimentados

(AL+), segundo condições descritas em materiais e métodos. Os botes contendo os animais que foram analisados eram verificados todos os dias pela manhã e pela tarde para certificar de que estavam todos bem e vivos. Ao completarem 3 dias de adulto, foram dissecados e analisados a expressão dos transcritos nos tecidos CG e OV, assim também como medida a LOB de todos os animais.

Todos os animais sobreviveram até o terceiro dia de adulto, não sendo letal, a ausência de comida por esse período.

A quantificação do RNA total do CG, não mostrou diferença significativa comparando animais alimentados e não alimentados, assim como a quantificação do RNA total do OV também não demonstraram diferença significativa entre animais alimentados e não alimentados.

Analisamos os padrões de expressão de FOXO, TOR, IR, S6K, e Vg por RT-PCR/Southern Blot em adultos de 3 dias, marcando sua idade a partir do primeiro dia de mudança de ninfa 6 para adulto, sendo que de um mesmo animal foram retirados o CG, e o OV.

Ao realizar a dissecação a primeira diferença notada foi na morfologia dos oocitos quando comparados um grupo com o outro (AL+ e AL-) e a diferença no crescimento dos oocitos, confirmando dados descritos em Osorio *et al.*, 1997, onde foi demonstrado que normalmente fêmeas com uma dieta nutricional normal produzem a primeira ooteca por volta do oitavo dia de adulto. O que em fêmeas mantidas sem alimentação morrem por volta do décimo dia, sem ocorrer desenvolvimento nos oocitos.

Dessa maneira comprovamos que os oocitos de adulto com 3 dias AL-, não desenvolveram, mantendo-se um tamanho similar de oocitos em dia zero de adulto. Os animais que foram alimentados desenvolveram normalmente, obtendo sua medida normal de LOB (Fig. 2.7).

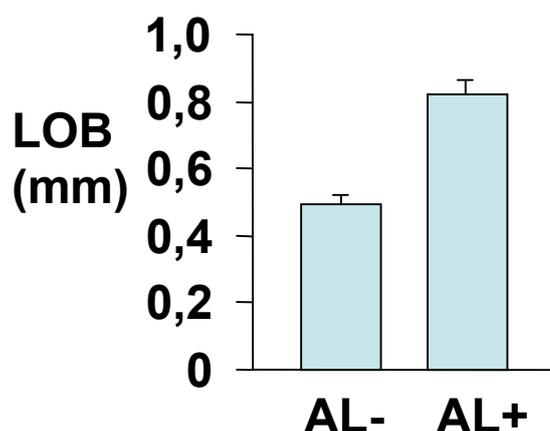


Fig. 2.7: Gráfico demonstrando a diferença entre a longitudine basal do oocito (LOB) de animais alimentados (AL+) e animais não alimentados (AL-) de 3 dias de adulto. Medida em milímetros dos oocitos. Diferença significativa estatisticamente (*test-t*, $p < 0.0001$). Resultados com media +/- SEM.

Os resultados demonstraram que no CG os transcritos FOXO, TOR, IR, S6K, se expressam muito mais nos animais mantidos sem alimentos que nos alimentados, este resultado nos demonstra uma ligação entre a expressão dos transcritos analisados e a alimentação para este tecido aos 3 dias de adulto (Fig. 2.8).

Podemos ver também que a vitelogenina não se expressa em animais não alimentados mostrando a ligação entre a oogenese e a alimentação, como já sugerida por Osorio *et al.*, 1997.

Este resultado confirma alguns resultados como os descritos em Marr *et al.*, 2007, no qual se explica que em quantidades baixas ou ausência de nutrientes ou de insulina dFOXO e desfosforilado e ativado, ativando também outros componentes da via de insulina como o d4E-BP, diminuindo o crescimento celular e a proliferação.

Luong *et al.*, 2006, ao estudar TOR em *Drosophila*, demonstrou que a ativação de FOXO produzida com a inibição da via de insulina, e bloqueada em indivíduos que se reduz a atividade de TOR, demonstrando uma relação direta entre dTOR e dFOXO.

Em estudos da via do receptor de insulina em *Drosophila* Puig and Tjian, 2005, propuseram um mecanismo pelo qual dFOXO regula a sensibilidade da sinalização da via do receptor de insulina. Esses autores comprovaram que dFOXO é o responsável da ativação transcricional do IR, que a privação de alimento upregula mRNA de IR em moscas controles, mais não em moscas deficientes em dFOXO. desta maneira o efeito de FOXO em condições de falta de alimento permitira uma resposta mais rápida no momento da realimentação (Puig and Tjian, 2005). No CG de fêmeas de *B. germanica* tivemos um resultado parecido, já que observamos altos níveis de expressão do IR, em fêmeas AL- e também altos níveis de mRNAs para FOXO, TOR e S6K. Os altos níveis do fator de transcrição FOXO podiam produzir um aumento da expressão dos outros fatores (IR, TOR e S6K) que se acumulariam para produzir uma resposta rápida no momento da realimentação.

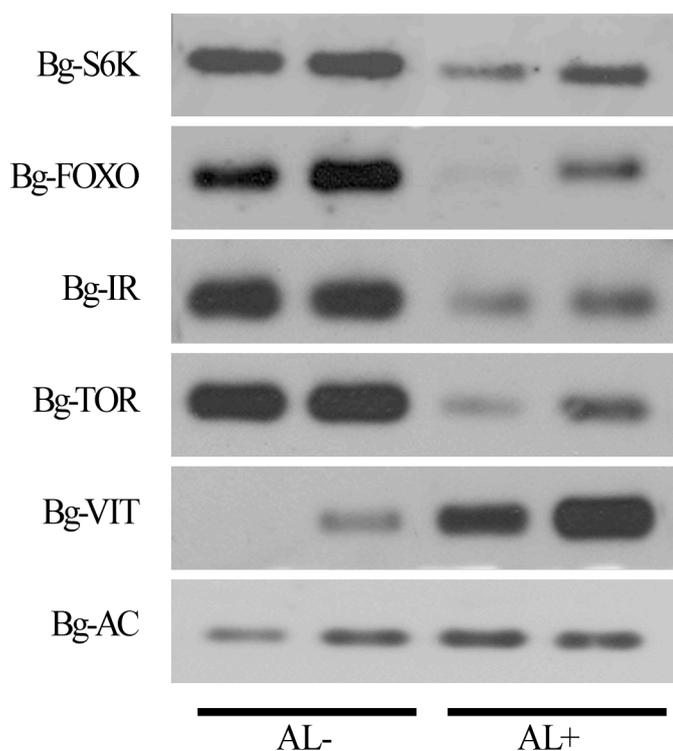


Fig 2.8: Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, VIT e o controle AC (Actinas) para fêmeas adultas de 3 dias de *B. germanica* sem alimento (AL-) e alimentados (AL) no tecido corpo gorduroso

Em, Vihervaara and Puig, (2008) demonstraram que FOXO em *Drosophila* é necessário para expressão de Lip4, quando as moscas estão sem alimento por 4 dias RNAm de Lip4 são alto-regulados e essa resposta depende da presença de FOXO. Esses resultados comprovam mais uma vez a relação entre a expressão de FOXO e a ausência ou presença de alimentos.

Se analisaram também os níveis de expressão dos distintos mRNAs no ovário de fêmeas adultas de três dias com alimento e sem alimento. Na análise da expressão no ovário, apesar das diferenças na LOB, não se observou diferenças significativas nos níveis de expressão dos transcritos estudados (Fig. 2.9).

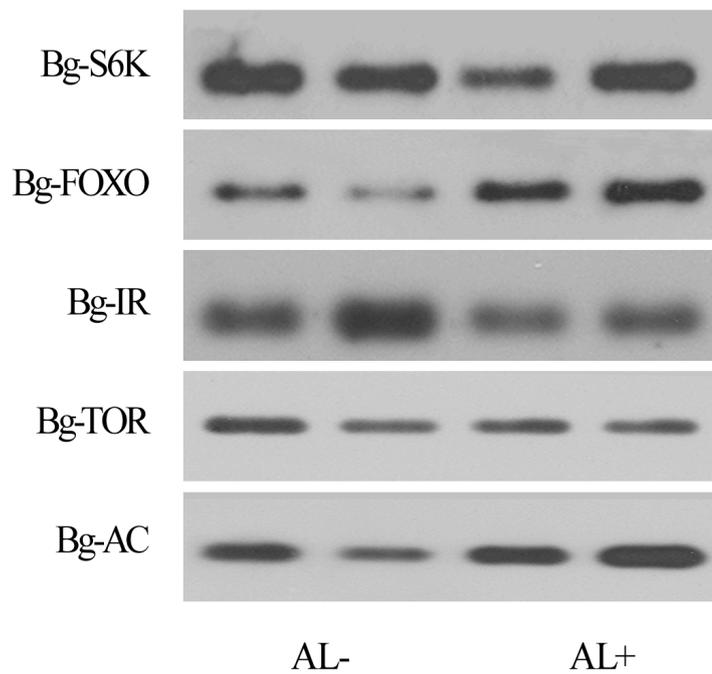


Fig. 2.9: Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, e o controle AC (Actinas) para animais sem alimento (AL-) e alimentados (AL+) no tecido Ovário

2.4.4 ALIMENTADAS, NÃO ALIMENTADAS E NÃO ALIMENTADAS EXPOSTAS A 6 HORAS DE ALIMENTOS A 5 DIAS DE ADULTA.

Anteriormente concluímos que no tecido do CG, para animais com 3 dias de adulto os transcritos analisados estavam mais expressos em animais não expostos à comida, e que no ovário não havia nenhuma alteração entre os grupos estudados. Nesse experimento decidimos verificar em três grupos distintos com adultos de 5 dias, um grupo com animais mantidos sem alimentação, um segundo grupo com animais com alimentação e um terceiro grupo com animais sem alimentação e exposto por seis horas alimentação, para analisar os efeitos produzidos nas primeiras horas depois da alimentação.

Os animais foram distribuídos em 3 compartimentos, compartimento 1: animais alimentados (AL+), compartimento 2: animais não alimentados (AL-) e compartimento 3: animais não alimentados e depois alimentados por 6 horas (AL- 6h), ao final de cinco dias foram realizadas as extrações dos tecidos de CG e OV para análise molecular.

Primeiro medimos os níveis dos diferentes mRNAs no CG de fêmeas adultas submetidas a diferentes tratamentos. Os resultados mostram que, a diferença que encontramos em animais alimentados de 3 dias, não se repetiu para animais de 5 dias a nível de expressão. Isto se pode explicar ao 5 dia de adulto sem alimento o animal já não pode se manter com elevado níveis de transcrição por falta de recursos, e portanto se baixa os níveis de expressão que encontramos ao 3 dia de adulto no tratamento anterior. No entanto as fêmeas de 5 dias não alimentadas estariam sensibilizadas a receber alimento, já que com somente 6 horas de alimentação são capazes de aumentar rapidamente o nível de alguns transcritos, especialmente FOXO e TOR.

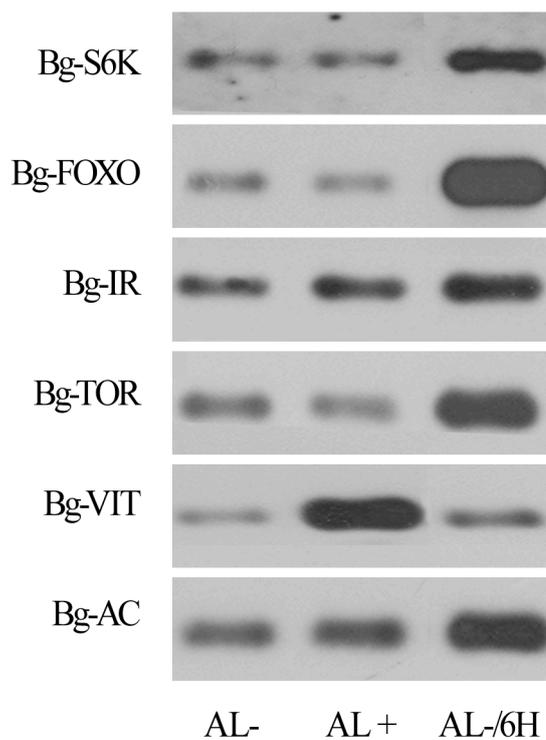


Fig. 2.10: Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, VIT e o controle AC (Actinas) para animais sem alimento (AL-) e alimentados (AL+) e não alimentadas e depois alimentadas por 6 h (AL- 6h) no tecido CG.

Quando analisamos os níveis de expressão dos diferentes transcritos no OV de fêmeas submetidas aos distintos tratamentos não observamos diferenças significativas para nenhum dos transcritos em nenhum dos tratamentos.

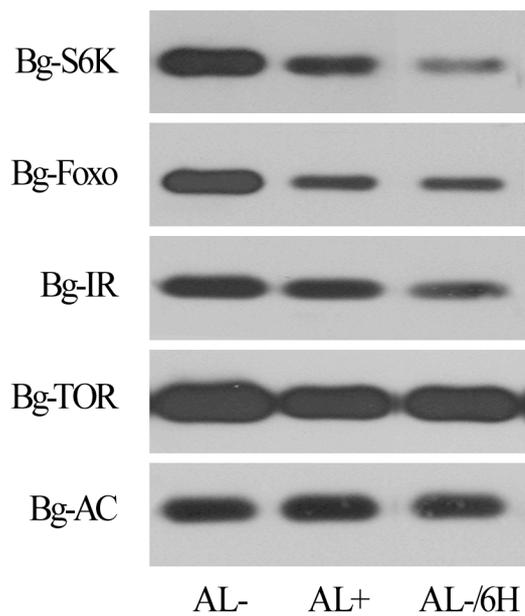


Fig. 2.11: Padrões de expressão dos transcritos S6K, FOXO, IR, TOR, e o controle AC (Actinas) para animais sem alimento (AL-) e alimentados (AL+) e mantido sem alimento e depois alimentados no tecido Ovário

2.5. CONCLUSOES

- Realizamos a clonagem do cDNA completo do fator de transcrição FOXO em *B. germânica*. A análise filogenético confirma que o cDNA clonado pertence a uma proteína desta família.
- A obtenção da seqüência nucleotídica de FOXO nos permitira realizar estudos de expressão e a função de FOXO mediante a utilização de técnicas de RNAi.
- Os transcritos estudados (FOXO, TOR, IR, S6K, Vg, SIN E RED) possuem diferentes padrões de expressão para os diferentes tecidos estudados.
- Para o CA, não foram verificados diferenças na transcrição de mRNAs para transcritos FOXO, TOR, IR, S6K, pelo contrario, os transcritos SIN e RED mostraram um perfil paralelo com a produção de HJ o que sugere que estas enzimas podem atuar na regulação da via.
- Para o CG, foi verificado um decréscimo significativo da transcrição de S6K, a partir do segundo dia de adulto sendo contraria a formação de VG, para os outros transcrito não se verificou, nenhuma acréscimo ou baixa na transcrição, não demonstrando diferença significativa comparado com o controle actinas.
- Para o Ovário alem do S6K, FOXO também demonstrou uma sensibilização e uma baixa de transcrição a partir do segundo dia de adulto.
- Para o tecido do corpo gorduroso, os animais que foram mantidos sem alimento por um período de três dias, demonstraram uma maior expressão de mRNA os transcritos (TOR, IR, S6K e FOXO). Isto podia

produzir uma sensibilização do CG para poder responder rapidamente no momento de realimentação.

- O padrão de expressão de Vg se comportou de maneira inversa aos dos outros transcrito, sendo pouco, ou quase nada expressa em animais não alimentados, com três dias de adulto.

- Para o tecido do ovário, não foi encontrada diferença na expressão dos transcritos analisados para os animais alimentados e não alimentados pelo período de três dias.

- Para o tecido do CG, para 5 dias de adulto não alimentados não se observaram diferenças nos níveis de transcrição entre fêmeas alimentadas e não alimentadas, sugerindo que o efeito do aumento dos níveis de transcrição que vimos aos 3 dias de adulto não pode ser mantido durante cinco dias sem alimento, por falta de recursos nutricionais.

- Entretanto as fêmeas mantidas por cinco dias sem alimento parecem muito sensibilizadas a realimentação, já que no CG respondem rapidamente a presença de alimento com um aumento dos níveis de expressão em particular de FOXO e TOR.

- Para o tecido do ovário, não foi encontrada diferença na expressão dos transcritos analisados para os animais de 5 dias de adulto, alimentados, não alimentados, e realimentados por 6 horas.

2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Accili, D., and Arden, K.C. (2004). Foxos at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, **117**, 421-426.
- Alessi, D.R., Caudwell, F. B., Andjelkovic, M. Hemmings, B. A., Cohen, p. (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein Kinase B; comparison with MAPKAP Kinase-I and p70 56 kinase. *FEBS left* **399**: 333-338.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 540-552.
- Engelmann, F. and Thorpe A. (1965) A correlation between feeding and the sexual cycle in *Leucophaea maderae* (Blattaria). *Journal of Insect Physiology* **11**, 53-64.
- Greer, E., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogenes* **24**, pp 7410-7425.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. (1992) *Comput Appl Biosci* **8**, 275-282
- Junger, M.A., Rinteltn, F., Stocker, H., Radimerski, T., Wasser-man, J.D., Greenberg, M.E., and Hafen, E. (2003). *Drosophila* FOXO is not size control but mediates growth inhibition associated with reduced insulin signaling. *J. Biol.*
- Lin, K., Dorman, J.B., Rodan, A., and Kenyon, C. (1997). Daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *caenorhabditis elegans*. *Science* **278**: 1319-1322.
- Luong, N., Davies, C.R., Wessells, R.J., Graham, S.M., King, M.T., Veech, R., Bodmer, R. and Oldham, S.M. (2006). Activated FOXO-mediated insulin

resistance is blocked by reduction of TOR activity. *Cell Metabolism* **4**, 133-142.

Maestro, J. L., Danes M.D., Piulachs M. D., Cassier P. and Belles X. (1994). Juvenile hormone inhibition in corpora allata from ovariectomized *Blattella germanica*. *Physiological Entomology* **19**, pp 342-348.

Marr, M. T., 2nd, D'Alessio, J. A., Puig, O., Tjian, R. (2007)"IRES-mediated functional coupling of transcription and translation amplifies insulin receptor feedback." *Genes Dev* **21**. 2: 175-83.

D. Martín, M.D. Piulachs and X. Bellés, Patterns of hemolymph vitellogenin and ovarian vitellin in the German cockroach, and the role of juvenile hormone, *Physiol. Entomol.* **20** (1995), pp. 59–65.

Martín, D., Piulachs, M. D., Comas, D., and Belles, X. (1998) *Arch Insect Biochem Physiol* **38**, 137-146.

Montagne, J., Stewart, M., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S., and Thomas, G. (1999). Drosophila S6 Kinase: A regulator of cell size. *Science* **285**, pp 2126-2129.

Nakae, J., Biggs, W.H., 3rd, Kitamura, T., Cavenee, W. K., Wright, C.V., Arden, K.C., and Accili, D. 2002. Regulation of insulin action and pancreatic β -cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo 1. *Nat. Genet.* **32**, 245-253.

Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissen-baum, H.A., and Ruvkun, G. (1997). The fork head transcription factor DAF-16 transduces insuli-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* **389**: 994-999.

Osorio, S., Piulachs, M.D., Bellés, X. Feeding and Activation of Corpora Allata in the Cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae)(1997). *J. insect Physiol.* 31-38.

- Piulachs M.D. (1988). Accion gonadotrofica de la hormona juvenile en hembras de *Blattella germanica* alactectomizadas o sometidas a ayuno prolongado. *Miscel.lania Zoologica (Barcelona)* **12**, 121-124.
- Puig, O. and Tijan, R. 2005. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes & dev.* **19** 2435-2446.
- Raikhel, A.S., Kokoza, V.A., Zhu, J., Martin, D., Wang, S.F., li, C., Sun, G., Ahmed, A., Dittmer, N., Attardo, G., (2002). Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, pp 1275-1286.
- ROTH L. M. and STAY B. (1962) Oocyte development in *B. germanica* and *B. vaga*. *Ann. ent. Soc. Am.* **55**, 633-642.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis (eds.). 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schal, C., Chiang, A.-S., Burns, E. L., Gadot, M., and Cooper, R. A. (1993) *J Insect Physiol* **39**, 303-313
- Teleman, A.A., Chen, Y.W., and Cohen, S.M. (2005). 4E-BP function as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes & dev.* **19**, 1844-1848.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997) *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882
- Vihervaara T. and Puig O. (2008). dFOXO Regulates Transcription of a *Drosophila* Acid Lipase. *J.Mol.Biol.* **376**, 1215-1223.

CAPITULO 3:
ESTUDO DA INTERFERENCIA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO
FOXO EM *B. germanica*.

3. RNA DE INTERFERENCIA *IN VIVO*

3.1 RESUMO

Neste capítulo descrevemos um estudo funcional do fator de transcrição FOXO, utilizando a técnica RNAi *in vivo*. Este trabalho tenta estudar o papel de FOXO durante a fase de ninfa, e sua transição a fase adulta da *B. germanica* inseto modelo, visto que neste momento de mudança de fases se produzem mudanças morfológicas e fisiológicas importantes. Outro motivo para realizar o estudo seria que quando a *B. germânica* entra na fase adulta se determina a mudança do programa genético e se inicia uma série de processos que são exclusivos desta fase. Com o tratamento de fêmeas de *B. germânica* com dsRNA *in vivo* para FOXO (DsFOXO) foi possível verificar uma redução dos níveis de mRNAs para FOXO tanto no CG como no OV, o que sugere um efeito sistêmico para o tratamento. O tratamento de DsFOXO, com a condição de presença ou ausência de alimento foi possível observar que, tanto no CG como no OV, a ausência de alimento produziu um aumento de mRNA para FOXO, incluindo no caso de interferir a expressão de FOXO utilizando dsRNA.

Palavras-chave: *Blattella germanica*, FOXO, TOR, IR, S6K, Vg, RT-PCR, Southern Blot, RNAi *in vivo*.

3.2 INTRODUÇÃO

Uma idéia aproximada da determinação da função das proteínas em organismos que não se podem modificar geneticamente de forma estável, como no caso da *B. germânica* consiste no silenciamento transitório dos transcritos que as codificam. Este procedimento se baseia no tratamento com uma fita dupla de RNA (dsRNA) idêntica a um fragmento do mensageiro que se pretende silenciar, o qual, quando penetra nas células se processa em fragmentos de 21-23 nucleotídeos que desencadeiam a degradação do mensageiro endógeno da diana (Plasterk, 2002, Schutze, 2004).

Recentemente, têm sido realizados vários experimentos, de interferência com FOXO, com objetivo de poder explicar a função de sua proteína em vários organismos. Ratos de cobaias interferidos para FOXO 1 morrem depois do décimo dia de vida por defeitos de angiogenesis (Furuyama *et al.*, 2004; Hosaka *et al.*, 2004). Além disso o mutante heterozigoto para FOXO 1 possuem o fenótipo de diabético igual ao mutante para receptor de Insulina (Nakae *et al.*, 2002), que nos permite uma importante conclusão, que FOXO 1 é um substrato fisiológico da via de insulina e está relacionado com os efeitos da insulina ou metabolismo de glicose nessas cobaias.

3.3 MATERIAIS E METODOS

O primeiro passo foi realizar a clonagem da região de FOXO que se utilizaram para a síntese de dsRNA.

Tabela 3.1: Nucleotídeos utilizados para amplificar o duplo RNA.

MOLECULA	NOME PRIMER	SEQUENCIA PRIMER	TAM. FRAG.
FOXO	Foxo R 5	GAAGTCGTAAGTCGGCTGGTACG	520 pb
FOXO	Foxo F 7	CGTCCAAAATGAAGGCACAGGAAA	

Para a síntese dos correspondentes dsRNAs tem que partir de um fragmento linear de DNA que contem, em um extremo o promotor T7, ou SP6, e um extremo 5' no outro extremo. Foi realizada uma digestão overnight com 30-40 µg do plasmidio com Bam HI e Sal I.

Depois de realizada a digestão dos fragmentos os mesmo foram precipitados com fenol-cloroformio/isoamilico (25:24:1). O precipitado foi resuspendido em 11 µl de H₂O DPEC.

Como controle nos experimentos de RNAi as fêmeas foram tratadas com dsRNA sem homologia em *B. germanica* conseguido a partir de uma seqüência não codificante do plasmidio pSTblue-1 (DsCONT).

A concentração do dsRNA foi determinada por leitura da densidade óptica em um biofotometro (Eppendorf). O dsRNA foi diluído em solução salina ringer filtrado com filtro millex de 0,22 µm, ate obter a concentração desejada para injetar 1µl em fêmeas de quinta fase ninfa, sexta fase ou primeiro dia de adulta. O dsRNA foi injetado diretamente na cavidade abdominal do inseto, utilizando uma seringa HAMILTON.

Logo depois de realizada a interferência, foram realizados experimentos moleculares para detectar a redução do mRNAs de FOXO. As PCRs foram realizadas com um primer dentro e fora da região utilizada para produzir a fita dupla de RNA.

Seqüência dos primers:

Tabela 3.2: Nucleotídeos utilizados para amplificar a região utilizada para verificar a eficácia da técnica de RNAi

MOLECULA	NOME PRIMER	SEQUENCIA PRIMER	TAM. FRAG.
FOXO	Foxo R 7	AGTCTGTAGGAACTCTCCACCTT	480 pb
FOXO	Foxo F 6	CTGTCGTTACACAACCGCTTCAT	

A concentração do dsRNA foi determinada por leitura da densidade óptica em um biofotometro (Eppendorf). O dsRNA foi diluído em ringer filtrado com filtro millex de 0,22µm, ate obter a concentração desejada para injetar 1µl em fêmeas de quinta fase ninfa, sexta fase ou primeiro dia de adulta. O dsRNA foi injetado diretamente na cavidade abdominal do inseto, utilizando uma seringa HAMILTON.

O realizamos um experimento com interferência no primeiro dia de ninfa 6 e depois no primeiro dia de adulto, e os animais foram analisados ao quinto dia de adulto, para as técnicas RT-PCR .

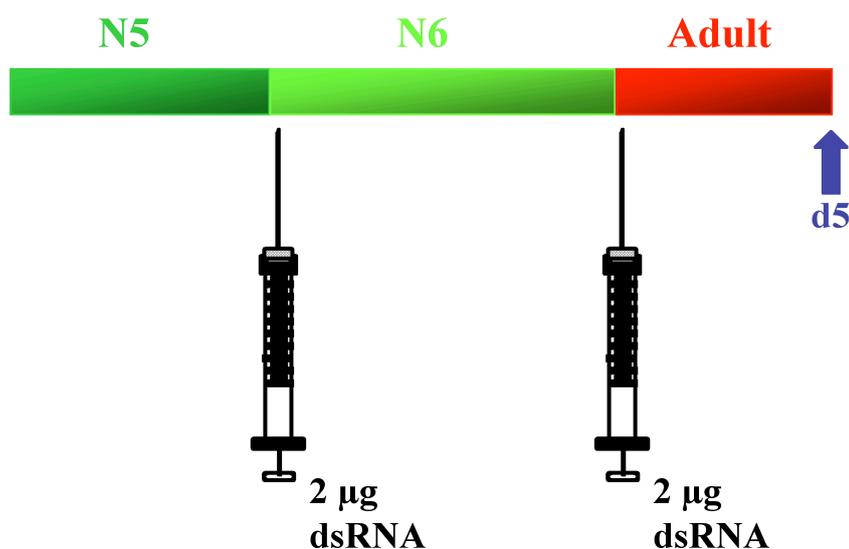


Fig. 3.1: Modelo de inserção da amostra de duplo RNA corresponde a idade do animal, ao primeiro dia de ninfa 6 e novamente ao primeiro dia de adulto

3.4 RESULTADOS E DISCUSSAO

3.4.1 INTERFERENCIA FOXO ANALISADAS AO QUINTO DIA DE ADULTO.

Começamos com o experimento, aplicando 2µg em 2 µl em animais no primeiro dia de ninfa 6, e logo depois ao mudarem a adulto no seu primeiro dia de adulto para serem analisados ao quinto dia de adulto, nos controles foram injetados 2µg em 2 µl de dsRNA heterologo conseguido a partir do vetor de clonagem (DsCONT). Os animais foram observados todos os dias e analisadas todas as variáveis, como comida, água, e a letalidade do tratamento.

Ao quinto dia de adulto foram realizadas as disseções dos tecidos (CG e OV), e armazenados em ultra -freezer -80°C, Alem disso realizamos a medição da longitude basal do oocito..

Neste experimento foram observados um atraso medio de 1 a 2 dias na muda ninfa-adulto, comparando DsCON e DsFOXO, sendo que DsFOXO tardaram mais na mudança de fase ninfa-adulto, assim também foi notado uma letalidade de 45% em DsFOXO (3 de 7 animais), sendo duas ninfas, e um adulto, destes 4 animais sobreviventes 2 (50%) possuíam como fenótipo, asas mal formadas e problemas com os oocitos como descrito abaixo. Não houve perdas no grupo DsCONT.

Analisando a extração dos oocitos, notamos que os oocitos dos interferidos para FOXO eram deformados, com uma coloração mais escuras, heterogenios entre eles, com relação ao tamanho, não se desenvolveram como oocitos de um adulto de cinco dias, alguns possuindo tamanho igual a de 1 dia mostrando quase nenhum desenvolvimento. Todos os controles estavam normais, sem apresentar diferenças entre tamanho dos oocitos, e sem atraso no ciclo reprodutivo.

A analise de LOB esta descrita no gráfico abaixo comparando o tamanho dos oocitos interferido DsFOXO, e DsCON, demonstrando um retardo no crescimento dos mesmos nos animais interferidos.

Também foi verificado uma grande diferença na LOB comparando dentro do mesmo grupo de interferidos sendo os oocitos heterogêneos entre eles com relação ao tamanho, forma e coloração.

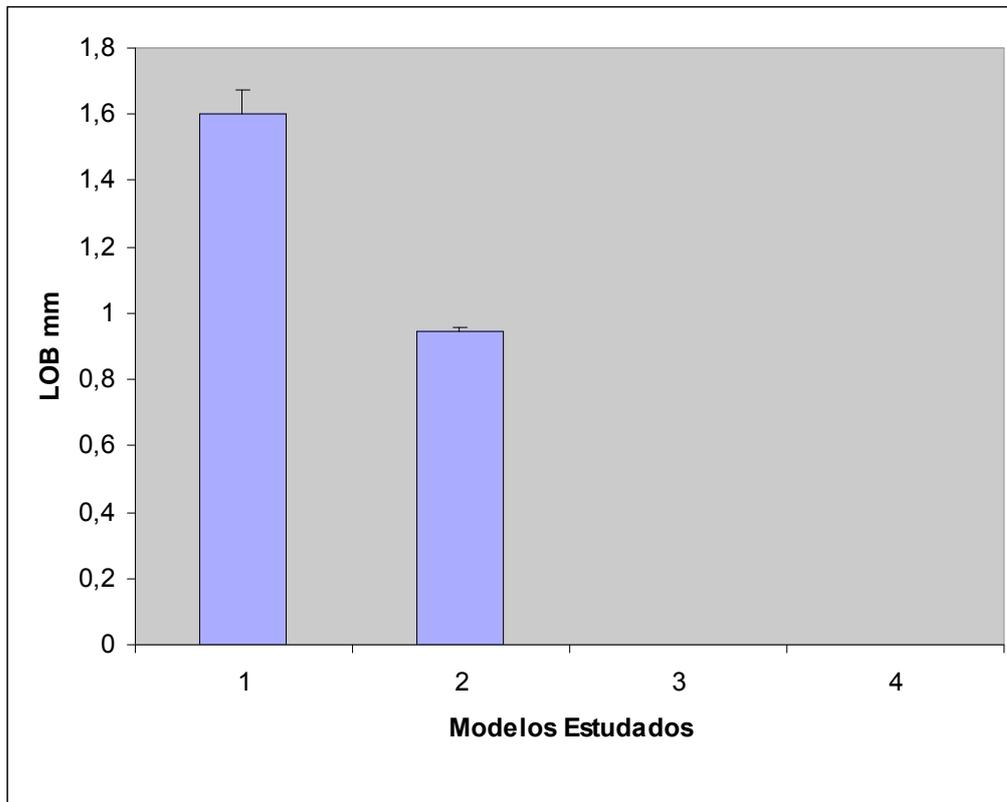


Fig. 3.2: Longitude basal do oocito (LOB) em fêmeas adultas de 5 dias de *B. germânica* tratados com DsRNA control (DsCON) e tratados com DsRNA para FOXO (DsFOXO) (*test-t*, $p < 0.0001$). 1 DsCON e 2 DsFOXO. Resultados expressados como média \pm SEM.

Quando realizada a extração do RNA para análise molecular não foi demonstrada nenhuma diferença significativa entre a quantificação do RNA total comparando controles e interferidos para FOXO.

A análise dos níveis de expressão no CG por estes animais, uma diminuição significativa da expressão de FOXO para os interferidos para FOXO, com relação aos controles.

Com relação aos outros transcritos (BgIR, BgTOR, BgS6K e Vg), não houve diferença de expressão comparando os interferidos para FOXO e controles. O fato de não encontrarmos diferença nos níveis de mRNA para Vg nas fêmeas DsFOXO sugere que a diminuição no crescimento dos oocitos que se observou com o tratamento pode ser devido a um problema na oogenese no ovário e não na produção de Vg no CG.

Abaixo a fig. 3.3 com todos os transcritos analisados entre DsCONT e DsFOXO para animais de 5 dias de adulto.

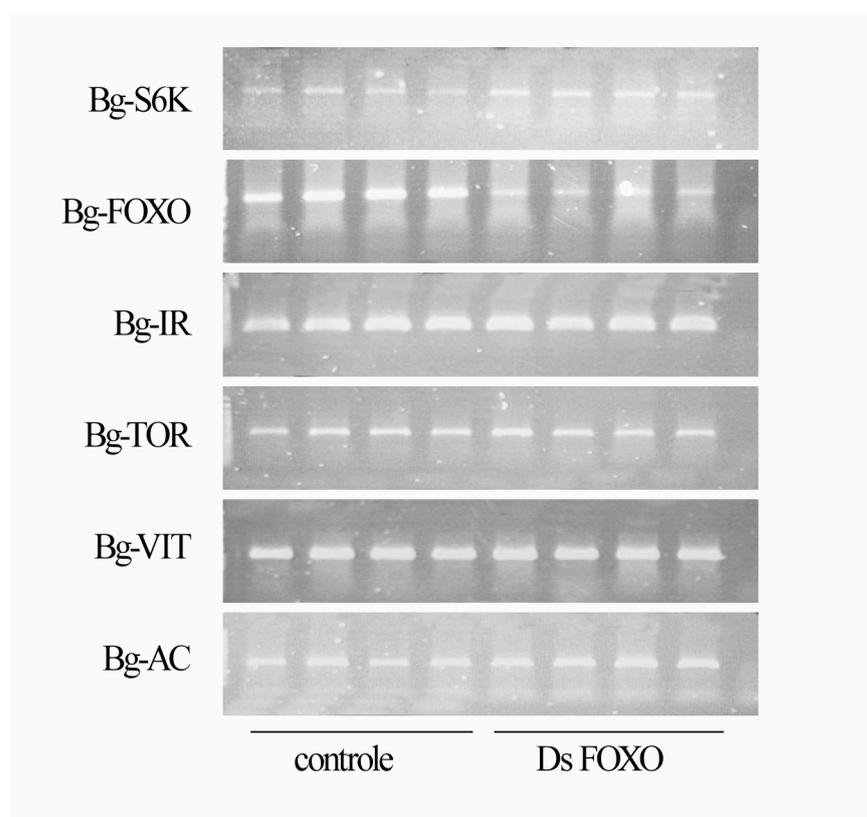


Fig. 3.3: Níveis de mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, Vg e actinas no CG em fêmeas adultas de 5 dias.

Esse resultado demonstra que animais interferidos para FOXO para o tecido do CG, não interfere a nível de transcrição na expressão dos outros transcritos analisados.

Também foram realizadas análises com as técnica RT-PCR para o tecido do ovário. Para esse tecido se verificou uma diminuição do mRNA de FOXO, nenhuma mudança nos transcritos Bg S6K, BgTOR, e BgIR.

Abaixo a Fig.5.4 comparando todos os transcritos analisados para o tecido do Ovário.

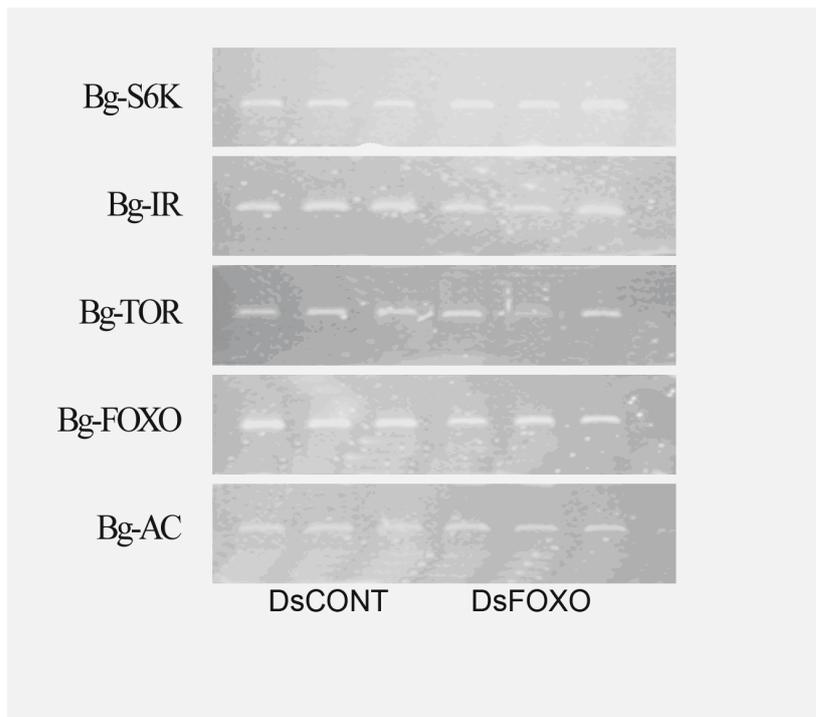


Fig. 3.4: Níveis de mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, Vg e actinas no OV em fêmeas adultas de 5 dias.

3.4.2 INTERFERENCIA PARA FOXO EM ANIMAIS ALIMENTADOS E NAO ALIMENTADOS ANALISADOS AO QUINTO DIA DE ADULTO

Começamos com o experimento para Interferidos, aplicando 2 μ g em 2 μ l em animais no primeiro dia de ninfa 6, logo depois, assim como descrito no modelo anterior esperamos os animais mudarem a adulto e aplicamos novamente a quantidade de 2 μ g em 2 μ l no primeiro dia de adulto, para serem analisados ao quinto dia de adulto, nos controles foram injetados 2 μ g em 2 μ l de dsRNA heterologo. A partir do primeiro dia de adulto, para um grupo de indivíduos de cada tratamento (DsFOXO e DsCON) foi mantido somente com água (AL-), enquanto que o outro grupo de cada tratamento foi mantido tanto com água como com comida ad libitum (AL+).

Não houve nenhuma perda de animais nos DsCONT, todos os animais que não foram analisados foram descartados. Podemos ver também que os interferidos para FOXO mantidos sem alimento, tiveram uma taxa de mortalidade superior aos 50% sendo 7 animais de um total de 11, e mantiveram o fenótipo anterior de má formação nas asas, e oocitos deformados descrito anteriormente.

As disseções ocorreram conforme descrito em metodologia, tanto para o CG quanto para o OV.

Para a disseção do ovário sempre se realizou a medida da LOB (Fig. 3.5) .

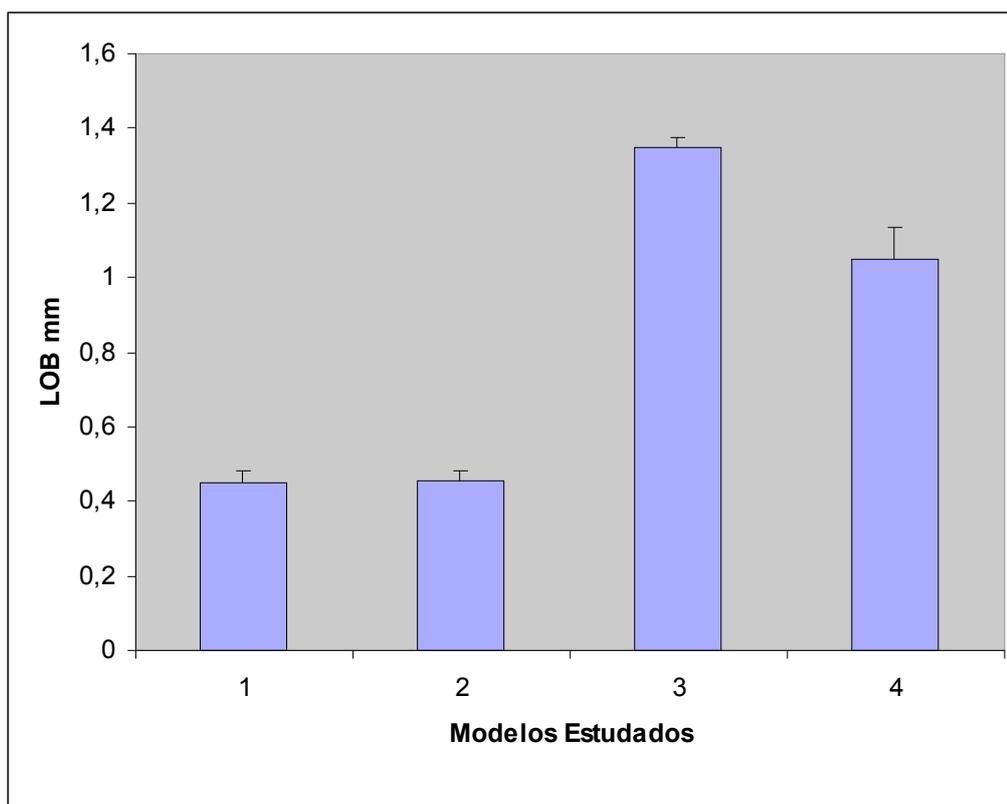


Fig. 3.5: Valores de LOB em fêmeas adultas de 5 dias de *B. germânica* alimentadas (AL+) ou não alimentadas (AL-) e tratadas com dsRNA para FOXO (DsFOXO) ou com dsRNA controle (DsCON). Resultados expressados como média +/- SEM.

1-DsCON AL-, 2-DsFOXO AL-, 3-DsCON AL+, 4-DsFOXO AL+

Nesse experimento tentamos analisar a interferência para FOXO com um atenuante: a presença ou ausência de alimento. Para a análise molecular utilizamos, indivíduos sem alimento interferidos para FOXO (DsFOXO AL-), indivíduos mantidos sem alimento controle (DsCONT AL-), indivíduos mantidos com alimento interferidos para FOXO (DsFOXO AL+), indivíduos mantidos com alimento controle (DsCONT AL+), para realizar uma comparação entre eles.

Com respeito a LOB se pode observar nos indivíduos alimentados a diferença da LOB já tinha sido observada anteriormente entre os grupos DsCON e DsFOXO (Fig. 3.2), Com respeito aos indivíduos não alimentados, tanto as fêmeas do grupo DsCON como as do grupo DsFOXO apresentavam

a LOB muito reduzida, similar a de fêmeas recém emergidas (Bellés *et al* 1987).

Se realizaram também um estudo da expressão dos diferentes mRNAs, no CG dos indivíduos submetidos aos diferentes tratamentos. Um dos resultados conseguidos mais significativos, além da redução do mRNA para FOXO produzido pela interferência, é que os valores relativos da expressão de FOXO são maiores nos indivíduos não alimentados que nos alimentados (quando se comparam entre si os tratamentos, DsCON e Ds FOXO). Isto vem a confirmar o observado em animais não alimentados, de 3 dias, nos DsCON observamos que os níveis de mRNA de FOXO eram mais altos que nos animais alimentados (Fig. 2,8) e atribuímos isto ao fato do stress produzido pela não alimentação. No caso de animais de 5 dias, comprávamos que já não se observava esta diferença (Fig. 2.10) e sugerimos que 5 dias de não alimentação podia ser muito tempo para conservar níveis altos de expressão. Neste caso os resultados do presente capítulo os experimentos se realizaram em épocas diferentes com blocos de animais diferentes, e isso podia explicar o porquê de estas fêmeas não alimentadas ainda podem manter os níveis altos de expressão de FOXO. Outra possível explicação seria que ao juntar o stress produzido pela falta de alimento, com o stress produzido pelo tratamento com dsRNA, podia produzir aos cinco dias que os altos níveis de mRNA para FOXO.

Outro resultado que observamos foi que os animais não alimentados, DsCON, a Vg possui um nível de expressão muito baixo ou nulo, nos não alimentados DsFOXO, a Vg tem os níveis de expressão altos, que não correspondem com seu estado de não alimentados. Isto sugere que na situação de falta de alimento, o fator de transcrição FOXO, contribui para reprimir a transcrição do gene Vg, já que si reduzimos a presença de FOXO, observamos uma alta expressão deste gene. O efeito observado podia ser devido a redução de FOXO no CG ou a um possível aumento da produção de HJ nos CA de animais DsFOXO não alimentados. Futuros experimentos comprovaram esta hipótese.

O resto de mRNA estudados (S6K, IR e TOR) não mostraram diferenças significativas com nenhum dos tratamentos.

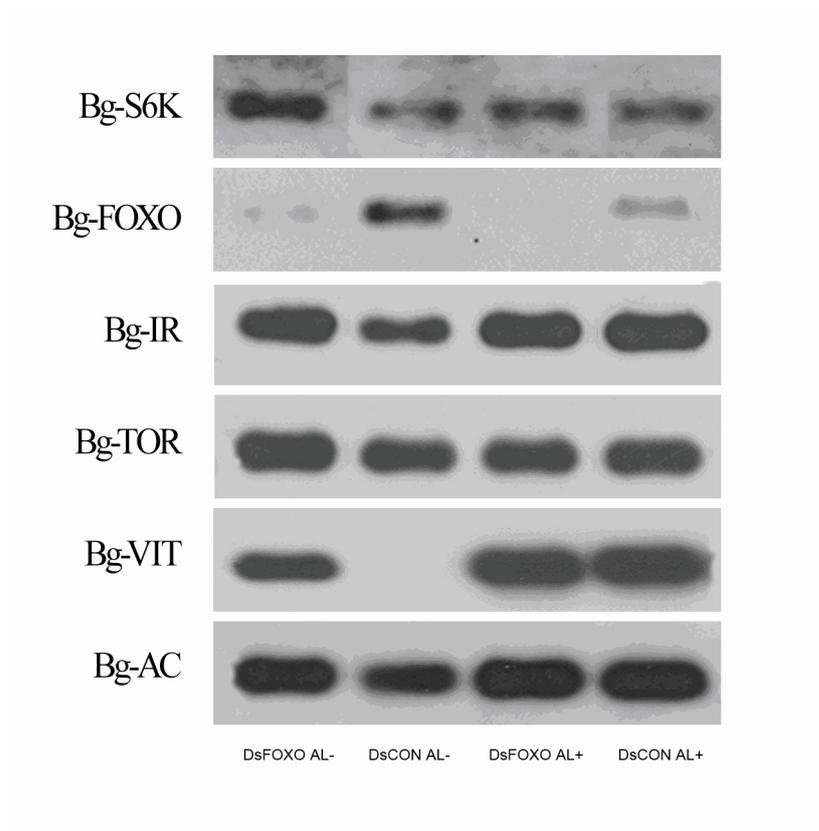


Fig 3.6: Níveis mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, Vg e actinas no CG de fêmeas adultas de *B. germânica* de 5 dias DsCON e DsFOXO e alimentados e não alimentados.

Foram também realizados os níveis de expressão dos diferentes transcritos no ovário de fêmeas dos diferentes tratamentos. Também foram observados neste caso, como no caso do CG, que a não alimentação fez aumentar os níveis dos transcritos para FOXO. Isto se fez mais evidente no caso dos animais não alimentados DsFOXO, no qual não se observa a redução dos transcritos de FOXO que se deveria produzir e que si observa nos animais alimentados.

Igualmente como no caso do CG não se observou diferenças para S6K, IR e TOR.

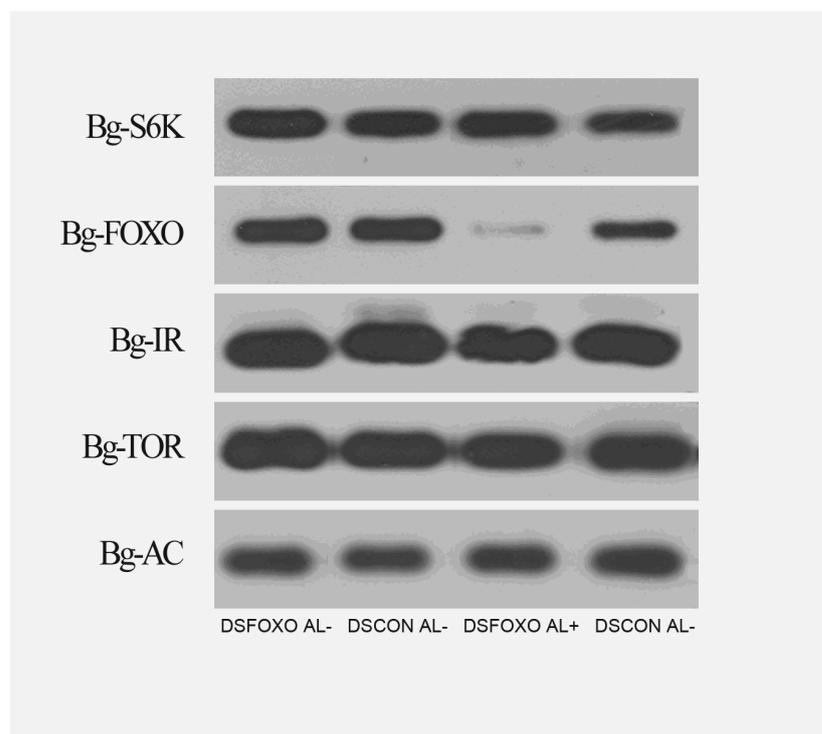


Fig 3.7: Níveis mRNA para FOXO, S6K, IR, TOR, e actinas no OV de fêmeas adultas de *B. germânica* de 5 dias DsCON e DsFOXO e alimentados e não alimentados.

Em *Apis mellifera* Corona *et al.*, 2007 sugere um modelo de interação entre a Vg o HJ e o IR para regular a longevidade nessas abelhas. Eles propõem que em baixas condições de nutriente aumenta a expressão de IR resultando em fosforilação de FOXO e esse sendo assim é mantido no citoplasma. Nesse estágio FOXO não reprime a síntese de HJ, sendo contrario ao proposto para *Drosophila* (Flatt T. *et al.*, 2005), Altos níveis de HJ reprime vitellogenesis resultando em baixos níveis de Vg, sendo um mecanismo de feedback pois com baixos níveis de Vg estimula a secreção de IR. Esse modelo seria um contrario ao da *B. germanica* visto que com altos níveis de HJ nesse inseto se aumenta a produção de Vg mais o interessante é que demonstra uma ligação direta entre FOXO e Vg. No nosso modelo estudado essa ligação seria oposta a encontrada visto que como vimos quando se anula o efeito de FOXO por Rnai interferência, obtivemos a expressão de Vg, mesmo em condições conhecidas de sua inibição (falta de alimento).

3.5 CONCLUSOES

- O tratamento de fêmeas de *B. germânica* com dsRNA *in vivo* para FOXO (DsFOXO) produz uma redução dos níveis de mRNAs para FOXO tanto no CG como no OV, o que sugere um efeito sistêmico para o tratamento.
- As fêmeas DsFOXO desenvolvem menos seus oocitos comparado ao DsCON. Este efeito podia ser devido a uma deficiência na oogenese mais que a uma redução na produção de Vg, já que não observamos, diminuição de mRNA para Vg no CG de fêmeas DsFOXO.
- Com o tratamento de DsFOXO, a condição de presença ou ausência de alimento observamos que, tanto no CG como no OV, a ausência de alimento produziu um aumento de mRNA para FOXO, incluindo no caso de interferir a expressão de FOXO utilizando dsRNA.
- Além disso no CG de fêmeas não alimentadas e tratadas com DsFOXO observamos uma elevada expressão de Vg. Isto sugere que FOXO estaria contribuindo com a inibição da transcrição do gene da Vg que se produz em fêmeas não alimentadas.

3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Belles, X., J. Casas, A. Messeguer, and M. D. Piulachs. (1987). In vitro biosynthesis of JH III by the corpora allata of adult females of *Blattella germanica* (L.). *Insect Biochem.* **17**:1007-1010.
- Corona, M., Velarde, R. A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. A., and Robinson, G. E. (2007). Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *PNAS.*, 17 pp 7128-7133.
- Flatt T., Tu M.P., Tatar M. (2005). Hormone pleiotrope and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life History. *BioEssays* 27 pp 999-1000
- Furuyama, T. Nakazawa, T. Nakano, I. Mori, N. (2000). Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J.*, **349**:629-634.
- Martín, D., Piulachs, M. D., Comas, D., and Belles, X. (1998) *Arch Insect Biochem Physiol* **38**, 137-146.
- Nakae, J., Biggs, W.H., 3rd, Kitamura, T., Cavenee, W. K., Wright, C.V., Arden, K.C., and Accili, D. (2002). Regulation of insulin action and pancreatic β -cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo 1. *Nat. Genet.* **32**, 245-253.
- Osorio, S., Piulachs, M.D., Bellés, X. (1997). Feeding and Activation of Corpora Allata in the Cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *J. insect Physiol.* 31-38.
- Plasterk, R. 2002. RNA Silencing: The Genomes Immune System. *Science.* **296**(5571):1263-1265.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis (eds.). (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

**4. ANEXOS;
MATERIAIS E METODOS.**

2. METODOLOGIA E MATERIAIS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1 INSETOS

Foram utilizados nos experimentos fêmeas de *B. germânica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae), que são mantidas em uma colônia no laboratório, com condições constantes de temperatura (30 °C), com umidade relativa (70 – 75 %) sem a presença de luz. A alimentação das baratas consiste em ração canina PANLAB 125 e água *ad libitum* (Piulachs, 1987).

2.2 TÉCNICAS DE DISSECÇÃO

Todas as dissecações foram realizadas com os animais anestesiados com CO₂. Para a manipulação e a extração dos tecidos foram utilizadas pinças INOX 5 Super Wite e microtesouras Diener. Todas as dissecações se realizaram com a solução salina Ringer.

Tabela 1: Condições Solução Ringer

Solução salina Ringer	
NaCl	9 g/l
KCl	0,2 g/l
NaHCO ₃	0,2 g/l
CaCl ₂	0,2 g/l

2.2.1 DISSECÇÃO DOS OVÁRIOS, DO CORPO GORDUROSO E CORPORA ALLATA.

Foram extraídos corpo gorduroso, ovário e corpora allata de fêmeas de 0 a 7 dias de adulto.

Para se determinar a idade fisiológica correta das fêmeas adultas foi medida a longitude basal do oocito como parâmetro, de acordo com Piulachs (1987).

Tabela 2: Medidas de LOB segundo modelo Piulachs., 1987

DIAS	LOB (mm)
0	0,42 – 0,47
1	0,48 – 0,5
2	0,53 – 0,54
3	0,61 – 0,81
4	0,99 – 1,28
5	1,30 – 1,68
6	1,76 – 1,94
7	1,96 – 2,26

Para extrair os ovários e o corpo gorduroso foram realizados cortes longitudinais na parte ventral do abdômen do inseto, da cloaca genital até o tórax. Seguidamente, foram separados os externos abdominais, o corpo gorduroso foi extraído retirando primeiro todo o tracto intestinal do animal, assim limpando esta região e não correndo risco de contaminação com resíduos intestinais ao corpo gorduroso, este se encontra junto à parede abdominal tanto do lado esquerdo como do lado direito. Foram utilizadas pinças para retirar este tecido completamente tomando sempre o cuidado de

não retirar a cutícula junto ao mesmo. Antes de extrair o corpo gorduroso (CG), foram extraídos os ovários (OV) que se encontram situados, um de cada lado do tubo digestivo.

As dessecações dos corpora allata (CA) foram realizadas através de uma abertura na cabeça do animal na zona occipital. Inclinado à cabeça do animal para frente e uma vez retirado o tecido muscular e gorduroso que se encontram justo depois do orifício occipital, se pode ver o complexo retrocerebral, formado por corpora cardíaca (CC) e os corpora allatas (CA), que estão entre dois grandes traqueas dorsais dispostas longitudinal e situado em cima do esôfago e do gânglio sub-esofágico.

Devido ao seu reduzido tamanho, os CA sempre foram extraídos com uma parte de CC, que posteriormente intentamos eliminar a maior parte possível deste tecido.

2.3 EXTRAÇÃO DE ACIDOS RIBONUCLEICOS

As extrações de RNA foram realizadas com o Kit de Sigma GenElute Mammalian Total RNA seguindo as instruções do fabricante. Para as extrações de RNA total do corpo gorduroso e ovário, previamente congelados em nitrogênio líquido, foram triturados com um homogenizador mecânico, para os CA, foram congelados com o tampão de lises e foi realizada diretamente a extração de RNA. Uma vez extraído foi realizada a quantificação da concentração e pureza com absorbância a 260 e 280 nm.

2.4 CLONAGEM

A clonagem dos homólogos de FOXO em *B. germanica* foi realizada com PCRs, e complementadas com 5' e 3' RACE.

2.4.1 PCR

A partir do alinhamento das seqüências de FOXO conhecidas de insetos até o momento (*Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* entre outras) junto com as seqüências de FOXO 1 em humano, foram desenhados primers degenerados, tendo assim uma seqüência conhecida em *B. germânica*, Como molda foram utilizados cDNA gerado a partir de RNA poli A de células UM- BGE-1 de *B.germanica*.

As PCRs foram realizadas com a enzima Accutaq (Sigma), segundo normas do fabricante, menos quando foram utilizados primers degenerados, porque para os primers degenerados foram utilizados uma concentração 5 vezes maior do que com primers específicos.

OLIGONUCLEOTIDEOS DEGENERADOS UTILIZADOS:

Tabela 3: Nucleotídeos utilizados para amplificar primeiros fragmentos de FOXO em *B. germânica*

MOL.	NOME PRIMER	SEQUENCIA PRIMER	ESP. OU DEG.
FOXO	Foxo R 1	TCGTCGATGATT(C)GAT(C)CC(T)GAA(G)	
FOXO	Foxo R 2	ACCATCCA(CT)TC(AG)TA(AGT)AT(CT) TG	DEGENERADO
FOXO	Foxo F 1	AA(CT)GC(AGCT)TGGGG(AGCT)AA(CT) (CT)T	DEGENERADO
FOXO	Foxo F 2	CAA(G)ATT(C)TAT(C)GAA(G)TCGGAT(C)	DEGENERADO
FOXO	Foxo F 3	CCT(A/G)TAT(C)TTT(C)AAA(G)GCT(C/A) AAA(G)GGT(C/A)GAT(C)	DEGENERADO

Condições para Foxo:

94 °C	2 min	X 1
94 °C	30 seg	
48 °C	30 seg	X 4
68 °C	1 min	
94 °C	30 seg	
52 °C	30 seg	X 35
68 °C	1 min	
68°C	10 min	X 1

2.4.2 AMPLIFICAÇÃO DOS EXTREMOS 5' E 3' DOS cDNAs

Para obter as seqüências completas de FOXO foram utilizadas as técnicas de 5' e 3' RACE (*Rapid Amplification of cDNA End*). Esta técnica foi descrita inicialmente por Forhman *et al.* (1988) os experimentos foram realizados seguindo instruções do 5' RACE, Version 2.0 (Invitrogen), e seguindo as instruções do 3' RACE f, Version 2.0 (Invitrogen), a partir de 2µg de RNA total obtido de células UM-BGE-1 de *B. germanica*.

Os oligonucleotídeos específicos utilizados nas duas técnicas foram desenhados com base na seqüência de FOXO obtida segundo descrito anteriormente.

Tabela 4: Nucleotídeos utilizados para amplificar extrema 5' prima.

Técnica	Molécula	Nome primer	Seqüência primer
5'RACE	FOXO	FOXO R11	GTTCTGGACCATCCATTCGTAGAT
5'RACE	FOXO	FOXO R10	TGCGAGAGCGTGAGCCTCTTC

Tabela 5: Nucleotídeos utilizados para amplificar extrema 3' prima

Tecnica	Molécula	Nome primer	Sequência primer
3'RACE	FOXO	FOXO F 7	CGTCCAAAATGAAGGCACAGGAAA
5'RACE	FOXO	FOXO F 10	TCGTATCCACAGTCCGAGCCGT

As reações de PCR foram realizadas com 5µl de dC- tailed DNA. Em todas as amplificações utilizou a DNA-polimerasa Ecotaq (Ecogen) seguindo as instruções do fabricante.

Condições das PCRs para 3' RACE:

94°C	2 min	
94°C	30 min	
74°C	1 min	5x
63°C	1 min	
94°C	30''	
74°C	1'30''	45x
63°C	1 min	
74°C	10 min	

Condições das PCRs para 5' RACE:

94°C	2 min	
94°C	30 min	
74°C	1 min	5x
63°C	1 min	
94°C	30''	
74°C	1'30''	45x
63°C	1 min	
74°C	10 min	

2.5 ELETROFORESE DE DNA

A eletroforese se realizou em gel de agarose 1% (p/v), preparados com tampão TBE 0,5X. Em cada poço foram carregados a quantidade adequada de DNA diluído em tampão de carga (Sambrook *et al.*, 1989), com voltagem constante de 100 – 130V logo depois foi realizado um banho com solução de brometo de etídio a 0,2µg/ml em água. A visualização se realizou em um transluminador de luz ultravioleta.

Tabela 6: Condições do Tampão de eletroforese.

Tampão eletroforese TBE 0,5X	
Tris base	44,5 mM
Acido bórico	44,5 mM
EDTA (pH 8.0)	1 mM

2.6 LIGAÇÃO

Todos os fragmentos de DNA conseguidos por PCR foram ligados em pSTBlue-I seguindo as instruções do pAcceptor Vector Kit (Novagen). As transformações do DNA plasmídico foram realizadas com células competentes Novablue de *E.coli* (Novagen), seguindo o procedimento descrito por Sambrook (1989).

2.7 PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDIOS

A purificação do DNA plasmídico se realizou seguindo as instruções de Gen Elute Plasmid Miniprep KIT (SIGMA) a partir de cultivos líquidos incubados overnight a 37°C com agitação constante (250 r.p.m).

2.8 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento do DNA se realizou com o método de terminação da cadeia de dideoxinucleotídeos. Os diferentes clones foram sequenciados em ambos sentidos utilizando os oligonucleotídeos T7 e SP6 (presentes no vetor de clonagem), assim como outros internos específicos, com o sistema ABI de sequenciamento automático por fluorescência. Estas seqüências se realizaram no Serviço de sequenciamento de DNA do Instituto de Biologia Molecular de Barcelona do CSIC de Barcelona.

2.9 RT-PCR SEMIQUANTITATIVA

Para determinar as quantidades relativas dos UNAM se realizou a técnica de RT-PCR semiquantitativa. Esta técnica tem como princípio a retro transcrição de uma quantidade constante de RNA, que serve como molde para realizar PCR com oligonucleotídeos específicos, permitindo determinar a abundância relativa de cada transcrito. Previamente a retro transcrição o RNA foi tratado com DNase para eliminar qualquer traço de DNA genômico.

Procedimento:

- No volume inicial de 10µl acrescentar os seguintes reagentes
300ng – 1µg de RNA
1µl Tampão da DNase
1µl RQ1 RNase-Free DNase (PROMEGA)
- Incubar 30' a 37°C.
- Acrescentar 1µl de solução Stop da DNase a reação e incubar por 10' a 65°C para que inative a reação da enzima.
- Colocar em gelo

Retrotranscrição:

- Incubar as amostras durante 5' a 75°C para a desnaturalização do RNA.
- Tirar e colocar em gelo para evitar hibridação entre as cadeias de RNA.
- Colocar em cada tubo
 - 4 µl tampão de reação 5X (Invitrogen)
 - 0,5 µl Random primers (hexâmeros de 500ng/ µl)
 - 0.4 µl de 10 µM de cada dNTP.
 - 2 µl de 0.1 M DTT
 - 1 µl de 40 unidades/ml de RNAsin Ribonuclease Inhibitor (Promega)
- Equilibrar a reação durante 10' a temperatura ambiente
- Acrescentar 200 unidades de SuperScript™ II RNase H⁺ Reverse Transcriptase (Invitrogen)
- Equilibrar a reação durante 10 minutos em temperatura ambiente.
- Incubar por 50' a 42°C para a retrotranscrição.
- Incubar durante 10' a 75°C para terminar a reação.
- Deixar equilibrar a reação a temperatura ambiente.
- Acrescentar 20µl de TE pH 8.0

PCR:

As condições de PCR se realizaram dentro da zona de amplificação linear de cada transcrito. O mesmo produz a quantidade de DNA obtido pela PCR, ou seja proporcional a quantidade de cDNA inicial e por tanto a quantidade de mRNA que queremos analisar.

Para todos os transcritos analisados FOXO, ACTINAS, IR, TOR, S6K, VG, SINTASA, foram realizadas linearidades, nas quais as PCRs continham 4 amostras com as condições adequadas para cada transcrito, sendo ao completar uma quantidade de ciclos analisada é retirada uma amostra e contado cinco ciclos mais retira-se outra amostra, com três

pontos distintos de quantidades de ciclos para verificar que não tenha saturação da amostra e descobrir uma quantidade de ciclos adequada a cada transcrito.

Concentrações finais dos Reagentes

1X	Tampão da PCR
1,5mM	MgCl ₂
200µM	de cada dNTP
200nM	Primer reverse
200nM	primer
1µl	cDNA
1 uni	Taq DNA polimerase
Volume final 25µl em H ₂ O	

As condições de PCR se realizaram dentro da zona de amplificação linear de cada transcrito.

Concentrações dos Reagentes

1X	Tampão da PCR
1,5mM	MgCl ₂
200µM	de cada dNTP
200nM	Primer reverse
200nM	primer
1µl	cDNA
1 uni	Taq DNA polimerase
Volume final 25µl em H ₂ O	

OLIGONUCLEOTIDEOS UTILIZADOS:

Tabela 7: Nucleotídeos utilizados para amplificar a região utilizada para caracterizar a expressão do fragmento de FOXO, TOR, IR, S6K e VIT em fêmeas adultas de 0 a 7 dias

MOLECULA	NOME PRIMER	SEQUENCIA PRIMER	TAM. FRAG.
FOXO	FOXO R 5	GAAGTCGTAAGTCGGCTGGTACG	520 pb
FOXO	FOXO F 7	CGTCCAAAATGAAGGCACAGGAAA	
TOR	TOR R10	GCAGTCTGTCCCACCACATCTT	
TOR	TORF10	CTGGGAGAAGGCATTACATTCTA	
S6K	S6K F5	CAAAGTCACAGGCCAAGATGCAG	
S6K	S6K R4	AGTGCTCCTAATGACCACCAGTC	
IR	IR R4	TAGGTCGCGATGTACATACTTCTT	
IR	IR F4	GTGCCATTAAGACTGTAAATGAAC	
VIT	VIT F	TGAAATGCGAAGGAAAGCCAA	
VIT	VIT R	CCTGTCAAGACCTGAAATGTA	

2.10. SOUTHERN BLOT

2.10.1 ELETROFORESE E TRANSFERÊNCIA DO DNA.

A eletroforese do DNA se realizou como descrito anteriormente. Posteriormente, os géis são desnaturalizados durante 30 minutos em uma solução de desnaturalização em agitação constante, e a continuação realizou se uma neutralização outros 30 minutos. Em seguida o DNA foi transferido overnight a uma membrana de nylon Hybondy-N (Amersham) por capilaridade em uma solução SSC x10. Depois de fixado o DNA a membrana mediante irradiação com luz ultravioleta (UVStratalinker 2400, Stratagene).

Soluções:

Solução de desnaturalização

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Solução de neutralização

NaCl	1,5 M
Tris-HCl (pH7,2)	0,5 M

SSC x 10

NaCl	1,5 M
Citrato sodico	150 mM

Ajustar o pH a 7 e filtrar.

2.10.2 HIBRIDAÇÃO E DETECÇÃO

As membranas com o DNA fixado, se pre-hibridam em uma solução de hibridação, durante 1h a 42°C em agitação constante. Depois da pré-hibridação, se acrescentou a sonda correspondente marcada com fluoresceína deixando em agitação a 42°C overnight. Para detectar a marcação se seguiu as instruções do Gene Image CDP-Star Detection module (Amersham).

Solução de Hibridação

SSC	2x
SDS	0,1%(p/v)
Sulfato de dextrano	5% (p/v)
Liquido de bloqueio	1/20

2.11 MARCAÇÃO DE SONDA COM FLUORESCÊNCIA.

As sondas utilizadas nos Southern blot, das diferentes RT-PCRs, foram conseguidas por PCRs utilizando diferentes primers, específicos para cada transcrito, descritos em 2.9 resultados. Como molde foram utilizados cDNAs correspondentes de cada transcrito previamente clonados com vetor pSTBlue1. Estas PCRs foram purificadas com o Kit Sigma GenElute PCR Clean-up, e a continuação marcadas com fluorescência segundo instruções do Gene Images Random Labelling Module (Amersham).

2.12 RNA DE INTERFERENCIA *IN VIVO*

Uma aproximação atual da determinação da função das proteínas nos organismos que não se podem modificar geneticamente de forma estável, como e o caso da *B. germânica*, consiste no silenciamento transitório dos transcritos que codificam.

Este procedimento se baseia no tratamento com uma fita dupla de RNA (dsRNA) idêntica a um fragmento do mensageiro que se pretende silenciar, o qual, quando penetra nas células se processa em fragmentos de 21-23 nucleotídeos que desencadeiam a degradação do mensageiro endogeno da diana (Plasterk, 2002, Schutze, 2004).

2.12.1 OBTENÇÃO DO RNA DE FITA DUPLA (DSRNA):

- Clonagem

O primeiro passo foi realizar a clonagem da região de FOXO que se utilizaram para a síntese de dsRNA.

Tabela 8: Nucleotídeos utilizados para amplificar o duplo RNA.

MOLECULA	NOME PRIMER	SEQUENCIA PRIMER	TAM. FRAG.
FOXO	Foxo R 5	GAAGTCGTAAGTCGGCTGGTACG	520 pb
FOXO	Foxo F 7	CGTCCAAAATGAAGGCACAGGAAA	

Linealização do DNA plasmidico:

Para a síntese dos correspondentes dsRNAs tem que partir de um fragmento linear de DNA que contem, em um extremo o promotor T7, ou SP6, e um extremo 5' no outro extremo. Foi realizada uma digestão overnight com 30-40 µg do plasmidio com Bam HI e Sal I.

Depois de realizada a digestão dos fragmentos os mesmo foram precipitados com fenol-cloroformio/isoamilico (25:24:1). O precipitado foi resuspendido em 11 µl de H₂O DPEC.

Sínteses de dsRNA:

- As reações de síntese de RNA de fita simples (ssRNA) foi realizada de forma independente.
- Em m volume final de 50 μ l:
 - 23 μ l fragmento linear do DNA plasmidico
 - 10 μ l 5x Promega Buffer (Promega)
 - 4 μ l 100mM DTT (Promega)
 - 1 μ l RNAsin Ribonuclease Inhibitor (40 μ / μ l) (Promega)
 - 10 μ l 10 mM cada rNTP (Amersham)
 - 1,5 μ l SP6 RNA-polimerase (15 μ / μ l) (Promega)
 - ou T7 RNA-polimerase (20 μ / μ l) (Promega)
- Incubar 1h a 37°C.
- Verificar o correto funcionamento das reações com eletroferese (1 μ l de cada reação)
- Juntar as duas reações de ssRNA (Sp6 e T7 polimerase.).
- Incubar em um banho a 95°C durante 10 minutos.
- Deixar que a temperatura diminua progressivamente e naturalmente ate cegar a temperatura ambiente, permitindo assim a hibridação das fitas simples complementares de ssRNA.
- Concentrar os dsRNAs por precipitação por fenol/cloroformio/etanol. Resuspender el precipitado em 39,5 μ l de H₂O dpec.
- Realizar tratamento conjunto com DNasa e RNasaA para eliminar o DNA plasmidico, assim como o ssRNA que não se hibridou.
- Em um volume final de 50 μ l:
 - 5 μ l Tampão da DNasa (x10) (Promega)
 - 5 μ l DNase/RNase-free (1 μ / μ l) (Promega)
 - 0,5 μ l RNaseA (10 μ g/ μ l) (SIGMA)
- Incubar 15 min a 37°C
- Limpar e concentrar com outra precipitação fenol/cloroformio/isoamilico. Resuspender em 40 μ l de H₂O dpec.

2.12.2 PREPARAÇÃO E INSERÇÃO DO DSRNA:

A concentração do dsRNA foi determinada por leitura da densidade óptica em um biofotometro (Eppendorf). O dsRNA foi diluído em solução salina ringer filtrado com filtro millex de 0,22µm, ate obter a concentração desejada para injetar 1µl em fêmeas de quinta fase ninfa, sexta fase ou primeiro dia de adulta. O dsRNA foi injetado diretamente na cavidade abdominal do inseto, utilizando uma seringa HAMILTON.

2.12.3 DETECÇÃO DO NÍVEL DE INTERFERÊNCIA.

Logo depois de realizada a interferência, foram realizados experimentos moleculares para detectar a redução do mRNAs de FOXO. As PCRs foram realizadas com um primer dentro e fora da região utilizada para produzir a fita dupla de RNA.

Seqüência dos primers:

OLIGONUCLEOTIDEOS UTILIZADOS:

Tabela 9: Nucleotídeos utilizados para amplificar a regio utilizada para verificar a eficácia da técnica de RNAi.

MOLECULA	NOME PRIMER	SEQUENCIA PRIMER	TAM. FRAG.
FOXO	Foxo R 7	AGTCTGTAGGA ACTCTCCACCTT	480 pb
FOXO	Foxo F 6	CTGTCGTTACACAACCGCTTCAT	

2.13 EXPERIMENTO ALIMENTADOS E NÃO ALIMENTADOS

Foram desenhados experimentos com animais, fêmeas *B. Germânica*, no qual foram retirados os alimentos, uma ração pra cachorro, comida utilizada como alimento diário no insectario, lugar aonde e mantida a colônia de *B. germânica*, no ultimo dia de larva da *B. germanica* sendo que estes animais foram mantidos sem alimento ate o terceiro dia de adulto, tendo somente água. Nesse experimento também utilizamos a mesma quantidade de animais sob as mesmas condições, mas com nutrientes como controles. Todos os botes com os animais a serem analisados foram mantidos em condições normais de desenvolvimento, no insectario com temperatura e ambientes adequados para seu desenvolvimento. Os botes contendo os animais que foram analisados eram verificados todos os dias pela manha e pela tarde para certificar de que estavam todos bem e vivos. Ao completar 3 dias de adulto, foram realizadas as dessecações dos tecidos do corpo gorduroso e ovário, estes tecidos foram congelados em freezer -80 C, e posteriormente foram realizadas extrações de RNA, e analises das expressões destes transcritos via técnicas de RT-PCR e Sourthern Blot.

2.13.1 EXPERIMENTO ALIMENTADOS E NÃO ALIMENTADOS E DEPOIS ALIMENTADOS APOS 6 HORAS.

Apos o primeiro experimento com animais alimentados foram desenhados outros experimentos com, fêmeas de *B. Germânica*, no qual os animais foram divididos em três grupos: 2 botes contendo 4 animais em cada bote foram retirados os alimentos, no ultimo dia de larva sendo que estes animais foram mantidos sem alimento ate o quinto dia de adulto, com somente água. O terceiro bote que pertence a este experimento possuía a mesma quantidade de animais sob as mesmas condições, mas com nutrientes como controles. Todos os botes com os animais a serem analisados foram mantidos em condições normais de desenvolvimento, no insectario com temperatura e ambientes adequados para seu desenvolvimento. Os botes contendo os animais que foram analisados eram verificados todos os dias pela manha e pela tarde para certificar de que

estavam todos bem e vivos. Ao completar 5 dias de adulto, foram realizadas as dessecações dos tecidos do corpo gorduroso e ovário, pela manhã dos botes de animais alimentados e não alimentados estes tecidos foram congelados em freezer -80 C, e posteriormente foram realizadas extrações de RNA, e análises das expressões destes transcritos via técnicas de RT-PCR e Sourthern Blot. Ao terceiro bote foram colocados alimentos e mantidos desta maneira por 6 horas, ao final desse período foram realizadas as dessecações e análises descritas acima, para os outros animais.

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](#)