

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Padrões de atividade da ornitina decarboxilase (ODC) e sua regulação hormonal sob estresse de temperatura em *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae)**

**Valesca Veiga Cardoso Casali**

**Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências**

**Orientadora Profa. Dra. Alice Kalisz de Oliveira**

**Co-orientação Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira**

**Porto Alegre, março de 2005**

## **Instituições e Fontes Financiadoras**

As pesquisas foram realizadas nos Laboratórios de Genética do Desenvolvimento do Departamento de Genética e no Laboratório de Estresse Oxidativo (LEO) do Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foram subvencionadas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

A aluna recebeu bolsa de estudo concedida pelo CNPq.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Arno e Noely, que tornaram tudo possível;

Ao meu amor Emerson Andre Casali companheiro de luta e de vida, te amo;

Aos meus orientadores, pela paciência, incentivo e carinho dedicados a mim durante estes anos que estivemos juntos;

À professora Dra. Luciane Passaglia todo meu carinho e agradecimento pela grande ajuda que ela sempre reservou para mim e para todo e qualquer aluno deste curso de pós-graduação;

À professora Dra. Vera L. V. Gaiesky por ter me ajudado e cedido seu laboratório tantas vezes sempre com muito carinho;

A professora Dra. Karen Haag, pela ajuda no início desta tese e também por ter me apresentado um outro professor digno de ser assim chamado de "professor" o Dr. Henrique B. Ferreira, muito obrigado por sua atenção e auxílio;

Às minhas amigas do Laboratório de Genética Vegetal por sempre fazerem parte da minha rotina e terem sido e serem minhas verdadeiras amigas;

Aos eternos camaradas do Laboratório de Drosophila deste Departamento, eles sabem o que é ser companheiro;

Um especial abraço a doutorando Mônica L. Blauth, ela é mais do que uma amiga. Ela com certeza é um destes profissionais da área que estamos precisando mais na ciência brasileira;

Aos amigos que me deram grande força Fabiano Torres e Daniel G, bem como todos os

outros que me auxiliaram durante essa tese;

Aos bolsista que trabalharam comigo e tornaram esta tese possível, Felipe Ricachenevsky, Priscilla Ribeiro Prestes, beijos e beijocas;

Ao Elmo e a Elen super-amigos, que me ouviram tantas vezes e quebraram muitos muito galhos, abraços eternos.

## Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	7
Resumo	8
Abstract	10
<b>Introdução</b>	12
1.1. Aspectos da biologia do inseto praga <i>Anastrepha fraterculus</i>	14
1.2 . Controle populacional do inseto-praga <i>Anastrepha fraterculus</i>	21
1.3. Flutuação populacional da <i>Anastrepha fraterculus</i> no sul do Brasil	27
1.4. Ornitina decarboxilase	34
1.5. Poliaminas e sua importância	40
1.6. Ornitina decarboxilase e a influência hormonal	43
1.7. Hormônio juvenil	45
<b>Objetivos</b>	48
<b>Capítulo I</b>	49
Ornithine decarboxylase activity during the development of <i>Anastrepha fraterculus</i> (Diptera, Tephritidae)	
<b>Capítulo II</b>	59
Changes in ornithine decarboxylase activity in response to temperature stress and stimulation of the juvenile hormone in <i>Anastrepha fraterculus</i> (Diptera, Tephritidae)	

<b>Capítulo III</b>	88
Effect of $\alpha$ -difluormethylornithine on <i>Anastrepha fraterculus</i> (Diptera, Tephritidae) ovary size	
<b>Discussão</b>	104
<b>Perspectivas futuras</b>	120
<b>Referências bibliográficas</b>	122
<b>Anexo</b>	146

## Lista de Abreviaturas, símbolos e unidades

ODC	Ornitina decarboxilase	M	molar
GTP	Guanosina trifosfato	pmol	picomol
$\alpha$ -DMFO	$\alpha$ -difluormetilornitina	$\mu$ l	microlitro
HJ	Hormônio juvenil	mM	milimolar
JH	Juvenile hormone	ng	nanograma
ORF	Fase de Leitura Aberta	mg	micrograma
Km app	Constante de Michaelis		
Vmax	Velocidade Máxima		
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro		
mRNA	RNA mensageiro		
°C	Graus centígrados		
VBP	Valor Bruto da Produção		
CL 50	Concentração letal 50		
MIP	Manejo Integrado de Pestes		
SIT	Técnica do Inseto Estéril		
VD	Velocidade de desenvolvimento		
PLP	Piridoxal 5'-fosfato		
UTR	Região não traduzida		
SAMDC	s-adenosilmetionina decarboxilase		
SSAT	Espermidina/espermina acetiltransferase		

## Resumo

Ornitina decarboxilase (ODC) (EC 4.1.1.17) é a primeira enzima que desencadeia a síntese das poliaminas putrescina, espermidina e espermina nas células. As poliaminas são cátions alifáticos envolvidos no controle de crescimento e são requeridas para uma variedade de eventos biológicos como síntese de proteína, replicação do DNA e divisão celular. No presente estudo, a atividade da ODC foi medida em ovo, larva, pupa, fêmea jovem e adulta de *Anastrepha fraterculus*. Durante o desenvolvimento de *A. fraterculus*, a atividade da ODC apresentou flutuações. Entre os estágios anteriores à emergência, o ovo teve a mais alta atividade específica, provavelmente devido à embriogênese que é caracterizada pela alta taxa de divisão celular. A atividade da ODC foi também altamente significativa em ovários e corpo gorduroso de fêmeas jovens possivelmente devido ao avanço da oogênese e vitelogênese. Parâmetros cinéticos ( $K_m$  app e  $V_{max}$ ) para atividade da ODC foram determinados em pupa, larva e ovário de fêmeas jovens e apresentaram grande variação. A guanosina trifosfato (GTP) demonstrou afetar grandemente estes parâmetros cinéticos, sugerindo estarem ocorrendo modificações pós-traducionais. Fêmeas jovens ( $\pm 4$  dias) de *A. fraterculus* também foram analisadas quanto ao efeito do estresse de temperatura (6°C e 20/6°C) e da aplicação tópica do hormônio juvenil isolados ou em conjunto. Os principais resultados foram que a concentração de 500 ng e os tempos de incubação de 3, 7 e 18 horas aumentaram a atividade da ODC. As fêmeas mantidas a 6°C e 20/6°C tiveram atividade da ODC mais alta do que as fêmeas mantidas a 25°C. O tempo de incubação de 1 hora com o HJ aumentou a atividade da ODC no

tratamento de 6°C, quando comparado com fêmeas mantidas apenas com o estresse de temperatura sem a adição do hormônio (controle). No entanto, no tratamento das fêmeas mantidas a 20/6°C, somente os tempos de 3 e 18 horas de incubação com o HJ demonstraram aumento na atividade da ODC quando comparadas com o tempo de incubação de 1 hora e com as fêmeas mantidas sem a adição do hormônio (controle). Os machos não apresentaram diferença na atividade da ODC quando submetidos ao estresse de temperatura de 6°C, mas as medidas do apódema ejaculatório foram maiores a 25°C que a 6°C. Estes resultados podem ser considerados como parte de um processo adaptativo a mudanças ambientais.

Por último, observamos que as medidas dos ovários (comprimento e largura) de fêmeas jovens mantidas com o inibidor da ODC,  $\alpha$ -difluormetilornitina ( $\alpha$ -DFMO; 50mM) são diferentes significativamente quando comparadas com às medidas das fêmeas controle sem o inibidor.

O conjunto desses resultados indica a importância da relação entre ODC, HJ e estresse de temperatura para a *A. fraterculus*. Como esta mosca é uma das piores pragas para a fruticultura brasileira, estes dados, além de contribuírem para um maior conhecimento de sua biologia básica, poderão também ser usados para a escolha de melhores estratégias de controle populacional.

## Abstract

Ornithine decarboxylase (ODC; EC 4.1.1.17) is the first enzyme in the leading pathway to the biosynthesis of the polyamines putrescine, spermidine, and spermine in cells. Polyamines are aliphatic cations involved in the control of growth, being required for a wide variety of biological events like protein synthesis, DNA replication and cell division. In the present study, ODC activity was measured in samples of *Anastrepha fraterculus*' egg, larva, pupa, young and mature females. ODC activity showed fluctuations during *A. fraterculus*' life development. In its earlier stages, prior to adult emergence, the egg has high ODC specific activity probably due to embryogenesis, which is characterized by a high rate of cell division. The enzyme activity is also significantly high in the ovary and fat body of young females possibly related to the increased oogenesis and vitellogenesis. Kinetic parameters ( $K_m$  app and  $V_{max}$ ) for ODC activity were determined for pupa, larva and young ovary and they exhibited great variation. Our results using guanosine triphosphate (GTP) showed that the great variation in the kinetic parameters might be accounted by post/translational modifications. *A. fraterculus* females (4 day old) were also submitted to temperature stress (6°C and 20/6°C), to topical application of juvenile hormone (JH) or to both treatments. JH concentration of 500 ng and time incubation of 3, 7, and 18 hours increased ODC activity. Females reared at 6°C and 20/6°C showed higher ODC activity than at 25°C. The treatment of 6°C and JH incubation for 1 hour increased ODC activity when compared to 6°C treatment only. However, in the treatment of 20/6°C, only after 3 or 18 hours of JH incubation showed ODC activity higher than controls (20/6°C) or 20/6°C plus one hour of JH incubation. Males (15 day old) did not show ODC activity difference when reared at 6°C or 25°C but the ejaculatory apodeme

measurements were higher in those reared at 25°C than in those at 6°C. The results can be considered an adaptive process to environmental changes.

We observed that in *A. fraterculus* young females kept in the presence of the ODC inhibitor  $\alpha$ -difluormethylornithine ( $\alpha$ -DMFO; 50 mM) the ovarian measurements (length and width) were shorter than those of females without  $\alpha$ -DMFO.

All these results show how important is the relationship among ODC, JH, and temperature stress to *A. fraterculus*. As this fly is one of the worst pest to Brazilian fruit culture, these data, besides contributing to better know its basic biology, can also be used to choose the best strategy to its populational control.

## Introdução

O desenvolvimento econômico do sul do Brasil está basicamente centrado na agropecuária, onde tem sido empregado um grande esforço para a geração de tecnologia nacional que aumente a produtividade e a eficiência neste setor. No estado do Rio Grande do Sul, as monoculturas encontram-se amplamente distribuídas e a situação geográfica, entre os paralelos 27° e 33° do Hemisfério Sul, possibilita, principalmente, o cultivo de fruteiras de clima temperado. Sob a ótica do Valor Bruto da Produção (VBP) da agropecuária, a produção de frutas no Rio Grande do Sul (RGS) é uma das maiores em banana, laranja, maçã e uva, configurando, nos últimos anos, um crescimento expressivo em relação à área cultivada. Destes quatro produtos, um dos mais representativos é a maçã (*Malus domestica L.*). O RGS é o segundo maior produtor nacional de maçã sendo sua produção de aproximadamente 43 % da produção nacional. A região de Santa Catarina é a maior produtora brasileira de maçã; na safra de 2002/2003 foram produzidas aproximadamente 50% da produção de todo o País (Embrapa/2004; Atlas Socioeconômico Rio Grande do Sul/2004).

As variedades de maçã mais cultivadas no Brasil (Gala, Fuji, Golden e Red Delicious) são colhidas, principalmente, na Região Sul (Rio Grande do Sul e Santa Catarina), com uma produção física de 93 %. Isto ocorre porque as maçãs, que apresentam maior cotação no mercado mundial, são produzidas em altitudes superiores a 1000 metros acima do nível do mar, associadas às maiores amplitudes térmicas, o que lhes confere maior sabor e cor. A partir de meados da 1970, ocorreram alterações no panorama da produção e da comercialização dessa fruta, onde a produção nacional vem se ampliando significativamente, enquanto

diminuem as quantidades importadas. Além disso, a maçã brasileira tende a aumentar sua presença no mercado mundial. Notadamente, o crescimento das vendas externas, a partir dos últimos anos de 1980, levou o país a figurar em entre os grandes exportadores de maçã (Embrapa/2003).

A introdução, em escala comercial, da cultura da macieira nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, proporcionou o surgimento de espécies prejudiciais à produção desta, como a mosca-das-frutas sul americana *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera, Tephritidae). Atualmente, cerca de 2% da produção de maçãs no Brasil é perdida devido ao ataque por *A. fraterculus* de tal forma que, segundo dados da EMATER/2000 e do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA/2003), hoje elas se enquadram em programas prioritários de combate. Este valor pode ser considerado biologicamente insignificante, mas interfere significativamente na margem de lucro de uma agricultura. A infestação pode ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento do fruto. Em frutos ainda verdes, a introdução do ovopositor da fêmea causa deformação e ou queda dos mesmos. No caso de ocorrerem em estágios mais avançados do fruto, o dano interno, causado pelo desenvolvimento larval no interior do fruto, passa a ser mais crítico (Orth *et al.*, 1986).

### 1.1. Aspectos da biologia do inseto praga *Anastrepha fraterculus*

A *Anastrepha fraterculus* é uma mosca-das-frutas que pertence à ordem Diptera (com asas posteriores transformadas em balancins), à subordem Brachycera (com antenas, normalmente com três segmentos), série Schizophora (com fissura ptilinal) e à família Tephritidae (com nervura subcostal dobrada em ângulo) (Zucchi, 2000). Esta família é cosmopolita, com distribuição limitada pela disponibilidade de hospedeiros e condições climáticas extremas, e as espécies que a compõem podem ser divididas em dois grandes grupos, com base em suas características fisiológicas e ecológicas. No primeiro grupo, incluem-se as espécies univoltinas que apresentam uma única geração anual e diapausa, ocorrendo em regiões temperadas, como o gênero *Rhagoletis*. No segundo grupo, encontram-se as espécies multivoltinas que apresentam mais de uma geração anual, sem diapausa e que se distribuem pelas regiões tropicais, como os gêneros *Anastrepha*, *Ceratitidis* e *Dacus* (Bateman, 1972).

As espécies de moscas-das-frutas que causam danos à produção de frutos no Brasil pertencem aos gêneros *Anastrepha* e *Ceratitidis*. Os demais gêneros de tefritídeos como *Dacus*, *Bactrocera*, *Toxotrypana* e *Rhagoletis* não ocorrem no país ou, quando presentes, infestam plantas nativas que não apresentam interesse econômico (Morgante, 1991). O gênero *Anastrepha* é neotropical, com 185 espécies descritas, sendo que, até o momento, foram encontradas noventa e quatro espécies no Brasil (Zucchi, 2000).

*A. fraterculus* (figura 1) distribuiu-se, exclusivamente, no continente americano, sendo encontrada do norte da Argentina até o sul dos Estados Unidos. Porém, é representativa apenas em países como o Uruguai, Argentina, Paraguai e Brasil (figura 2). No sul do Brasil, é a

espécie dominante na região produtora de maçã (Fraiburgo-SC, São Joaquim-SC e Vacaria-RS), com cerca de 90% das capturas em pomares comerciais (Bleicher *et al.*, 1982; Canal *et al.*, 1993; Salles, 1995; Nora *et al.*, 2000). Contudo, o conhecimento de sua biologia básica ainda é incipiente, se comparado a outras espécies do gênero, possivelmente devido à existência de pequeno número de grupos de pesquisa e à escassez de recursos para a pesquisa junto aos órgãos financiadores governamentais.



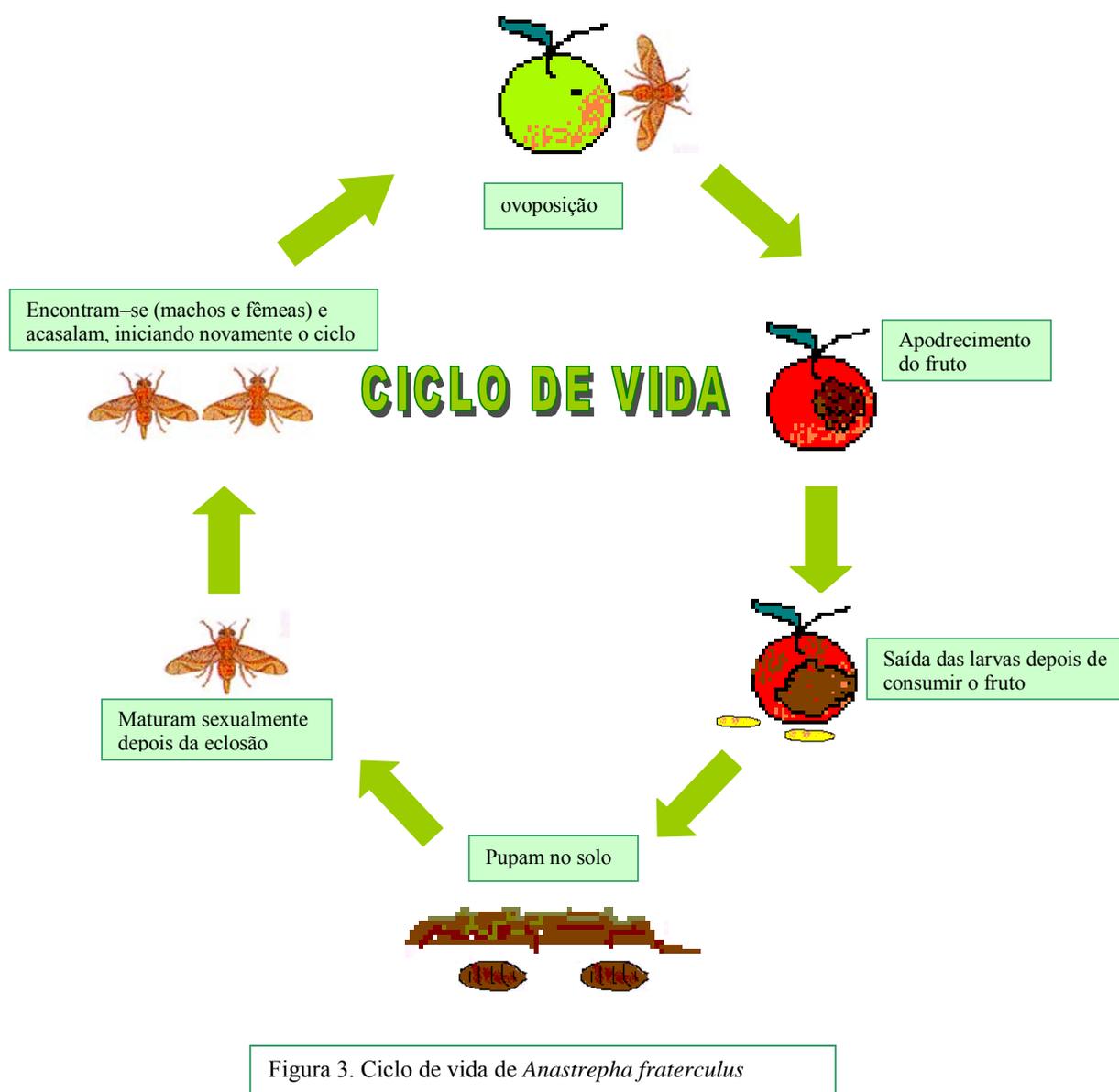
Figura 1. *Anastrepha fraterculus* (fêmea).



Figura 2. Distribuição geográfica da *Anastrepha fraterculus* ocorrendo desde o sul do Texas até o norte da Argentina; sua importância econômica varia ao longo da área de distribuição (setas apontam o local onde ela tem status de praga) (Malavasi *et al.*, 2000).

O ciclo larval e adulto dessa espécie ocorre em vegetais (figura 3); as fêmeas apresentam um período de ovoposição de 65 dias, existindo uma fase de pré-ovoposição de 10 dias, pois elas eclodem com os ovários ainda não totalmente desenvolvidos, consumindo alimentos ricos em proteínas, necessários para completar o desenvolvimento ovariano. Quando maduras

reprodutivamente, são fecundadas e selecionam o fruto hospedeiro para depositar seus ovos (Salles, 1993).



Em condições de laboratório com temperatura constante de 25°C, as larvas de *A. fraterculus* eclodem depois de um período médio de 72 horas após a ovoposição em papaia

(*Carica papaya L.*) (Nascimento e Oliveira, 1996), alimentando-se da polpa deste fruto hospedeiro até completarem os três instares larvais durante uma média de 14 dias. Após o término do desenvolvimento, larvas no final do 3º instar deixam o fruto e pupam no solo. Finalizando o estágio pupal, que dura aproximadamente 13 dias, os imagos emergem dos pupários, iniciando um novo ciclo (figura 4). Na natureza, estes tempos de desenvolvimento podem variar de acordo com uma série de fatores, especialmente a temperatura.

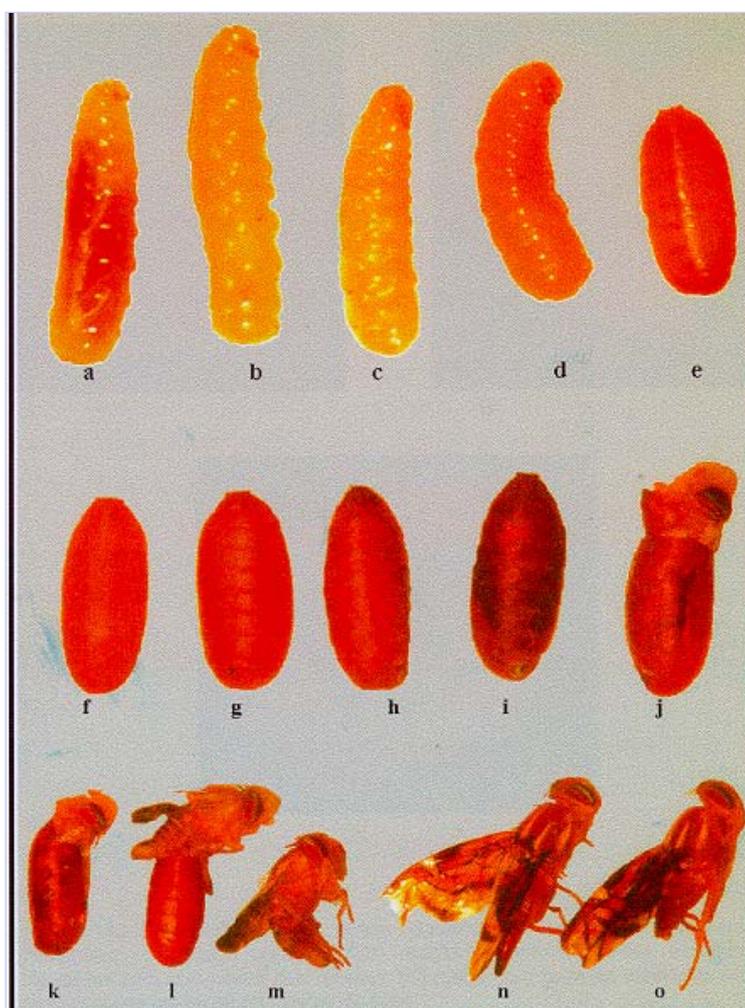


Figure 4. Desenvolvimento ontogenético de *Anastrepha fraterculus*.  
a. larva de segundo instar; b. larva de terceiro instar; c-d. pré-pupa; e-i. pupários (e, 0 h; f, 24 h; g, 120 h; h, 216 h; i, 312 h); j-m. eclosão do imago; n. fêmea, 30 dias; o. macho, 30 dias (Da Cruz *et al.*, 2000).

Fêmeas maduras escolhem como hospedeiros principalmente frutos da família das Mirtáceas, como guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg), feijoa (*Feijoa sellowiana*) e uvalha (*Eugenia uvalha* Camb). *A. fraterculus* é considerada uma das espécies mais polífagas, desenvolvendo-se em 67 espécies de hospedeiros (Zucchi, 2000).

O tamanho populacional de uma espécie depende, entre outros fatores, do potencial reprodutivo da mesma. Uma caracterização do aparelho reprodutivo das fêmeas de *Anastrepha* é apresentado por Da Cruz *et al.* (2000). Aqui descreveremos apenas os principais eventos da oogênese dos tefritídeos, os quais ocorrem em cerca de seis dias. No primeiro e segundo dia, a partir do ovariolo localizado no gemário, dois ou três folículos pré-vitelogênicos são formados. A célula que formará o oócito é diferenciada daquelas que formarão as células do trofocisto por ser menos granular e menos basófila. No terceiro dia, há um aumento no tamanho do trofocisto e, também, um aumento no diâmetro da vesícula germinal; logo após, no quarto dia, um 4º folículo aparece no interior do ovariolo, aumentando o crescimento do folículo mais velho, o que indica o período de vitelogênese. As células do folículo começam a sofrer diferenciação e são rodeadas pelos trofocistos, cujas células têm uma forma cuboidal. A função nutritiva dos trofocistos pode ser observada, neste momento, pelas protuberâncias que se ligam ao citoplasma do oócito.

No quinto dia, as células colunares do folículo rodeiam o oócito maduro e começam a secretar a membrana vitelínica. Adicionalmente, um grupo de células foliculares mais distantes, invaginarão no espaço entre os trofocistos, que começam a degenerar; estas células contribuem para a formação da micrópila e do córion. Finalizando, no sexto dia, existem cinco folículos no ovariolo, o mais velho é o oócito maduro, envolto pelo córion e pela membrana vitelínica. Neste momento, o núcleo do oócito estará na metáfase da primeira divisão celular

(Da Cruz *et al*, 2000).

Os machos de tefritídeos apresentam geralmente um par de testículos (figura 5) de formato piriforme e coloração amarela. Os testículos são estruturas rígidas que podem ser divididas em grandes zonas com desenvolvimento gamético diferencial; a partir da extremidade apical existe a zona do gemário, a dos espermatócitos, a das espermatídes e bandas de esperma. Associada a esta região, há uma vesícula seminal. As células germinativas primordiais encontram-se no gemário; a medida que sofrem as modificações inerentes à espermatogênese, vão dando origem as demais zonas até a formação dos espermatozóides maduros. E estes não ficam individualizados, mas formam estruturas em forma de uma escova flagelada (Williamson, 1989).

Associado aos testículos, existe um sistema tubular de onde partem os vasos deferentes que se unem e formam o ducto ejaculatório, e da união destes forma-se o epidídimo, que desemboca no apódema ejaculatório (figura 5) terminando no edeago. Há também glândulas acessórias, possuindo forma tubular e tamanho variável (Williamson, 1989).

O conhecimento do aparelho reprodutor masculino e feminino, e especialmente de seu potencial reprodutivo, é extremamente importante pois dele dependerá, além da densidade de indivíduos que migrarão entre diferentes regiões geográficas, o entendimento do tamanho populacional da mosca em uma determinada região.



## 1.2. Controle populacional do inseto-praga *Anastrepha fraterculus*

*A. fraterculus* é considerada uma praga primária da maçã e seu controle populacional é feito quimicamente, impedindo as fêmeas de ovopositar e causar danos ao fruto. De um modo geral, o controle químico, até as décadas passadas, era feito por três tipos de manejo: 1) utilização de armadilhas tóxicas; 2) pulverização de inseticidas; 3) fumigação pós-colheita (Aluja, 1994). Entretanto, além do alto custo para a obtenção de moléculas ativas, com o aumento mundial na produção de frutíferas, o uso sistemático de inseticidas tem causado prejuízos ambientais inaceitáveis. Sua ação também aumenta a probabilidade de surgimento de pragas secundárias e diminui as taxas naturais de parasitismo (Ehler *et al.*, 1984; Soto-Manatiu *et al.*, 1987; Kovaleski e Ribeiro 2003; Fachinello, 2003).

Todavia, na espécie *A. fraterculus*, o uso de inseticidas organofosforados continuam sendo o agente básico de controle populacional, apesar do grande esforço dos pesquisadores da área para inverter esta situação. Geralmente, o seu controle é feito por pulverizações totais e/ou por iscas tóxicas, com altos gastos por hectare em cada safra (Kovaleski e Ribeiro 2003; Scoz *et al.*, 2004).

O produto comercial utilizado a mais tempo e que aparentemente tem mantido uma eficiência satisfatória é o Lebaycid (500CE, Bayer). Este inseticida é quimicamente composto por 0,0-dimetil-0 (3-metilmercapto-4-metiltiofenil)-tiofosfato denominado fention. O fention, atua como uma substância tóxica, gástrica ou de contato. A substância ativa possui um efeito inicial satisfatório, uma ação relativamente longa, assim como um notável efeito de profundidade. Resultados obtidos por Da Cruz *et al.* (1997) mostraram que o bioensaio por contato residual foi significativamente mais tóxico quando comparado com o de administração

oral. No primeiro, a CL 50 foi 18,58 vezes menor. Outros resultados também mostraram que o tempo de exposição ao inseticida, associado ao sexo e à idade da mosca, influenciam os níveis de toxicidade do fention, sugerindo um mecanismo de desintoxicação dependente da condição metabólica da mosca quando ela é submetida a um agente tóxico (Humeres *et al.*, 1999).

Com o uso de inseticidas químicos, o equilíbrio das cadeias alimentares na natureza é profundamente alterado, pois muitas espécies desaparecem ou suas populações são reduzidas, e essa quebra do equilíbrio natural é uma das conseqüências negativas do uso de agrotóxicos sobre a entomofauna. Os insetos que sobrevivem após a aplicação dos agrotóxicos vão multiplicando-se e tornam-se cada vez mais resistentes aos produtos aplicados, sendo necessário dosagens cada vez maiores (Carvalho *et al.*, 2000).

Por estes motivos, o registro dos fosforados está sendo revisto nos Estados Unidos da América através do Ato de Proteção à Qualidade dos Alimentos (Food Quality Protection Act) de 1996 (EPA/2003) e no Brasil através das limitações conferidas pelos Sistemas de Produção Integrada de Frutas (Scoz *et al.*, 2004).

Para o desenvolvimento de novos sistemas de luta contra insetos prejudiciais, são utilizadas três linhas principais de investigação, segundo Yufera (1991):

1. Investigação dos sistemas de comunicação intraespecífica e interespecífica dos insetos. Os insetos utilizam sinais químicos, isto é, substâncias emitidas por glândulas que são essenciais para a reprodução ou sobrevivência. Como exemplo destas temos as substâncias de alarme para a percepção da presença de predadores, repelentes, as de atração sexual que asseguram a localização da fêmea para o cruzamento, etc. Estas substâncias, são chamadas de ferormônios e oferecem possibilidades amplas para o desenvolvimento de novos métodos de

controle não contaminantes.

2. Investigações para o conhecimento da patologia dos insetos (entomopatogênicos). As enfermidades dos insetos são muito pouco estudadas, salvo casos excepcionais que correspondem aos que afetam insetos economicamente úteis, como as abelhas. Nos últimos anos, estas investigações aumentaram rapidamente e, hoje, conhecem-se muitas bactérias, fungos e vírus entomopatogênicos que se propagam em determinadas espécies e que podem reduzir sua população a limites toleráveis. Em geral, estes microrganismos não afetam as plantas e os animais superiores, atacando um limitado número de espécies de insetos, o que oferece possibilidades variadíssimas para o controle de pragas importantes. Um outro sistema que merece atenção é a utilização de parasitóides para o controle populacional de tefritídeos. Nos últimos anos, vários países estão desenvolvendo programas de criação massal e liberação de parasitóides, principalmente da família *Braconidae*. A mortalidade provocada por parasitóides pode superar 60%, dependendo da espécie de frutífera considerada (Vargas *et al.*, 1993). Entretanto, conhece-se muito pouco sobre a biologia desses parasitóides e o potencial que eles apresentam para o controle biológico de moscas-das-frutas. No entanto, estudos nestas áreas poderão fornecer, também, boas perspectivas para um combate mais ecológico dos insetos-pragas.

3. Trabalhos dirigidos ao conhecimento da fisiologia e bioquímica dos insetos, principalmente do sistema hormonal que os regulam e das enzimas-chave de seu metabolismo específico. A utilidade deste conhecimento é que o mesmo abre caminhos para encontrar produtos capazes de interferir nos processos vitais próprios dos insetos e com influência escassa ou nula sobre outros seres vivos. Inclusive, em muitos casos, a atividade está limitada

a famílias ou gêneros, o que permite um controle mais específico, preservando animais benéficos. Hoje se conhecem alguns aspectos da regulação hormonal das mudas larvais, ecdise ou metamorfose final do desenvolvimento sexual, da ovogênese e do desenvolvimento embrionário dos insetos. Isto levou ao descobrimento de produtos que, alterando os processos, são agentes específicos para o controle de algumas pragas.

As alternativas para métodos de controle que não os químicos necessitam, entretanto, do conhecimento da biologia das pestes. E, a menos que se respondam a certas questões, os mecanismos de manejo racionais serão quase que ineficientes (Aluja, 1996). De acordo com Sivinski (1996), no caso da mosca-das-frutas, destacam-se questões básicas como diapausa, hospedeiros naturais e investigações sobre as variáveis ambientais e adaptações orgânicas.

Vários exemplos são conhecidos de alternativas de manejo. Na Florida, Costa Rica, México e em países Latino Americanos que apresentam estudos com eficiência do controle biológico, estes se constituem em criações massais e liberações de parasitóides. Na Austrália foram estudadas seis espécies de parasitas para quatro espécies de tefritídeos analisando o comportamento e a dinâmica da população (Sivinski, 1996).

Há também programas de Manejo Integrado de Pestes (MIP), que usam combinações de saneamento do pomar, monitoramento, colheitas adiantadas, empacotamento dos frutos, liberação de parasitóides, remoção de hospedeiros naturais. Esses programas alternativos foram desenvolvidos na Universidade da Califórnia em um programa de MIP em Citrus (Hendrichs, 1996).

Entre as metodologias empregadas, uma delas é chamada de Técnica do Inseto Estéril (SIT). Esta técnica baseia-se na liberação em larga escala de moscas previamente esterilizadas. O Brasil, mobiliza-se pela instalação de sua primeira biofábrica para tentar resolver problemas

como o da mosca-das-frutas (*Ceratitis capitata*) e da lagarta-da-maçã. A Biofábrica Moscamed Brasil, instalada em Juazeiro, Bahia, tem como principal objetivo a produção e liberação de machos estéreis para a supressão populacional de insetos nas áreas de fruticultura irrigada do nordeste do Brasil. O investimento está sendo gerenciado por uma organização social, a Moscamed Brasil, ligada ao MAPA com o apoio da Embrapa, FINEP, Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), Biocontrole e Governo da Bahia. A implantação desta tecnologia é liderada por pesquisadores brasileiros, tendo como Diretor Presidente o Dr. Aldo Malavasi – USP/ I. Biociências, e como Diretor Técnico o Dr. Antônio S. do Nascimento, EMBRAPA Mandioca e Fruticultura.

No entanto, entre alguns pesquisadores da área, há uma certa descrença nesta metodologia pois o uso da SIT tem certas limitações, aplicável apenas a regiões com características geográficas favoráveis: áreas isoladas por montanhas, desertos ou oceanos, (como ocorre no oeste da Argentina e no norte do Chile, na fronteira com o Peru) e em áreas onde ocorre uma única espécie. Desse modo, pode-se concluir que, face à realidade brasileira, com a ausência de barreiras geográficas, às dimensões continentais do país e a grande diversidade de espécies de praga e de frutíferas hospedeiras, a chance de aplicação prática da SIT com resultados positivos seja reduzida.

Outras metodologias usadas no Brasil há mais tempo incluem a manipulação do habitat pela conservação dos hospedeiros alternativos, os quais agiriam como sítios de manutenção e multiplicação de inimigos naturais das pestes (Aguiar-Menezes *et al.*, 1998). Tem-se também estudado os parasitóides que atacam as moscas-das-frutas. Os da família *Braconidae* são os mais efetivos para este método de controle. O uso de parasitóide da mosca-das-frutas não garante o controle adequado da praga, mas pode diminuir as suas populações aumentando a

eficiência de outras técnicas (Canal e Zucchi, 2000).

Além disso a manipulação dos hospedeiros silvestres e primários, com base nos conhecimentos ecológicos disponíveis, propiciam novas alternativas como o uso do ácido giberélico (GA) na pulverização de frutos cítricos que tem como resultado o retardo da mudança da cor verde do fruto para a cor laranja, sem alterar a maturação do fruto; mas a cor verde reduz a suscetibilidade ao ataque da mosca.

Entretanto, as vantagens do uso do conhecimento da biologia das espécies consideradas pragas puderam ser observadas quando se intensificou o uso de inseticidas somente nos períodos ontogenéticos mais críticos para as pestes. Ocorreu uma diminuição das desvantagens exercidas pelas pragas. Este procedimento foi realizado por Kovaleski (1997) e Kovaleski *et al.* (1998), quando realizaram o manejo da lagarta enroladeira (*Bonagota cranaodes*) e da *A. fraterculus*, duas das principais pragas da maçã, demonstrando o poder do conhecimento da bioecologia destes animais pragas. Nestes estudos foram correlacionados determinantes bióticos e abióticos aos padrões de flutuação populacional observados, fazendo um levantamento de espécies em pomares comerciais e áreas de mata, as espécies de frutos nativos, a ocorrência de parasitismo, o comportamento da mosca-das-frutas durante o inverno e a dispersão das matas para os pomares, que levaram a uma redução dos danos causados pelo uso massivo dos inseticidas e também dos gastos dos produtores com a excessiva utilização de inseticidas.

### **1.3. Flutuação populacional da *Anastrepha fraterculus* no sul do Brasil.**

A flutuação populacional da mosca-das-frutas pode ser influenciada por vários fatores como o pico de frutificação do hospedeiro principal, pluviosidade, tempo de luz solar, utilização de pesticidas, abundância de inimigos naturais, temperatura, umidade, entre outros (Bale, 1991). De uma forma geral, os níveis populacionais são mais altos durante os meses de outubro a janeiro, sendo baixos nos demais meses do ano, persistindo somente nas zonas da mata, nos meses mais frios. Durante os meses em que há maior disponibilidade de frutos no pomar, as populações neste local são maiores que na mata e esta situação se inverte durante o inverno (Kovaleski, 1997).

O aumento potencial de uma população é extremamente influenciado pela idade em que as fêmeas atingem o máximo de fecundidade (Birch, 1948). Fêmeas de tefritídeos necessitam de vários dias depois da emergência para o amadurecimento de seus ovos, mesmo sob condições ótimas de cultivo. Assim, é importante investigar os fatores ambientais na taxa de maturação sexual (Pritchard, 1970).

As taxas de desenvolvimento nos insetos, dos estágios imaturos para maturos, em condições naturais, são amplamente determinadas pela temperatura (Fletcher, 1989; Liu *et al.*, 1995). Assim sendo, muito tem sido feito para determinar o efeito da temperatura, na taxa de desenvolvimento e na longevidade dos tefritídeos, com vistas ao seu manejo e controle.

Estudando as exigências térmicas para o desenvolvimento de *A. fraterculus*, Machado *et al.* (1995) observaram que a temperatura base inferior para o ovo foi de 9,23°C, larva 10,27°C, pupa 10,78°C, e para o ciclo de vida foi de 10,72°C. A maior longevidade para estes animais ocorreu a 15°C, diminuindo drasticamente a 25°C. A faixa de temperatura ótima para o

desenvolvimento biológico da *A. fraterculus* está entre 15,28°C e 26,79°C.

Pritchard (1970) verificou para *Dacus tryoni* que, quando medidas eram feitas em uma série de temperaturas constantes, a taxa de maturação ovariana aumentava de maneira sigmóide com temperaturas de até 26°C, mas diminuía em altas temperaturas.

Analisando o desenvolvimento e demografia de *Bactrocera dorsalis*, Yang *et al.* (1994) observaram os efeitos da temperatura nos diversos estágios da vida deste inseto. Na temperatura de 19°C, o desenvolvimento da fase adulta deu-se a 155 dias, e na temperatura de 36°C, em 30 dias.

A principal região produtora de maçã do País, Vacaria (RS) e São Joaquim (SC), apresenta, nos meses de inverno, temperaturas médias de 5,5°C e as temperaturas médias dos dias mais frios de -5,5°C. No inverno, as temperaturas médias máximas são de 13°C sendo as temperaturas médias mais quentes de 20°C (temperaturas coletadas de 1996 a 1997 pela Estação de Meteorologia de São Joaquim). Observou-se também que pode haver variação de temperatura ao longo do dia.

Dados coletados entre 1989 e 1994 e publicados por Humeres *et al.* (1996a) sobre a frequência populacional da *A. fraterculus* na região produtora de maçãs de São Joaquim, SC, sobre médias mensais de temperaturas e ocorrência de frutos nativos hospedeiros nas proximidades de pomares, apontaram a inexistência de adultos quando se utilizavam os métodos convencionais de coleta. Duas hipóteses podem ser levantadas, para explicar o aumento populacional no fim do inverno, sendo elas não mutuamente exclusivas, ou migração de adultos de regiões onde as temperaturas são mais amenas, ou regulação genética diferencial durante a ontogênese que lhes permite sobreviver o inverno rigoroso. Dados obtidos em

condições naturais e semi-naturais (Humeres *et al*, 1996b), e também em condições laboratórias (Taufer *et al*, 1996), mostraram que *A. fraterculus* apresenta alta tolerabilidade ao frio.

Mecanismos regulatórios que permitem à espécie um “escape no tempo” podem estar sendo acionados e devem ser investigados com o objetivo de impedir que os poucos indivíduos que sobrevivem às condições de inverno rigoroso reinfestem maciçamente a região produtora, quando a temperatura torna-se mais amena, por volta do mês de setembro (Taufer, 1998).

Resultados extremamente interessantes foram obtidos em nosso laboratório por Nascimento e Oliveira (1997a, 1997b) Nascimento *et al*. (1998) e Taufer *et al*. (2000), utilizando as temperaturas críticas obtidas na natureza ou seja 9°C, 13°C e 20°C e que correspondem às temperaturas médias do inverno, primavera e outono e verão, respectivamente, da região produtora de maçãs no sul do Brasil. Dados sobre a viabilidade, velocidade de desenvolvimento ovo-larva, larva-pupa, pupa-adulto, fertilidade da fêmea, fecundidade, desenvolvimento ovariano, longevidade de adultos e o padrão de enzimas durante a ontogênese, e que são importantes no metabolismo energético, foram obtidos para os insetos criados a temperaturas constantes .

Os resultados obtidos mostraram que a viabilidade e a velocidade de desenvolvimento pupal foram fortemente influenciados pela temperatura, onde sob 9°C e 13°C, a viabilidade detectada foi nula. Já na temperatura de 25°C (usada no controle dos experimentos) a viabilidade pupal foi de 65%, com uma velocidade de desenvolvimento de 336-360 horas. Na temperatura de 20°C, a velocidade de desenvolvimento (VD) foi mais alongada, com adultos

emergindo à partir de 528 até 624 horas. A viabilidade nesta temperatura foi mais elevada, com 78% de adultos emergentes. Os dados indicaram que este estágio do desenvolvimento parece ser muito suscetível a temperaturas mais críticas.

Os dados de Taufer *et al.* (1998) também mostraram que nas temperaturas de 9°C e 13°C não ocorreu desenvolvimento ovariano e, conseqüentemente, também ovoposição. Para as fêmeas mantidas a 20°C, verificou-se que o desenvolvimento ovariano foi muito retardado, sendo necessário o dobro do tempo para que o mesmo percentual de fêmeas tivesse os seus ovários maduros (84% aos 60 dias de idade) quando comparadas com as fêmeas mantidas a 25°C (80% aos 30 dias de idade). Os resultados obtidos também mostraram que a 25°C, o início da ovoposição ocorre a partir dos 15 dias após a emergência dos adultos, estendendo-se até 11 semanas (78 dias). A 20°C, o início da ovoposição ocorreu a partir do 22º dia estendendo-se até a 20ª semana (141 dias). A 25°C, a VD embrionária foi de 3 a 5 dias com uma viabilidade embrionária total de 79%. Na temperatura de 20°C, a velocidade de desenvolvimento embrionário foi alongada com início da eclosão no 3º dia de ovoposição, estendendo-se até o 7º dia e com uma viabilidade de 77%. Estes resultados demonstraram que o comportamento reprodutivo das fêmeas de *A. fraterculus* e o desenvolvimento pré-imaginal são grandemente afetados pela temperatura, onde os indivíduos parecem mobilizar mais recursos para a manutenção do que para a reprodução, quando as condições são desfavoráveis.

Como a temperatura revelou-se um fator importante para a biologia de *A. fraterculus* e as temperaturas constantes não refletiram as condições térmicas da região produtora de maçãs, Cardoso *et al.* (2002), no Laboratório de Genética do Desenvolvimento do Departamento de Genética da UFRGS, analisaram o potencial reprodutivo, a longevidade, a expectativa de vida

em machos e fêmeas e também a atividade da ornitina decarboxilase (ODC) em fêmeas de 30 dias, em temperaturas alternadas (20/6°C e 20/13°C) e constantes (6°C e 25°C), obtendo como principais resultados os seguinte dados:

A 6°C, as fêmeas não apresentaram desenvolvimento ovariano e os machos tiveram as menores medidas nos apódemas ejaculatórios quando comparadas com machos mantidos nas outras condições de temperatura. Em ambos os sexos foi observada a menor longevidade (fêmeas=147 dias; machos=140 dias) e expectativa de vida (fêmeas=68,12 dias; machos=57,54 dias). Nas fêmeas mantidas a temperaturas alternadas o desenvolvimento ovariano apresentou um retardo pois, enquanto fêmeas mantidas a 25°C mostraram os primeiros ovários maduros com 30 dias de idade, nas fêmeas de temperatura alternada isto ocorreu com idades mais avançadas (20/6°C=60 dias; 20/13°C=90 dias). A expectativa de vida e a longevidade foram as mais altas em ambas as condições e para ambos os sexos. Para a temperatura de 20/6°C em fêmeas, a longevidade e a expectativa de vida foram, respectivamente, de 336 e 123,48 dias e, para machos, a longevidade e a expectativa foram respectivamente, de 343 e 119,25 dias. A 20/13°C, para as fêmeas, a expectativa de vida foi de 113,65 e a longevidade de 280 dias; para os machos a expectativa foi de 109,73 e a longevidade de 273 dias.

Outro dado interessante foi que a ovoposição e a eclosão larval foram altas, com 30 e 60 dias a 25°C; a 20/6°C estes parâmetros foram altos, de 90 até 180 dias. A performance dos animais submetidos a 20/13°C foi mais ou menos intermediária entre a temperatura controle e a temperatura de 20/6°C (Cardoso *et al.*, 2000).

Analisando-se o potencial reprodutivo dos machos, nas idades superiores a 30 dias, o

número médio de espermatozoides parece não ter sido afetado pelas flutuações de temperatura, inclusive pela temperatura baixa de 6°C. Em todas as temperaturas observou-se um mesmo comportamento de declínio progressivo do potencial reprodutivo com o passar das idades. Entretanto, o efeito das temperaturas foi observado nas idades mais precoces pois, enquanto na temperatura controle, entre 15 e 30 dias, temos um platô em relação à produção de espermatozoides, nas demais temperaturas este platô não aconteceu (Cardoso *et al.*, 2000).

Resumindo, estes resultados sugerem que a temperatura afeta não somente o potencial reprodutivo de *A. fraterculus* mas, também, sua longevidade e expectativa de vida. Tais mudanças biológicas podem representar uma estratégia poderosa utilizada por esta mosca para sobreviver nas condições de temperatura estressantes e que são comuns na área de produção de maçãs.

Para o desenvolvimento de novas técnicas de controle dos insetos pragas são necessários, além de trabalhos dirigidos ao conhecimento do comportamento e potencial reprodutivo, como visto acima, também estudos relacionados principalmente com as enzimas e os sistemas hormonais que regulam o metabolismo e o crescimento destes insetos pragas (Nascimento e Oliveira, 1997a e 1997b; Kogan e Hagedorn 2000). Entre estas enzimas a ornitina decarboxilase (ODC, EC 4.1.1.17) tem um papel preponderante no crescimento e desenvolvimento tissular, sendo a enzima regulatória mais importante da biossíntese das poliaminas (Sparks *et al.*, 1991; Thomas e Thomas, 2001).

Todas as células de eucariotos superiores apresentam quantidades significativas de poliaminas (espermidinas, espermina e putrescina) e, embora elas não tenham sido totalmente esclarecidas em nível molecular, vários estudos demonstram que a concentração delas é altamente regulada e que o crescimento normal e a diferenciação celular requerem as

poliaminas (Tabor e Tabor, 1984; Thomas e Thomas, 2001).

Cardoso *et al.* (2002) obtiveram dados preliminares com fêmeas de *A. fraterculus* de 30 dias (pico reprodutivo em temperatura de 25°C) que revelaram que a maior atividade da ODC ocorreu na temperatura constante de 6°C (115%) quando comparada a 25°C (100%) e às temperaturas alternadas que apresentaram atividade de 91% a 20/6°C e de 106,5% a 20/13°C. O maior nível de atividade a 6°C nos leva a sugerir que este comportamento se deve à alta porcentagem de animais com ovários imaturos (80% das fêmeas tiveram seus ovários classificados como imaturos e 20% como em desenvolvimento com a idade de 30 dias).

Por outro lado, uma variedade de estudos relacionam a atividade de hormônios com uma rápida indução da ODC, embora o mecanismo seja ainda desconhecido em insetos, sabe-se que o hormônio juvenil (HJ), que é secretado pela *corpora allata*, tem efeito na atividade da ODC (Birnbaum e Gilbert, 1990; Wyatt *et al.*, 1973).

#### 1.4.Ornitina decarboxilase

A ornitina decarboxilase (ODC; EC 4.1.1.17) é a enzima limitante da velocidade da biossíntese de poliaminas (figura 6). Ela catalisa a decarboxilação de L-ornitina para formar putrescina, que é, então, ligada a um resíduo de propilamina da S-adenosilmetionina decarboxilada, para formar espermidina e, finalmente, uma segunda molécula da S-adenosilmetionina combinada com espermidina forma a espermina (figura 7).

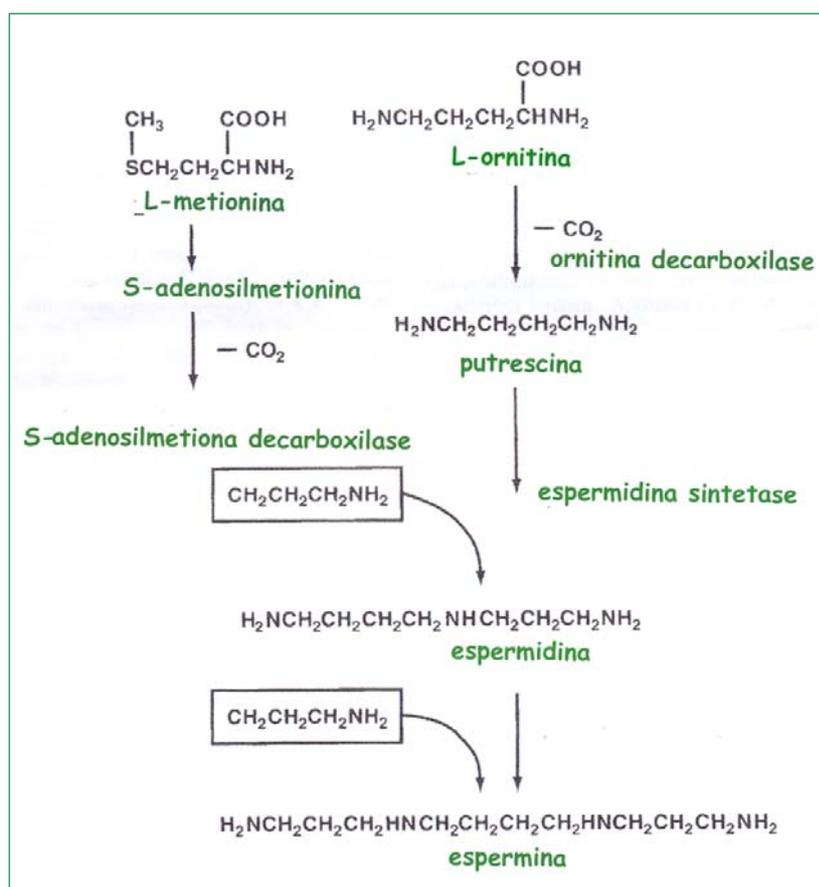


Figure 6. Esquema da biossíntese das poliaminas.

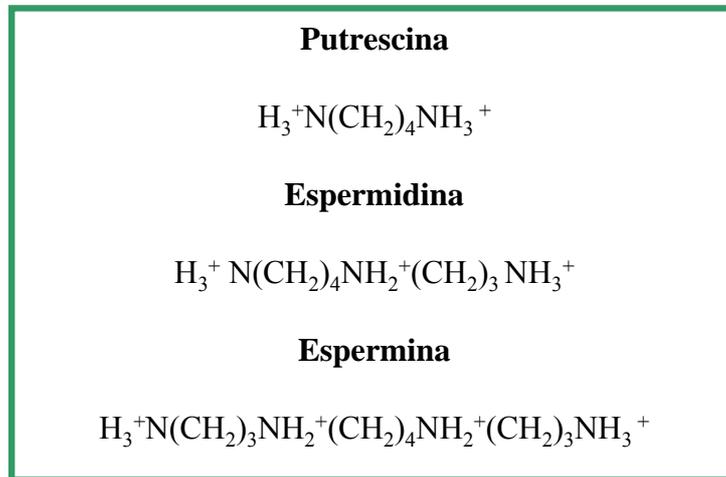


Figura 7. Fórmulas estruturais das poliaminas.

A ODC tem como co-fator o piridoxal 5'-phosphate (PLP). A ligação da enzima com o co-fator, em mamíferos, é relativamente fraca e pode ser removida por procedimentos simples (Poulin *et al.*, 1992; Myers, 2001). O valor de  $K_m$  para o PLP é de 0,2 a 0,3  $\mu\text{M}$  (Obenrader e Prouty, 1977).

A ODC ativa de mamíferos é composta por um homodímero com duas dobras simétricas, e os monômeros são compostos de dois domínios. Os resíduos 46-283 formam um domínio do tipo  $\alpha/\beta$  barril e os resíduos carboxi terminais formam um domínio do tipo folha- $\beta$  incluindo duas dobras separadas e dois sítios. Os sítios ativos são dímeros formados na interface entre o domínio  $\alpha/\beta$  barril de um monômero e o domínio folha- $\beta$  da outra

subunidade (Tobias e Kahana, 1993; Osterman *et al.* 1995; Almrud *et al.* 2000). As subunidades tem massa molecular de aproximadamente 51 kDa e a cadeia polipeptídica consiste de 461 aminoácidos com exceção da ODC de hamster, que tem 455 aminoácidos (Grens *et al.* 1989; Yao *et al.* 1998; Almrud *et al.* 2000).

A estrutura completa e a seqüência nucleotídica do gene da ODC é conhecida hoje em uma variedade de espécies, entre elas, camundongo (Coffino e Chen 1988; Katz e Kahana, 1998), rato (Van Steeg *et al.*, 1988; We *et al.*, 1989), *Candida albicans* (Lopez, 1997); humanos (Fitzgerald e Flanagan, 1989; Hickok *et al.*, 1990), *Chlamydomonas reinhardtii* (Voigt *et al.*, 2004); bovinos (Yao *et al.*, 1998) e *Drosophila* (Rom e Kahana, 1993).

A análise por *Southern blot* revelou uma família multigênica da ODC em camundongos, sendo que os membros desta família estão dispersos e são encontrados, no mínimo, em seis cromossomos. Já o genoma humano parece conter dois genes para a ODC (Persson *et al.*, 1988; Guo *et al.*, 2000). Em *Drosophila melanogaster* também são encontrados dois genes dODC1 e dODC2, e análises da seqüência destes genes demonstram que, apesar de apresentarem variações em regiões codificantes e não codificantes, suas estruturas totais são totalmente similares contendo seis exons e cinco pequenos introns. As análises da seqüência e *Southern blot* revelaram que os dois genes estão arrançados em seqüência cabeça-cauda (*tandem head to tail*) (Rom e Kahana, 1993).

As proteínas da família ODC apresentam alta similaridade quando comparadas em diferentes espécies. Tal conservação nas seqüências de aminoácidos pode ser explicada pelo papel-chave desta proteína no crescimento e diferenciação celular. A ORF da ODC de mamíferos é constituída de 1383 nucleotídios com somente uma exceção: mRNA da ODC de hamster é constituída de 1365 nucleotídios. A região codificante é altamente conservada. Entre

camundongo e rato, as seqüências de nucleotídios diferem somente em 14 sítios. Entre as seqüências das ODCs de mamíferos, as de hamster e bovinos são as que mais se diferenciam pois divergem em 56 aminoácidos (Kahana *et al.*, 1985; We *et al.*, 1989).

A cadeia polipeptídica do gene da ODC da alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* consiste de 396 aminoácidos com 35-37% de identidade com outros eucariotos e contem dois introns, 133 e 129 pb respectivamente (Voigt *et al.*, 2004).

Genes ativos da ODC estão localizados em camundongos no cromossomo 12 (Cox *et al.*, 1988), em hamster no cromossomo 7 (Tonin *et al.*, 1987), em *Schizosacchomyces* no cromossomo 1 (Franceschetti *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 2002), em humano no cromossomo 2 (Winqvist *et al.*, 1986, Radford *et al.*, 1990), em ratos no cromossomo 6 (Deng *et al.*, 1994) *Drosophila* no cromossomo 2 (Rom e Kahana, 1993) e em Zebrafish no cromossomo 14 (Hascilowicz *et al.*, 2002).

A atividade da ODC em células normais varia durante o ciclo celular, pois a atividade começa a aumentar no meio de G1 no ponto de Restrição R e alcança o pico em G2, antes do início da mitose. A atividade da ODC é regulada por uma série de mecanismos de controle envolvendo mudança nas taxas de transcrição gênica, taxas de tradução do mRNA e por um controle mediado pela sua antienzima. A ODC é uma enzima codificada por um gene constitutivo e o seu nível de expressão é altamente controlado (Coffino, 2001).

Embora muitos genes codifiquem mRNA com pequenas regiões 5' não traduzidas, as chamadas UTRs 5', os oncogenes e genes ligados à proliferação celular muitas vezes codifiquem RNAm com longas regiões UTRs 5', que podem formar estruturas secundárias. Muitos estudos de regulação traducional da ODC focam-se numa longa região UTRs 5' do seu RNAm. Esta região é composta de dois segmentos distintos: um segmento proximal 5' rico em

GC que mede 180 nucleotídios, o qual prediz uma estrutura de grampo estável e que contém uma pequena ORF e um segundo segmento que cobre o resto da UTR 5' e é relativamente desestruturado (We *et al.*, 1989; Katz e Kahana 1998; Shantz *et al.*, 1999).

O padrão de sinalização que leva à indução da ODC é parcialmente conhecido. A proteína quinase C e a fosfolipase C tem sido sugeridas como envolvidas na mediação de um promotor de tumor, o 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA). Este por sua vez seria um estimulador rápido de RNAm da ODC (Verma *et al.*, 1986). A atividade da proteína quinase C é requerida também para a indução da ODC via estresse oxidativo (Otieno e Kensler, 2000). Da mesma forma, a ativação da proteína quinase A também tem mostrado conduzir a uma rápida elevação da transcrição do gene ODC (Abrahamsen *et al.*, 1992).

Sua atividade enzimática é induzida rapidamente, aumentando cerca de cem vezes por uma grande variedade de fatores que estimulam o crescimento celular e a proliferação. Esses fatores podem ser promotores de tumor, fatores de crescimento e também hormônios. Em todos os casos, o aumento na atividade é acompanhada por mudança equivalente na quantidade de proteína e esta é geralmente regulada em nível de transcrição do gene, do mRNA, por degradação da enzima e por feed-back negativo das poliaminas (Shantz *et al.*, 1999; Coffino, 2001).

Entretanto, o aumento da atividade da ODC e do conteúdo protéico pode não ser somente devido ao aumento da transcrição ou da estabilidade de seu mRNA mas, também, à regulação em nível traducional. Este tipo de regulação tem função significativa relativa quando a atividade da ODC é induzida por aminoácidos (Kanamoto *et al.*, 1991, Chabanon *et al.*, 2000), por insulina (Manzella *et al.*, 1991), e por alguns sistemas experimentais como choque hipotônico (Poulin e Pegg, 1990, Lökvist-Wallström *et al.*, 2001).

Várias vias regulatórias da ODC foram demonstradas mas, há alguns anos tem-se discutido uma nova via: a regulação pós-traducional. De acordo com conceitos anteriores, modificações e efeitos alostéricos não teriam funções significantes na regulação da ODC. No entanto, em determinados tecidos ou em certas condições fisiológicas, estas modificações e efeitos podem ser importantes. Por exemplo, em células tumorais, a atividade da ODC pode ser estimulada por GTP, sugerindo uma regulação alostérica ou modificações pós-traducionais dependentes de GTP, ou ainda, o envolvimento de proteínas reguladas por GTP (O'Brien *et al.*, 1986, 1987; Oliveira *et al.*, 1997 ).

Como a ODC responde a uma grande variedade de estímulos que afetam o crescimento e a diferenciação celular, as concentrações celulares elevadas de poliaminas induzem a expressão maior de sua antienzima, uma proteína inibitória da ODC, que se liga a ela e induz sua rápida degradação, formando um complexo que é altamente suscetível à proteólise enzimática (Murakami *et al.*, 1992; Heiskala *et al.*, 1999; Coffino, 2001).

## 1.5. Poliaminas e sua importância

As poliaminas, estão presentes em todas as células vivas, procariotas e eucariotas, plantas e animais. Em células de mamíferos, as poliaminas naturais espermidina, espermina e putrescina estão presentes em concentrações milimolares, visto que o primeiro e o segundo de seus grupos amino são protonados a um pH fisiológico. A putrescina é um cátion orgânico divalente, a espermidina trivalente e a espermina é tetravalente (figura 7). A putrescina é sintetizada pela descarboxilação da ornitina feita pela enzima ODC. As outras poliaminas são sintetizadas pela adição seqüencial de grupos aminopropil à putrescina pela reação que envolve a s-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), bem como da espermidina e espermina sintetase (figura 6). A característica única das poliaminas, que é comparada a cátions inorgânicos como  $Mg^{+2}$  ou  $Ca^{+2}$ , é que elas têm cargas positivas que definem as distâncias entre elas e o grupo metil que participa das interações hidrofóbicas (Thomas e Thomas, 2001; Jänne *et al.*, 2004).

As poliaminas são essenciais para a vida e apresentam múltiplas funções; seus inibidores bloqueiam o crescimento celular. Elas tem funções específicas no desenvolvimento embrionário, no ciclo celular, na neuroquímica, no sistema imune e também pulmonar. As poliaminas celulares são reguladas por vias complexas de síntese, degradação, bem como captação e efluxo. O catabolismo das poliaminas é dirigido pela espermidina/espermina acetiltransferase (SSAT), que induz as poliaminas e seus análogos sintéticos (Pendeville 2001; Thomas e Thomas, 2001; Pegg *et al.*, 2003).

No desenvolvimento embrionário, as poliaminas têm sido estudadas em vários organismos. Em ovos de ouriço-do-mar que foram submetidos a um inibidor competitivo da

ODC ( $\alpha$ -metilornitina), ocorreu a redução do número de clivagens nestes ovos, sendo que este efeito foi reversível quando a estes foram adicionados ornitina ou diferentes concentrações de poliaminas (Kusunoki e Yamasu, 1978). Outro exemplo da efetiva importância das poliaminas durante o desenvolvimento foi observado em embriões de galinhas nos quais o DFMO, um inibidor da ODC, foi usado para observar o padrão e o comportamento de diferenciação de culturas de células do mesoderma. A adição deste inibidor retardou o crescimento e a expressão dos fenótipos de diferenciação, como os tecidos do coração, eritrócitos e os adipócitos. A maior interferência deste inibidor foi no retardo da formação nuclear. Todos estes efeitos foram revertidos com a adição exógena de poliaminas às culturas (Heby e Emanuelsson, 1981).

Outros organismos como ratos e coelhos também evidenciaram a habilidade dos inibidores da ODC em cessar as gestações destes animais. Em recentes estudos com *Caenorhabditis elegans*, mutantes com gene defectivo da ODC desenvolvem-se normalmente em meio que contém poliaminas, mas mostram deficiências se transferidos para meio sem poliaminas. Se as poliaminas forem retiradas no primeiro estágio larval, as larvas mutantes desenvolvem-se até a vida adulta, mas produzem poucos ou nenhum ovo. Se as larvas mutantes forem transferidas no quarto estágio larval para um meio de cultura sem poliaminas, esses animais desenvolvem-se até a vida adulta e produzem um número normal de ovos. Porém, os embriões gerados destes ovos, não se desenvolvem até o terceiro estágio larval de crescimento sem que haja suplementação de poliaminas (MacRae *et al.*, 1998). Estes resultados demonstram que as poliaminas são essenciais em certos estágios de crescimento larval e que elas podem ser usadas para corrigir os defeitos produzidos por deficiência de sua

síntese durante o desenvolvimento.

As poliaminas são conhecidas por terem picos específicos de indução durante a progressão do ciclo celular. Recentes estudos indicam níveis aumentados de poliaminas na fase G1 e S (fase de crescimento e síntese de DNA, respectivamente); a transição de G1 para S é inibida devido à depressão das poliaminas. Em células de ovário de hamster chinês, os níveis de putrescina, espermidina e espermina aumentam em até 2 vezes durante a progressão do ciclo celular (Thomas e Thomas, 2001).

Um papel paradoxal tem sido estudado atualmente em relação às poliaminas, demonstrando-se que elas podem ter função de induzir a apoptose mas, em alguns momentos, elas podem prevenir este fenômeno (Jänne *et al.*, 2004). Brune *et al.* (1991) observaram que a apoptose induzida pela mobilização de  $Ca^{2+}$  pelo agente ionomicina, poderia ser prevenida pela espermina. Este efeito pode ser devido ao fato de que, no mínimo, as poliaminas tem uma ação de conter a mobilização do cálcio nas células T.

Contrastando com esse efeito protetor das poliaminas, o gene da ODC (essencial para biossíntese das poliaminas) está ativamente envolvido na apoptose induzida pela super-expressão do gene c-Myc. Como a ODC, o gene c-Myc é também uma “faca de dois gumes”, tendo um importante papel na proliferação celular e na apoptose (Bello-Fernandez *et al.*, 1993).

Acúmulo ou diminuição excessivos dos níveis de poliaminas podem fazer cessar muitos processos celulares, incluindo interações DNA-proteína, proteína versus proteína e integridade mitocondrial conduzindo à apoptose (Jänne *et al.*, 2004).

## 1.6. Ornitina decarboxilase e a influência hormonal

A habilidade de hormônios específicos em estimular a atividade da ODC em determinados órgãos foi bem estabelecida por Jänne *et al.* (1978) e mudanças correlacionadas nos níveis de poliaminas foram observados em diferentes tecidos (Russel, 1989). Em vertebrados, inúmeros estudos apresentam o efeito de uma variedade de hormônios com uma rápida indução da ODC, incluindo o estrogênio (Hoggard e Green, 1986), prolactina (Rui e Purvis, 1987), insulina (Sakai *et al.*, 1978) entre outros. Embora esse estímulo seja ainda obscuro em insetos, sabe-se que o HJ, que é secretado pela *corpora allata*, tem efeito na atividade da ODC (Birnbaum e Gilbert, 1990). Willis, em 1981, levantou a hipótese de que durante desenvolvimento larval, o HJ mantém o estado imaturo pela inibição do estímulo da ODC dependente de ecdisona.

Wyatt *et al.*, em 1973, estudando *Cecropia silkmoth* em fase de pupas em diapausa (estado que se caracteriza pela grande diminuição do metabolismo e pela parada do crescimento, sendo esta uma condição ótima para análise da influência dos estímulos hormonais), demonstraram que a atividade da ODC não foi detectada no corpo gorduroso e no tecido da asa. Contudo, após o tratamento com ecdisona, a atividade elevou-se por 18 horas .

A atividade da ODC em *D. melanogaster* é elevada logo após a eclosão de fêmeas, com um pico em 24 horas após a eclosão e declínio após 48 horas. Esse padrão não é observado nos machos, o que veio a corroborar a hipótese de que as poliaminas estariam envolvidas na maturação ovariana em *D. melanogaster*. O HJ parece estar envolvido no controle da atividade da ODC *in vivo*. Logo, uma redução nos níveis deste hormônio afetaria a atividade enzimática da ODC. Também a síntese de poliaminas durante o estágio adulto estaria envolvida na

vitelogenese sugerindo, ainda, que as poliaminas maternas podem ser estocadas no ovo para auxiliar o desenvolvimento embrionário durante o período de síntese de macromoléculas. Todos esses dados sugerem que HJ regula as mudanças na atividade da ODC em *Drosophila*, sendo muito importante durante a vitelogenese (Birnbaum e Gilbert, 1990).

Cayre *et al.* (1996), analisando o comportamento reprodutivo em fêmeas de gafanhotos, tratadas com o inibidor de poliaminas, o  $\alpha$ -DFMO, observaram uma redução no desenvolvimento dos ovários bem como a perda do comportamento típico de ovoposição; o tempo de início da ovoposição também foi retardado em comparação com o das fêmeas controle não tratadas com inibidor. Esse trabalho sugere que as alterações nos níveis celulares de poliaminas estão correlacionadas com a maturação dos insetos dependente de hormônios.

Estudos que conduzam ao conhecimento do efeito do HJ sobre a ODC são de importante utilidade para revelar meios capazes de interferir nos processos vitais dos insetos, sem prejudicar os animais de táxons superiores e outros insetos levando, assim, a uma diminuição do uso de produtos químicos.

## 1.7. Hormônio juvenil

Os hormônios exercem uma função fundamental na fisiologia dos insetos, principalmente no crescimento e na metamorfose. Apesar das grandes descobertas das diferentes funções do HJ nos últimos 60 anos, ainda não é conhecido o modo de ação deste hormônio em nível molecular. Hormônios geralmente agem via receptores específicos à nível de membrana gerando um segundo mensageiro intracelular como no caso dos peptídeos, proteínas e catecolaminas ou agem intracelularmente no núcleo como no caso dos esteróides (Nijhout, 1994). Dados indicam claramente que  $Ca^{2+}$  e fosfoinositol são importantes reguladores da biosíntese do HJ, embora a função precisa dos efeitos que estes compostos exerçam difiram entre as espécies. Também, há diferença estágio-específico, na resposta para  $Ca^{2+}$  e para os agentes que modulam o fosfoinositol (Riddiford, 1996; Rachinski e Tobe, 1996).

A ecdisona é um hormônio esteróide necessário para a muda e seus efeitos são modificados pela presença do HJ. O HJ é que irá definir se um inseto se tornará uma larva, uma pupa ou um indivíduo adulto, promovendo, também, a diferenciação dos ovócitos e estimulando o ovário a produzir ecdisona que, por sua vez, estimulará o “corpo gorduroso” a produzir vitelogenina (*yolk proteins*). A vitelogenina é lançada na hemolinfa e captada pelos ovócitos. O próprio ovário também é estimulado a produzir vitelogenina (Nijhout, 1994).

Segundo Telfer (1965), da deposição do vitelo no oócito participam células foliculares, nutritivas e a própria célula oocítica. Porém, nenhuma delas está envolvida no processo de síntese das vitelogeninas; estas são capturadas pelos oócitos por pinocitose, sofrendo

modificações e passando a se chamar vitelinas.

No padrão de regulação endócrina proposto por Postlethwait e Shirk em 1981, a vitelogênese em *Drosophila* inicia-se com o estímulo da luz que irá disparar no cérebro a liberação de HJ pela *corpora allata*. Isso induz a síntese de vitelogeninas, levando-as para a hemolinfa e, também, a secreção de ecdisona por um tipo celular não conhecido no abdômen de fêmeas (possivelmente os oenocitos). Logo após, acontece a interação da ecdisona com os receptores do corpo gorduroso para aumentar a taxa de transcrição e tradução para os precursores de vitelogeninas. A remoção do sinal hormonal promove a ocorrência de modificações nos precursores de vitelogeninas, ocorrendo finalmente a secreção desta para a circulação e o seqüestro para o oócito.

Jowet e Postlethwait, em 1980, após tratar abdomens de fêmeas de *Drosophila* com 20-hidroxiecdisona e/ou HJ em concentrações próximas das fisiológicas, detectaram um aumento da expressão de vitelogeninas nos abdomens após 2 horas de tratamento, sugerindo que as taxas de transcrição e tradução podem ser mais alteradas pela ação hormonal do que pelo crescimento celular.

Finalmente, na vida adulta, além de regular a maturação reprodutiva, o HJ afeta a dispersão, a migração e a atividade de vôo, podendo também modular o comportamento de pós-cópula e de ovoposição (Hartfelder, 2000) (Figura 8).



## Objetivos

Tendo em vista os dados expostos acima, o presente trabalho teve como objetivo geral alcançar um conhecimento maior da relação entre *Anastrepha fraterculus*, estresse de temperatura, hormônio juvenil e regulação da enzima ornitina decarboxilase. Os objetivos específicos do presente estudo foram:

1. Analisar o padrão de atividade da ornitina decarboxilase em diversos níveis da ontogenia da *A. fraterculus*;
2. Analisar os parâmetros cinéticos ( $K_m$  app e  $V_{max}$ ) da enzima ODC em *A. fraterculus*
3. Analisar os efeitos da presença ou ausência de Guanosina trifosfato (GTP) na atividade da ODC;
4. Analisar a modulação da atividade da ODC pelo GTP por uma curva de dose.
5. Analisar a expressão do gene da ODC em diversos níveis da ontogenia da *A. fraterculus*;
  
6. Analisar a atividade da ODC em fêmeas de *A. fraterculus* quando submetidas a:
  - 6.1. temperaturas de 25°C, 6 °C, 20/6 °C;
  - 6.2. diferentes concentrações de HJ;
  - 6.3. diferentes tempos de incubação em HJ;
  - 6.4. temperaturas de estresse (6°C e 20/6°C) associadas à aplicação tópica de HJ;
  
7. Analisar o efeito da temperatura de 6°C sobre a atividade da ODC e sobre as medidas (comprimento e largura) do apódema ejaculatório de machos de *A. fraterculus*;
  
8. Analisar o efeito do  $\alpha$ -DMFO sobre medidas do ovário ( comprimento e largura).

## Capítulo I

### **Ornithine decarboxylase activity during the development of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae)**

---

Cardoso VV, Prestes PR, Casali EA, Moreira JCF, Oliveira, AK (2004)

**Arch Insect Bioch Physiol 57:151-159.**

Ornithine decarboxylase activity during the development of  
*Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae).

Cardoso, V.V.<sup>a</sup>, Prestes, P. R.<sup>a</sup>, Casali, E. A.<sup>b</sup>, Moreira, J. C. F.<sup>b</sup>, Oliveira, A. K.<sup>a</sup>.

a - Department of Genetic-IB *UFRGS* - *Porto Alegre* - *RS* - *Brazil*

b- Department of Biochemistry-ICBS; *UFRGS* - *Porto Alegre* - *RS* - *Brazil*

Sending by:

Valesca Veiga Cardoso

Departamento de Genética-IB *UFRGS*

*Porto Alegre* - *RS* - *Brazil*

Av. Bento Gonçalves, 9500-

Fone: 51 32273128

Fax: 51 33167311

e-mail: [anastrefa@ig.com.br](mailto:anastrefa@ig.com.br)

## ABSTRACT

Ornithine decarboxylase (ODC)(EC 4.1.1.17) is very important for polyamine biosynthesis which is required for main biological events. In the present study, ODC activity was measured in samples of *Anastrepha fraterculus*' egg, larva, pupa body and abdomen, adult body, ovaries, and fat body of young females, and in ovaries of mature flies. The kinetic parameters ( $K_m$  app and  $V_{max}$ ) for ODC activity were determined for pupa, larva and young ovary. ODC activity showed fluctuations during *A.fraterculus*' life development. In its earlier stages, prior to emergence, the egg has high ODC specific activity probably due to embryogenesis which is characterized by a high rate of cell division. This enzyme activity is also significantly high in the ovary and fat body of young females possibly related to the increased oogenesis and vitellogenesis. And the kinetic parameters ( $K_m$  app and  $V_{max}$ ) had great variation. Our results using GTP showed that the great variation in kinetic parameters can be accounted by post-translational modifications.

Keywords: *Anastrepha fraterculus*; Ornithine decarboxylase, development reproductive kinetic parameters, GTP.

Abreviatures: GTP, guanosine triphosphate; ODC, Ornithine decarboxylase

## INTRODUCTION

Ornithine decarboxylase (ODC) (EC 4.1.1.17) is the first enzyme in the pathway leading to polyamine putrescine, spermidine, and spermine biosynthesis in cells (Tabor and Tabor, 1984 and Pegg, 1986). Polyamines are ubiquitous aliphatic polycations (polybasic character, which gives them much higher affinity for acidic constituents than that exhibited by  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ), involved in growth control (Tabor and Tabor, 1984). They are required for a wide variety of biological events such as protein synthesis, DNA stabilization and replication, and cell division (Heby, 1981; Cohen, 1998; Tabor and Tabor, 1984; Thomas and Thomas, 2001).

Studies have shown that two ODC activity peaks occur during the cell cycle: the first one (during the G1 period) is related to the cell's entry into the S phase and the second peak (during the G2 period) is related for the cell's preparation to mitosis (Heby et al., 1973; Fredlund et al., 1995).

ODC is an enzyme with a short half-life (usually less than an hour). Like other short-lived proteins, ODC is degraded by the 26S proteasome. Its degradation is not triggered by ubiquitination, but stimulated by the binding to an inducible protein: the antizyme (Murakami et al., 1992; Svensson et al., 1997). Due to the cell control mechanism of ODC, this enzyme goes through efficient mechanisms of regulation including transcription, translation, and post-translation steps (Tabor and Tabor, 1984; Kahana and Nathans, 1985; Van Daalen et al., 1989).

Studies on polyamine metabolism during vertebrate and invertebrate embryonic development show that polyamines may be very important for a sound development (Heby and Emmanuelsson, 1981; Lowkivst et al., 1983). In invertebrates, as in vertebrates, each organ has an ODC specific enzymatic and polyamine developmental pattern (Birnbaum and Whelan, 1988; Cayre et al., 1995; Strambi et al., 1993). However, despite the increasing evidence of polyamines' importance for the cellular process, until now few studies have focused on the role of ODC and polyamines in the development of insects.

ODC activity has been measured in *Hyalophora cecropia* (Wyatt et al., 1973) and in *Drosophila melanogaster* (Byus and Herbst, 1976). Additionally, changes in polyamine pattern during insect development have been studied in *Tenebrio molitor* (Besson et al., 1986); *Manduca sexta* (Birnbaum and Whelan., 1988), and *Aedes aegypti* (Kogan and Hagedorn, 2000).

In the present study, we observed changes in ODC activity during the development of *Anastrepha fraterculus*. *A. fraterculus* (Wiedemann) (Diptera, Tephritidae) is one of about 195 species of the *Anastrepha* genus. It is distributed in Continental America – from Texas to Chile and Argentina (Zucchi, 1999) and is considered one of the most important pests in fruit culture. The apple commerce regards this insect as its major pest. A high rate of oviposition of this diptera in the earlier stages of apple development leads to the fall off of the host fruit causing great damage to apple production. Despite its importance as a pest, little is known about the *A. fraterculus* biological properties. The study of ODC might partially fill this gap.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Infested fruits (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) were collected in the town of São Joaquim (SC-Brazil) and kept under laboratory conditions at 25°C ±1°C, L:D of 12:12 cycle, and 60-80RH. After adult eclosion, the F1 was distributed into plastic cages (19x13x13cm) and provided with food (brown sugar:soy bean flour:wheat flour 3:1:1) and water.

### Chemicals

[C<sup>14</sup>]-l-ornithine (50Ci/mole) was purchased from Amersham Pharmacia. L-ornithine, pyridoxal 5-phosphate, dithiothreitol and GTP were purchased from Sigma.

### Preparation of tissues and ODC activity assays

ODC activity was measured in egg, larval stage, pupa body and abdomen, adult body, ovaries, and fat body of young females (±4 days old) and in ovaries of mature flies (±30days old). The enzymatic activity was determined by the method described by Wyatt et al. (1973), modified by Cardoso et al., 2002.

The tissues were placed in Ringer solution and homogenated in a medium containing 0.25M Sucrose, 10mM tris-HCl buffer, pH 7.7, 0.1mM EDTA and 5mM dithiothreitol. After

centrifugation of homogenates at 25000x g for 10 min, the supernatant fractions were used as enzyme source.

ODC was assayed by the release of  $^{14}\text{CO}_2$  by  $[\text{C}^{14}]$ -L-ornithine. The assay mixtures contained 42mM tris-HCl buffer, pH 7.1, 0.04mM pyridoxal 5-phosphate, 5 mM dithiothreitol and  $[\text{1-}^{14}\text{C}]$ -L-ornithine (0.1 $\mu\text{Ci}$ ) plus L-ornithine in concentration of saturation. The development of enzymatic reaction was made in a closed system (a plastic vial containing the substrate and the sample was put inside a glass vial containing a piece of filter paper previously treated with 50ul of 1M NaOH for trapping released  $\text{CO}_2$  after incubation and acidification. One hour of incubation at 37°C was made in a Dubnoff bath under agitation and stopped by the addition of 250 ul of 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  inside of plastic vial). After 30 min, the filter paper that absorbed the  $^{14}\text{CO}_2$  released were recovered and counted by liquid scintillation. Total protein content was measured by the method of Lowry et al. (1951). Incubation time and protein concentration were chosen in order to ensure the linearity of the reaction. Student's t-test was used for statistical analysis.

### **Kinetic parameters**

Kinetic parameters ( $K_m$  app and  $V_{\text{max}}$ ) were determined from Lineweaver-Burk reciprocal plot. The assay mixtures contained 42mM tris-HCl buffer, pH 7.1, 0.04mM pyridoxal 5-phosphate, 5 mM dithiothreitol and  $[\text{1-}^{14}\text{C}]$ -L-ornithine (0.1 $\mu\text{Ci}$ ) plus L-ornithine (0.2-0.3mM) at 37°C by one hour. The kinetic parameters for ODC activity were measured in the pupa, larva and ovary of young homogenates.

### **Effects of presence or absence of GTP on ODC activity**

Homogenates of ovaries (young females) and of pupae were incubated both in the presence and absence of GTP (0.01mM-10mM) and ODC activity was immediately measured as described above.

## RESULTS

### 1. ODC specific activity assays

ODC activity changes during the development of *A. fraterculus* (Figure 1). Enzyme activity of egg ( $6.6 \pm 0.88$  pmol of CO<sub>2</sub>/mg protein/minute), young ovary ( $146.46 \pm 30$  pmol of CO<sub>2</sub>/mg protein/minute) and in the fat body ( $26.8 \pm 4.14$  pmol of CO<sub>2</sub>/mg protein/minute) were significantly higher than values recorded from other tissues.

**Figure 1 here**

### 2. Kinetic parameters

ODC activity was determined at ornithine concentrations ranging from 0.03 to 2 mM. The results (Figure 2, inset) indicated that the enzymatic activity increased with increasing substrate concentrations until saturation with 1 mM substrate. The Lineweaver-Burk plot for the ornithine decarboxylation is shown in figure 2. The pupa ODC Michaelis constant ( $K_m$ , app) (Table 1) calculated by linear regression from the results in Figure 2 was closely similar to those previously described (Byus and Herbst, 1976; Birnbaum and Whelan, 1988; Wyatt et al., 1973) in other insects. However, the samples of larva and young female ovaries showed that the kinetic parameters ( $K_m$ , app and  $V_{max}$ ) had great variation (Table I). The kinetic parameters observed were 207mM, 438 mM and 1600mM of  $K_m$ , app and the  $V_{max}$  9.1, 47.6

and 50.0 pmol of CO<sub>2</sub>/mg protein/minute for pupa, larva and young ovary respectively (Table 1).

**Figure 2 here**

**Table 1 here**

### **3. Effects of presence or absence of GTP on ODC activity**

Figure 3 shows the effects of GTP on ODC activity. Homogenates of pupa and young females ovaries were incubated with and without addition of 0.1mM GTP. As can be seen, GTP increased ODC activity in both homogenates but the activity was significantly higher in the pupae than in young ovaries (Figure 3).

**Figure 3 here**

### **4. Modulation of ODC activity by GTP: Dose-response curve .**

Dose response profile of the ODC to GTP stimulation was done in homogenates of pupa and young females incubated with the addition of 0.01, 0.1, 1, 10 mM of GTP (figure 4). The most responsive GTP concentration in pupae was 0.1 mM, followed by a plateau. In young females ovaries no significant effect was observed with all GTP doses tested.

**Figure 4 here**

## DISCUSSION

Little is known about the occurrence, metabolic regulation or physiologic role of the ODC and polyamines in insects compared to mammalian tissues. Many studies suggest that polyamines are involved in the regulation of RNA synthesis and DNA replication in diptera (Byus and Herbst, 1976; Lundquist et al., 1983).

In the present paper is shown that *A. fraterculus* young ovaries had the highest ODC activity (Figure 1).

In the comparisons made among earlier earlier *A. fraterculus* stages, prior to emergence (egg, larva and pupa), the egg had the highest ODC specific activity ( $6.6 \pm 0.88$  pmol of CO<sub>2</sub>/mg protein/minute) (Figure 1). This high egg activity may be a result of the early stages of embryogenesis which is characterized by a high rate of cell division. In studies carried out with sea urchin eggs, where ODC was inhibited by a competitive inhibitor ( $\alpha$ -methylornithine), egg cleavage was significantly reduced, suggesting an important role for this enzyme in the healthful embryonic development (Kusunoki and Yamasu, 1978). Sparks et al. (1991) observed the temporal expression of ODC in developing embryos of *Musca domestica* L. ODC activity is not observed in the earlier stages of embryogenesis. Detectable levels of this enzyme begin at 9h postoviposition and increase in subsequent extracts. In our study, we used eggs between the 10th and 11th stage of embryogenesis ( $\pm 24$  h postoviposition). At this point of development in *A. fraterculus*, great morphogenetic changes are found such as the appearance of epidermal segmental sulks (Nascimento and Oliveira, 1996; Selivon et al., 1997).

Sparks et al. (1991) observed that ODC activity in *Musca domestica* larva extracts obtained 30 min after hatching was substantially lower than in embryos. We recorded similar results: larvae showed the lowest ODC activity when compared with the egg and pupae. Larval dipteran growth is characterized by increased cell size, not cell number. The lower rate of cell division can account for the low ODC content which was observed. In the pupal stage, when imaginal discs (which will originate adult structures) begin their differentiation, cellular divisions occur and this can explain the increase in ODC activity observed in our analysis, since ODC is important for cell division.

In the adult stages, when young and mature ovaries were compared, young ovaries showed a significantly higher content of ODC activity. This can be explained by the increase in oogenesis and vitellogenesis that occur during this immature period of the female. *Anastrepha*'s ovaries are not completely developed until 15 days after emergence. Bressan (1996) showed that *A. fraterculus*' immature ovaries start major morphogenesis alterations on the third day after emergence and vitellogenesis only on the fourth day. Many studies correlate high levels of polyamines to the beginning of vitellogenin synthesis (Hagedorn et al., 1975; Racioppi et al., 1986). Since polyamines depend on ODC content, the high levels of ODC observed in our work can be explained by the need of polyamines to the vitellogenesis.

Birnbaum and Gilbert (1990) suggested temporal similarities between vitellogenin synthesis and ODC activity in *Drosophila*. When adult eclose, the vitellogenin synthesis is low, but it increases substantially during the first day of adult life. Because elevated ODC activity can not be detected in adult males, Birnbaum and Gilbert (1990) suggested that there is a relationship between ODC activity and vitellogenesis in *Drosophila*. In addition, these authors also suggested that in *Drosophila* the fat body can be responsible for the high ODC

activity during vitellogenesis. Our results showed a high ODC activity in the fat body of young females, suggesting a connection of vitellogenesis synthesis and polyamine levels which is in accordance with literature data (Bownes and Hames, 1978; Jowet and Postlethwait, 1980; Birnbaum and Gilbert, 1990). The increase in ovarian ODC activity could also suggest that its function is linked to the vitellogenesis process. Yolk proteins are major constituents of oviposited eggs and mature oocytes. These yolk proteins have a dual origin in *Drosophila*: one in fat body and another in the ovaries (Postlethwait and Shirk, 1981). This finding can explain why young females' ovaries and fat body showed high ODC activity.

We studied ODC activity kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) in three stages of *A. fraterculus* development: larva, pupa, and young ovaries. In our study, kinetic parameters observed in the pupa were similar to the values observed in other insects. The apparent  $K_m$  ( $K_m$  app) in *Drosophila melanogaster* was estimated to be near 0.27mM in whole body extracts (Byus and Herbst, 1976) while in fat body extracts of *Manduca sexta* (Birnbaum and Whelan, 1988) it was estimated at 0.3mM, and in *H. cecropia* (Wyatt et al., 1973) the  $K_m$  app was 0.2mM. All these values are similar to those reported for mammalian tissues (O'Brien et al., 1986).

However, larva and young female ovaries did not follow this behavior, showing great variations in the present analysis. While the  $K_m$  app for pupae was 207mM, the values for larva and young females' ovaries were 438mM and 1600mM respectively, and  $V_{max}$  9.1, 47.6 and 50.0 pmol of  $CO_2$ /mg protein/minute for pupa, larva and young females' ovaries.

Our results showed that ODC activity in the ovary samples was slightly higher in homogenates treated with the addition of GTP. However, in the pupa samples, the increase in ODC activity in homogenates treated with GTP was significantly higher. These results could

suggest that in young ovaries the ODC activity is already maximal and that the GTP addition has no significant effect. In the pupae, the added GTP had a great effect: a 3-fold increase in ODC activity compared to the control (Figure 3).

Studies in rat brains have shown the activation of ODC by GTP. This ability to activate brain ODC was stronger in cerebellum enzymes and weaker in hippocampus ODC. The  $K_m$  value is affected by GTP and the value of  $V_{max}$  also changes in every brain region (Kilpelainen and Heitala, 1994). These results suggest that the GTP effect on ODC activity is tissue-specific.

Post-translational modification in ODC could account for the high  $K_m$  observed, especially in young females' ovaries. As already discussed, this tissue presents vitellogenesis. Our data suggest that this post-translational modification in ODC could be present in *A. fraterculus* which would lead to the  $K_m$  and  $V_{max}$  fluctuations observed in the experiments carried out without GTP addition. The exact molecular mechanism involved in this modification is not clear. GTP could bind to ODC, directly affecting its catalytic function, or GTP could activate a GTP-binding protein which mediates the activation of ODC, or it could be the substrate of GTP-dependent kinase which phosphorylates ODC. (Atmar and Kuehn, 1983; Kilpelainen and Heitala, 1994).

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Luiz Gonzaga Ribeiro from Epagri/ Estação Experimental de São Joaquim, Brazil for fly supply, and CNPq, FAPERGS and FINEP for grants and fellowships.

### Literature Cited

- Atmar VJ, Kuehn GD. 1983. Polyamine-Dependent Protein Kinase and Phosphorylation of Ornithine Decarboxylase in *Physarum polycephalum*. *Methods Enzymol* 99: 366-372.
- Besson MT, Delbecq J, Mathelin J, Boisson AM. 1986. Epidermal polyamine levels related to cell cycle events during the metamorphosis of *Tenebrio molitor* L. (insect, coleoptera); effect of juvenoid application. *Comp Biochem Physiol* 83B: 589-593.
- Birnbaum MJ, Gilbert LI. 1990. Juvenile hormone stimulation of ornithine decarboxylase activity during vitellogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol B* 160: 145-151.
- Birnbaum MJ, Whelan T. 1988. Temporal alterations of ornithine decarboxylase activity in development of *Manduca*. *Insect Biochem* 18: 853-859.
- Bownes M, Hames BD, 1978. Analysis of yolk proteins of *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*. 96: 327-330.
- Bressan S. 1996. Desenvolvimento e potencial reprodutivo das fêmeas de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae) em condições naturais. *Rev Bras Entom* 40: 11-16.
- Byus CV, Herbst EJ. 1976. Decarboxylases for polyamines biosynthesis in *Drosophila melanogaster* larvae. *Biochem J* 154: 31-33.
- Cardoso VV, Ferreira MP, Montagner JM, Fernandez CG, Moreira JC, Oliveira AK. 2002. The effects of constant and alternating temperatures on reproductive potential, life span,

- and life expectancy of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann)(Diptera: Tephritidae). *Braz J Biol* 62(4): 775-786.
- Cayre M, Tirard A, Charpin P, Augier R, Strambi C, Strambi A. 1995. Age and tissue-dependent changes of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase activities in neuronal tissue and fat body of adults crickets. *Arch Insect Biochem Physiol* 24: 219-228.
- Cohen SS. 1998. A guide to polyamines. Oxford University Press, INC, New York.
- Fredlund JO, Johansson MM, Dahlberg E, Oredsoson TM. 1995. Ornithine decarboxylase and s-adenosylmethionine decarboxylase expression during the cell cycle of Chinese hamster ovary cells. *Exp. Cell Res.* 216: 86-92.
- Hagedorn HH, O'Connor JD, Fuchs MS., Sage B, Schlaeger DA, Bohm MK. 1975. The ovary as a source of  $\alpha$ -ecdysone in an adult mosquito. *Proc Natl Acad Sci USA.* 72: 3255-3259
- Heby O, Sarna GP, Marton LJ, Omine M, Perry S., Russel DH., 1973. Polyamines content of AKR leukemic cells in relation to the cell cycle *Cancer Res* 33: 2959-2964.
- Heby O, 1981. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation.* 19: 1-20.
- Heby O, Emanuelsson, H, 1981. Role of the polyamines in germ cell differentiation and in early embryonic development. *Med Biol* 59, 417-422.
- Jowet T, Postlethwait JH, 1980. The regulation of yolk polypeptide synthesis in *Drosophila* ovaries and fat body by 20-hydroxyecdysone and a juvenile hormone analog. *Dev Biol* 80: 225-234
- Kahana C, Nathans D, 1985. Translational regulation of mammalian ornithine decarboxylase

- by polyamines. J. Biol. Chem. 260: 5390-15393.
- Kilpelainen PT, Heitala OA, 1994. Activation of rat brain Ornithine decarboxylase by GTP. Biochem J 300: 77-582.
- Kogan HP, Hagedorn HH, 2000. Polyamines, and effects from reducing their synthesis during egg development in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. J. Physiol. 46: 1079-1095.
- Kusunoki S, Yamasu I, 1978. Inhibitory effect of  $\alpha$ -hydrazinoornithine on egg cleavage in sea urchin eggs. Dev Biol 67: 36-345.
- Lowkvist B, Emmanuelsson H, Heby O, 1983. Effects of polyamines limitation on nucleolar development and morphology in early chick embryos. Cell Differentiation. 12: 19-26.
- Lowry OH; Rosenbrough, NJ; Farr, AL, Randall, RJJ, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol Chem 193: 265-275.
- Lundquist A, Lowkvist B, Linden M, Heby O, 1983. Polyamines in early embryonic development: their relationship to nuclear multiplication rate, cell cycle traverse, and nucleolar formation in a dipteran egg. Dev Biol 95, 253-259.
- Murakami Y; Tanaka k; Matsufuji S; Miyazaki Y, Hayashi S, 1992. Antizyme, a protein induced by polyamines, accelerates the degradation of ornithine decarboxylase in Chinese-hamster ovary-cell extracts. Bioch J. 283: 661-664.
- Nascimento JC, Oliveira, AK, 1996. Embryogenesis in *Anastrepha fraterculus* (Diptera:Tephritidae). Interciencia. 21(3): 158 165.

- O'Brien TG, Madara T, Pyle JA, Holmes M, 1986. Ornithine decarboxylase from mouse epidermis and epidermal papillomas: differences in enzymatic properties and structure. Proc Natl. Acad Sci USA. 83(24): 9448-9452.
- Pegg AE, 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. Bioch J 234: 249-262.
- Postlethwait JH, Shirk PD, 1981. Genetic and endocrine regulation of vitellogenesis in *Drosophila*. Am Zoo 21: 687-700.
- Racioppi JV, Gemmill RM, Kogan PK, Calvo JM; Hagedorn, HH; 1986. Expression and regulation of vitellogenin messenger RNA in the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Biochem 16: 255-262.
- Selivon D, Morgante JS, Perondini, ALP, 1997. Egg size, yolk mass extrusion and hatching behavior in the cryptic species of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae). Braz J Gen. 20: 587-594.
- Sparks RB; Vaske D; Lillerberg S, Leopold R, 1991. Temporal expression of ornithine decarboxylase in developing embryos of *Musca domestica* L. Arch Insect Biochem Physiol 16: 177-187.
- Strambi C, Tirad A, Renucci M, Faure P, Charpin P, Augier R, Strambi A, 1993. Ecdysone deprivation affects polyamines metabolism in the house cricket *Acheta domesticus*. Insect Biochem and Mol Biol 23: 165-170.
- Svensson F, Ceriani C, Wallstrom EL, Kchum I, Algranati ID, Heby O, Persson L, 1997. Cloning of trypanosomatid gene coding for an ornithine decarboxylase that is metabolically unstable even though it lacks the C-terminal degradation domain. Proc Natl Acad Sci USA. 94(2): 397-402.

- Tabor CW, Tabor H, 1984. Polyamines. *Annu Rev Biochem.* 53: 749-790.
- Thomas T, Thomas TJ, 2001. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci.* 58: 244–258.
- Van Daalen W, Macrae M, Brabant M, Sittler A, Coffino P., 1989. Polyamines-mediated regulation of mouse ornithine decarboxylase is posttranslational. *Mol Cell Biol* 9: 5484-5490.
- Wyatt GR; Rothaus D; Lawler Herbst EJ., 1973. Ornithine decarboxylase and polyamines in silkmouth pupal tissues: effects of ecdysones and injury. *Bioch Biophys Acta.* 304: 482-494.
- Zucchi RA, 1999. Espécies de *Anastrepha*, Sinonímias plantas hospedeiras e parasitóides. In *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Conhecimento Básico e Aplicado.* Malavasi A. e Zucchi R. A. (eds). Holos editora, Ribeirão Preto.

## LEGENDS

Figure 1. Specific activity of ODC during development of *A. fraterculus*. Enzyme activity was assessed as described in Materials and Methods; each histogram bar represents mean activity + SE, n=3 different animals. The asterisks indicates statistical differences (Student-Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ). \* = different from all the seven tissues analyzed. \*\* = different from all the four prior to emergence stages (egg, larva, and pupa).

Figure 2. Kinetic parameters of ornithine decarboxylase in *A. fraterculus* pupae. Kinetic parameters ( $K_m$  app and  $V_{max}$ ) were determined from Lineweaver-Burk reciprocal plots. The kinetic parameters indicated  $K_m$  app (207mM) and  $V_{max}$  (9.1 pmol of  $CO_2$ /mg protein/min).

Figure 3. The influence of GTP on ODC activity in *A. fraterculus*. A. Ovaries from 4 days old females. B. Whole pupae. Enzyme activity was determined as described in Materials and Methods. Each histogram bar represents proportions of ODC mean activity + SE, recorded in controls, represented by C (for panel A 100% = 7.14 nmol of  $CO_2$ /mg protein/min) and for panel B 100% = 262 pmol of  $CO_2$ /mg protein/min.). The asterisk indicates significantly increased activity (t-test for independent samples,  $p < 0.05$ , n= 3 different animals).

Figure 4. The influence of GTP dosage on ODC activity in *A. fraterculus*. A. Ovaries from 4 day old females. B. Whole pupae. Enzyme activity was determined as described in Materials and Methods. Data points represent mean +SE, n=3 different animals.



Figure 1

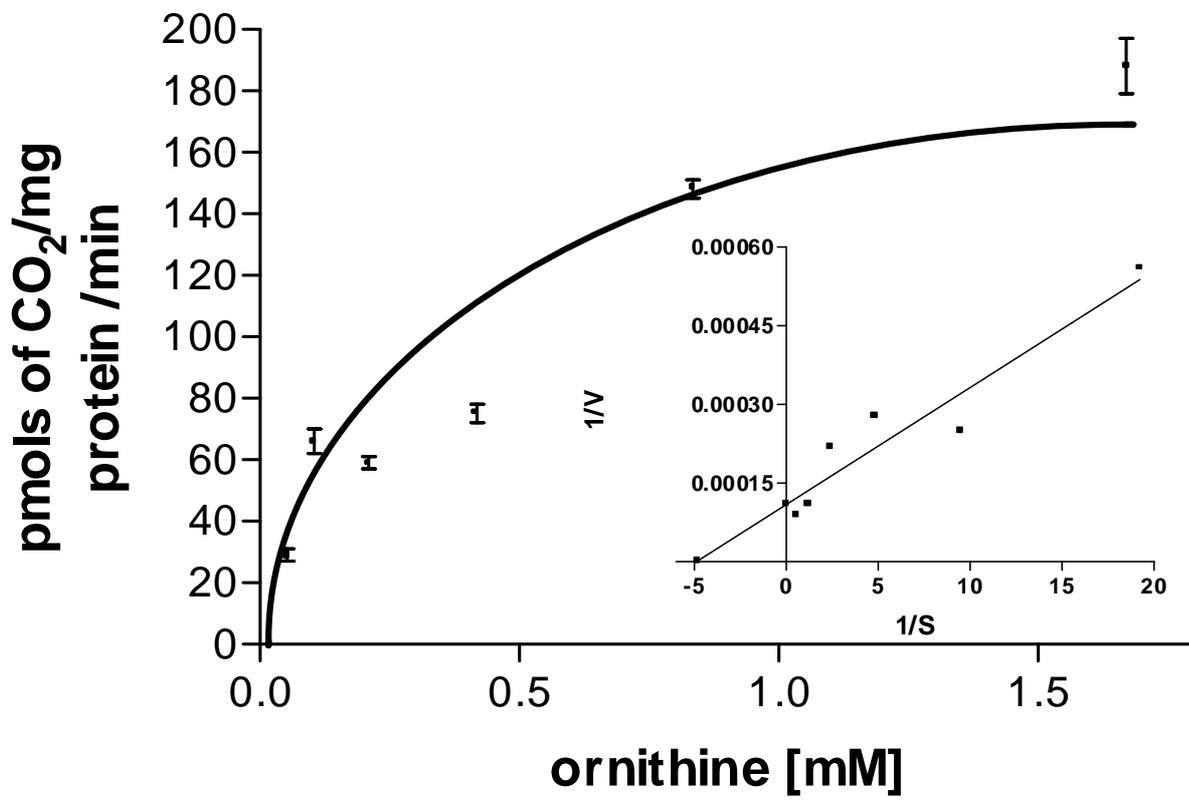


Figure 2

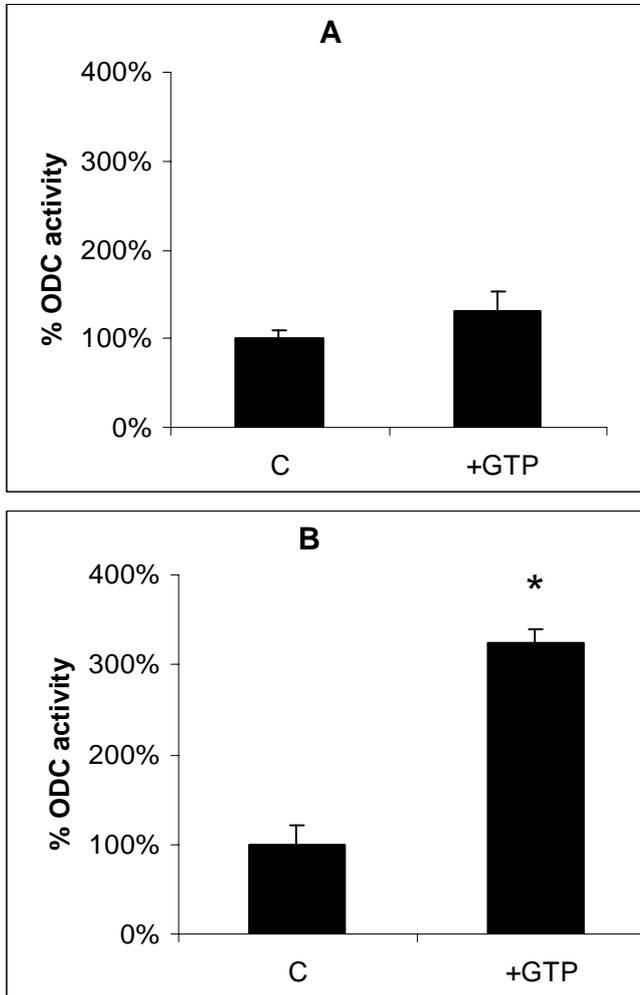


Figure 3

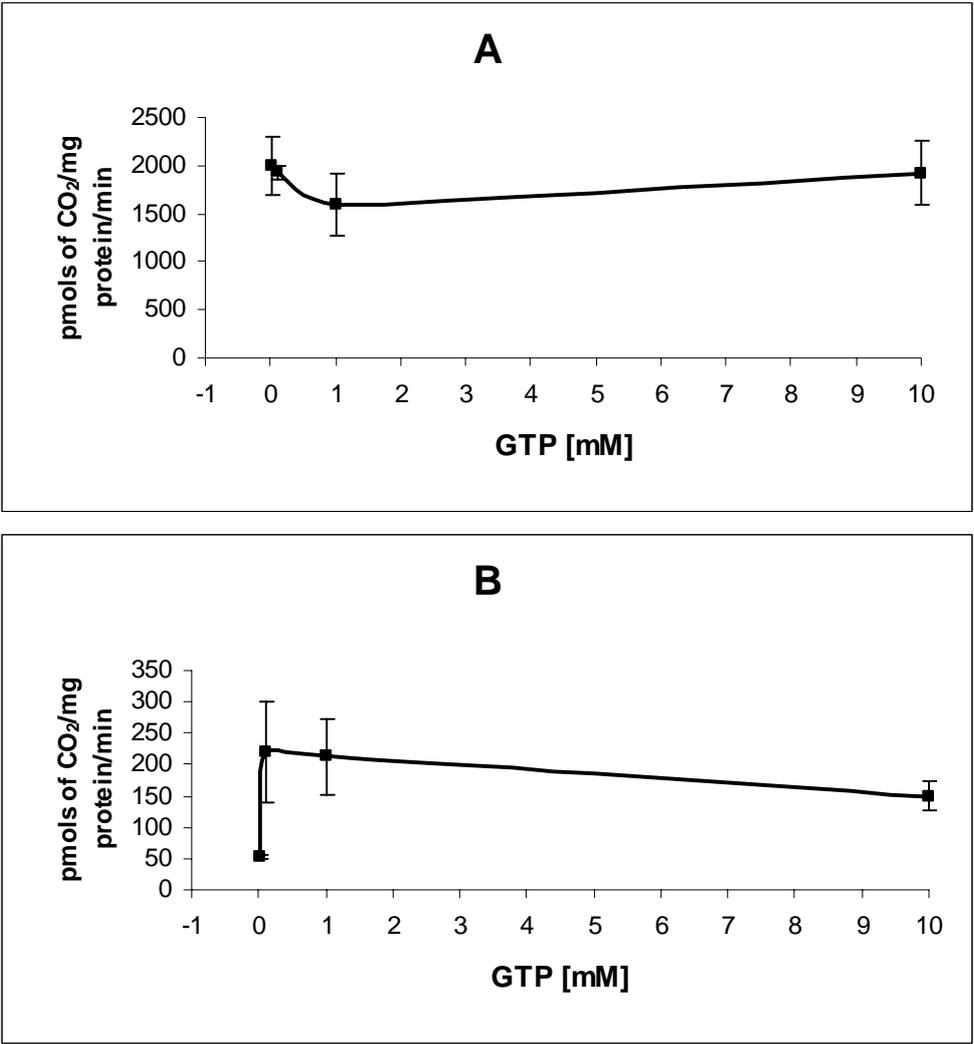


Figure 4

Table I. **Kinetic Parameters in *Anastrepha fraterculus* larva, pupa and young ovaries** ( $K_m$  app in mM and  $V_{max}$  in pmol of  $CO_2$ /mg protein /minute).

	Larva	Pupa	Young ovaries
$K_m$ app	438	207	1.660
$V_{max}$	47.6	9.1	50.0

## Capítulo II

### **Changes in ornithine decarboxylase activity in response to temperature stress and stimulation of juvenile hormone in *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae).**

---

Cardoso VV, Prestes PR, Moreira JCF, Oliveira, AK

Arch

Insect

Bioch

Physiol

no

prelo.

**Changes in ornithine decarboxylase activity in response to temperature stress and stimulation of juvenile hormone in *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae)**

**Cardoso, V.V.<sup>1</sup>; Prestes, P.R.<sup>1</sup>; Moreira, J.C.F.<sup>2</sup>; Oliveira A.K.<sup>1</sup>.**

1-Departamento de Genética - Laboratório de Genética do Desenvolvimento, Instituto de Biociências - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, RS, Brazil.

2-Departamento de Bioquímica - Instituto de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, RS, Brazil

Send correspondence to:

Dra. Valesca Veiga Cardoso: Departamento de Genética - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP: 91501-970 - Agronomia, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 (51) 3316-6732. E-mail: [anastrefa@ig.com.br](mailto:anastrefa@ig.com.br)

## **Abstract**

ODC activity was analyzed in *Anastrepha fraterculus* females (4 day old) submitted to temperature stress (6°C and 20/6°C) and the topical application of juvenile hormone (JH). ODC activity and ejaculatory apodeme measurements (length and width) were made in males (15 day old) after 6°C stress. JH concentration of 500 ng and time incubation of 3, 7, and 18 hours increased ODC activity. Females reared at 6°C and 20/6°C showed higher ODC activity than those reared at 25°C. The treatment of 6°C and JH incubation for one hour increased ODC activity when compared to 6°C treatments only. However, the treatment of 20/6°C only after 3 or 18 hours of JH incubation showed higher ODC activity than controls (20/6°C) or 20/6°C plus one hour of JH incubation. Males did not show differences in ODC activity when reared at 6°C or 25°C but the ejaculatory apodeme measurements was higher in those reared at 25°C than in those reared at 6°C. The results can be considered an adaptive process to environmental changes.

**Keywords:** *Anastrepha fraterculus*, ornithine decarboxylase, juvenile hormone, temperature.

## Introduction

Ornithine decarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17) is one of the major regulatory enzymes in the polyamine biosynthesis pathway and several studies have confirmed its importance in organism development. Polyamines are ubiquitous aliphatic cations intimately involved in the control of cell growth and cell division. Putrescine, spermidine and spermine appear to be required during animal embryogenesis (Heby, 1981; Tabor and Tabor, 1984).

In vertebrates, several studies evidenced hormone induced changes in ODC activity (Slotkin et al., 1984; Cousin et al., 1982). The ability of specific hormones to stimulate ODC activity in their target organs was also clearly established by Janne et al., 1978 and correlative changes in polyamine levels were observed in different tissues (Russel, 1989).

Although only a few studies have been done on the role of ODC and polyamines in insects, it has been established that, as far as vertebrates are concerned, a specific ODC and a polyamine developmental pattern characterize each organ (Birnbaum and Whelan, 1988; Cayre et al, 1993; Strambi et al. 1993). Correlative changes between hormone levels and polyamine metabolism have also been described and 20-hydroxyecdysone has been shown to increase ODC activity in silkworm pupal tissues (Wyatt et al. 1973). Similarly, the juvenile hormone (JH) stimulated ODC activity in fat body during vitellogenesis of *Drosophila melanogaster* (Birnbaum and Gilbert, 1990). In *Acheta domesticus*, the removal of the endocrine glands producing JH, during the last larval instars, strongly depressed ODC activity and reduced polyamine levels in adult fat body and neural tissue, whereas JH injection into hormone-deprived insects enhanced enzyme activity and increased polyamine titres (Cayre et al, 1995).

Adult insects of different species respond to unfavorable environmental conditions such as high and low temperature involving the metabolism of JH, dopamine, octopamine and ecdysteroids. The changes in JH and in the metabolism of other enzymes result in a dramatic decrease in fertility in a few days. This effect allows the population to postpone eggs' laying until the end of the unfavorable conditions (Rauschenbach et.al, 1996).

*Anastrepha fraterculus* is one of about 195 species of the *Anastrepha* genus. It is distributed throughout Continental America- from Texas to Chile and this fly is considered to be one of the most important pests in the southern Brazilian fruit cultures. The apple production area shows temperature fluctuation. Despite winter stress few flies survive, increase their number in the beginning of spring, oviposit in early stages of apple development leading to the fall off of the host fruit causing great damage to apple production. Temperature is one determinant of tephritid frequency, affecting either directly or indirectly, the rate of development (Bateman, 1972). The knowledge about the effect of temperature fluctuation, which is the rule in Brazilian apple production area, over some biological parameters of this fly species, can be used to carry out fly monitoring and to apply more efficient methods of pest management.

In a previous study, Cardoso et al. (2002) observed the effects of constant and alternating temperatures on the reproductive potential and ODC activity of 30-day old *Anastrepha fraterculus* mature females. At 6°C the females did not show ovarian development and the males had the smallest ejaculatory apodeme measures when compared with males of the other temperature conditions. Females reared at alternating temperatures present ovarian development delaying because, while females reared at 25 ° C showed the first mature ovarian at 30 day old, in females at alternating temperature this occurred only at more advanced ages

(20/6°C = 60 days; 20/13°C = 90 days). Oviposition and egg eclosion were high at 30 and 60 day old at 25°C; at 20/6°C these parameters were high from 90 until 180 days. The performance at 20/13°C was more or less intermediary between 25°C and 20/6°C. Males showed high number of spermatozoa at 15 day old in all conditions but, while at 25°C this number was maintained until 30 day old and decreased slowly in older ages, at 6°C and alternating temperatures this not occurred, and it was observed another spermatozoa number peak at 45 day old. Spermatozoa were observed until 90 days in all experimental and control conditions. ODC activity was higher (115%) in animals reared at 6°C when compared to those at 25°C (100%) or alternating temperatures (20/6°C = 91%; 20/13°C = 106.5%). Increased activity of ODC in females' ovary at 6°C was related to its development stage that was classified as immature (80%) and in development (20%) at 30 days when the ODC activity was measured.

To know the relationship among temperature stress, ODC activity and effect of JH on *A. fraterculus*, in current study, we observed the effects of JH alone or simultaneous exposure to JH and temperature stress on ODC activity in young females (4 day old), and the effect of temperature stress on ODC activity and ejaculatory apodeme measurements in 15 day old *A. fraterculus* males.

## **2. Materials And Methods**

### **2.1. Animals**

Infested fruit (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) was collected in the town of São Joaquim (SC, Brazil) and kept under laboratory conditions at 25°C ±1°C, L:D of 12:12 cycle, and 60-80RH. After adult eclosion, the F1 was distributed into plastic cages (19x13x13cm) and provided with food (brown sugar: soy bean flour: wheat flour 3:1:1) and water.

### **2.2. Effects of juvenile hormone on ODC activity**

Female adult (4 day old) abdomens were isolated from the thorax and were treated topically on their ventral surface with 5ul olive oil containing crescent concentrations (250 ng, 500 ng, 750 ng, 1000 ng, and 2000 ng ) of juvenile hormone analogue (JH III, Sigma-Aldrich Inc.); 5 µl of olive oil only was applied to control abdomens. The treated abdomens were placed in small Petry dishes with filter paper moistened with water. The Petry dishes were kept in a moist atmosphere at 25°C until homogenization. Hormone incubation time was 1, 3, 7, and 18 hours; after these times the abdomens were homogenized and ODC activity was measured. The enzymatic activity was determined by the method described by Wyatt et al. (1973), modified by Cardoso et al.(2002).

Tissues were placed in Ringer solution and homogenated in a medium containing 0.25 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.7, 0.1 mM EDTA and 5 mM dithiothreitol. After centrifugation of homogenates at 25000 x g for 10 min, the supernatant fractions were used as

enzyme source. ODC was assayed by the release of  $^{14}\text{CO}_2$  by  $[\text{C}^{14}]$ -L-ornithine. The assay mixtures contained 42 mM Tris-HCl buffer, pH 7.1, 0.04 mM pyridoxal 5-phosphate, 5 mM dithiothreitol and  $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -L-ornithine (0.1  $\mu\text{Ci}$ ) plus L-ornithine in concentration of saturation. The process of enzymatic reaction was carried out in a closed system (a plastic vial containing the substrate and the sample was put inside a glass vial containing a piece of filter paper previously treated with 50  $\mu\text{l}$  of 1M NaOH for trapping released  $\text{CO}_2$  after incubation and acidification. One hour of incubation at 37°C took place in a Dubnoff bath under agitation and then stopped by the addition of 250  $\mu\text{l}$  of 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  from the plastic vial). After 30 minutes, the pieces of filter paper were collected, and the absorbed  $^{14}\text{CO}_2$  which was released was measured by liquid scintillation. Total protein content was measured by the method of Lowry et al. (1951).

### **2.3. Effect of JH and temperature stress on ODC activity**

Newly-eclosed females were distributed in plastic cages and kept under standard laboratory conditions at L:D of 12:12 cycle, and 60-80 RH. Some flies were put at constant temperatures of 25°C and 6°C while other flies were placed at the alternating temperatures of 20/6°C ( 24 hours at 20°C followed by 24 hours at successively) . The temperatures of 20°C and 6°C correspond to the maximal and minimal mean temperatures of winter and autumn, respectively, in the apple production area (Humeres et al., 1996). After four days under these temperature conditions the abdomens were isolated and then treated topically on their ventral surface with 5  $\mu\text{l}$  olive oil containing 500 ng of the JH III; 5  $\mu\text{l}$  of olive oil only was applied to

control abdomens. The abdomens were placed in small Petry dishes with filter paper moistened with water. We used 1, 3, and 18 hours of hormone incubation and a moist atmosphere at 25°C. After these incubation times, the abdomens were homogenized and activity was measured. The enzymatic activity was determined by the method described by Wyatt et al. (1973), modified by Cardoso et al.(2002), as described above.

#### **2.4. Effect of temperature stress on ODC activity and on ejaculatory apodeme measurements in males of *A. fraterculus***

Newly-eclosed males were distributed in plastic cages and kept under standard laboratory conditions at L:D of 12:12 cycle, and 60-80 RH. Some flies were put at a constant temperature of 25°C, and other males at 6°C. According to Cardoso et al. (2002), the highest number of spermatozoa and the biggest ejaculatory apodeme measurements at 25°C begin after 15 days and last until the 30<sup>th</sup> day. So, in our study, we decided to isolate, homogenize and measure ODC activity in the abdomens of both temperature fly groups after 15 days. The enzymatic activity was determined by the method described by Wyatt et al. (1973), modified by Cardoso et al. (2002), as described above. In addition, groups of 10 males from each temperature were dissected in physiological Ephrussi solution, and the ejaculatory apodeme measured (length and width) under a Leica microscope (x 5) coupled to a computer using a software called Somniun, an application for data processing developed in Interactive Data Language (IDL) by the Laboratory of Vegetable Anatomy at the Federal University of Rio

Grande do Sul, Brazil. IDL is a complete computing environment for the interactive analysis and visualization of data.

## **2.5. Statistical analysis**

The effect of juvenile hormone concentration and of the association of JH treatment with temperature stress on ODC activity was analyzed by ANOVA, Dunnett's test, where all treatments were compared to control and  $p < 0.05$ . The effect of temperature stress in females and males and also of JH incubation times in females on ODC activity were analyzed by t-test for independent samples and  $p < 0.05$ . The measurements (length and width) made from ejaculatory apodemes were analyzed by non-parametric Kruskal-Wallis statistical analysis and  $p < 0.05$ .

### **3. RESULTS**

#### **3.1. Effect of juvenile hormone concentration and incubation time on ODC activity**

ODC activity was significantly increased when stimulated by a JH concentration of 500 ng (Fig.1). In the remainder concentrations (250, 750, 1000 and 2000 ng), ODC activity was not different from the control (ANOVA, Dunnett's test, all treatments compared to control,  $p < 0.05$ ).

#### **Figure 1 here**

Incubation times (3, 7, and 18 hours) of the hormone demonstrated an effective stimulation of ODC activity when compared to their controls (Fig.2). The incubation times of 3, 7, and 18 hours showed the highest ODC activity of  $148 \pm 20$  pmols of  $\text{CO}_2/\text{mg}$  protein/min,  $135 \pm 14$  pmols of  $\text{CO}_2/\text{mg}$  protein/min, and  $112 \pm 4$  pmols of  $\text{CO}_2/\text{mg}$  protein/min respectively, when compared to their corresponding controls:  $75 \pm 10$  pmols of  $\text{CO}_2/\text{mg}$  protein/min,  $99 \pm 2$  pmols of  $\text{CO}_2/\text{mg}$  protein/min, and  $75 \pm 2$  pmols of  $\text{CO}_2/\text{mg}$  protein/min.

#### **Figure 2 here**

### **3.2. Effect of temperature stress and temperature stress associated with JH on ODC activity**

ODC activity was significantly higher (t-test for independent samples,  $p < 0.05$ ) in females reared at 6°C ( $70 \pm 4.6$  pmols of CO<sub>2</sub>/mg protein/min) than in those reared at 25°C ( $39 \pm 0.88$  pmols of CO<sub>2</sub>/mg protein/min) (Fig. 3A). Equivalent results were observed at alternating temperatures of 20/6°C ( $152 \pm 8$  pmols of CO<sub>2</sub>/mg protein/min) and at 25°C ( $71 \pm 4$  pmols of CO<sub>2</sub>/mg protein/min) (Fig. 3B).

By using ANOVA, Dunnett's test, where data were log-transformed before analysis and all treatments were compared to controls, ODC activity (measured in females kept at 6°C and treated with different incubation times of JH) showed its highest effect ( $185 \pm 38$  pmols of CO<sub>2</sub>/mg protein/min) after one hour of incubation when compared to its control reared at 6°C without JH treatment ( $70 \pm 4.6$  pmols of CO<sub>2</sub>/mg protein/min).

JH incubation times of 3 and 18 hours at 6°C did not show differences in ODC activity when compared to flies kept at 6°C without JH treatment (Fig. 3A).

However, ODC activity was significantly higher in females treated with JH, kept at 20/6°C, and incubated for 3 and 18 hours only ( $262 \pm 20$  pmols of CO<sub>2</sub>/mg protein/min, and  $230 \pm 17$  pmols of CO<sub>2</sub>/mg protein/min, respectively) than ODC activity in females kept at 20/6°C without JH treatment ( $152 \pm 8$  pmols of CO<sub>2</sub>/mg protein/min) or kept at 20/6°C plus 1 hour of JH incubation ( $138 \pm 8$  pmols of CO<sub>2</sub>/mg protein/min) (Fig. 3B).

**Figure 3 here**

### **3.3. Effect of temperature stress on ODC activity and on ejaculatory apodeme measurements in *A. fraterculus* males**

ODC activity was not significantly different by t-test for independent samples,  $p < 0.05$  in males reared at 6°C ( $258 \pm 52$  pmols of CO<sub>2</sub>/mg protein/min) and at 25°C ( $316 \pm 7.2$  pmols of CO<sub>2</sub>/mg protein/min (Fig. 4).

The measurements (length and width) made in ejaculatory apodemes showed significant differences between males kept at 6°C or at 25°C (Table 1) by the non-parametric Kruskal-Wallis statistical analysis. The ejaculatory apodeme length at 25°C was  $0.0019 \pm 0.0005$  mm and at 6°C it was  $0.0010 \pm 0.0006$  mm. The ejaculatory apodeme width at 25°C was  $0.0041 \pm 0.0006$  mm and at 6°C it was  $0.003 \pm 0.0007$  mm.

**Figure 4 here**

**Table 1 here**

## Discussion

The JH is an essential component of the insect endocrine system, regulating the reproductive maturation and controlling the reproductive diapause in adults of many insect species (Gilbert et al., 2000). It is commonly accepted that JH acts as a gonadotropin by affecting vitellogenesis in many insect species (Koeppel et al., 1985). JH may serve as a hormonal signal in the ovary to stimulate the production of a number of mRNAs in nurse cells. These mRNAs are then captured by the mature egg following fertilization (Dubrovsky et al., 2002).

*D. melanogaster*, during vitellogenesis, had an increased ODC activity in isolated abdomens induced by JH applications, thus suggesting the involvement of JH in the regulation of polyamine synthesis (Birnbaum and Gilbert, 1990). JH regulates vitellogenesis biosynthesis (Kelly et al., 1987) and is an important regulator of polyamine synthesis in other insects (Heby, 1981). In *Anastrepha suspensa*, the yolk protein (YP) synthesis was not significantly increased after using a juvenile hormone analog in the isolated abdomens of females (Handler, 1997). However, this author suggests that if hormone actually has an effect on YP synthesis, it may depend on specific concentrations, development periods, or nutrition. As he used abdomens of 2.5 day old females, probably these flies didn't begin the vitellogenesis which normally starts at the 4<sup>th</sup> day after eclosion (Bressan and Telles, 1991).

In this study, it was demonstrated that *A. fraterculus* females stimulated by JH increase the ODC activity in the beginning of vitellogenesis ( $\pm 4$  day old) (Fig. 2). Cardoso et al. (2002) showed that 15 day old females kept at 25°C had 80% of the ovaries in development (with

oocytes of the first order in formation but without chorionated oocytes) and 20% as immature, while 30 day old females showed 60% of mature ovaries (with chorionated oocytes) and 40% classified as in development. Furthermore, just after eclosion, *A. fraterculus* females are reproductively immature and JH can play an important role in the sexual maturation which is extended until almost 15 days and, for this reason JH incubation times (3, 7 and 18 hours) carried out in 4-day old females increased ODC activity. This result could be supported by findings in females of *Acheta domesticus* which also increase ODC and S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) activity in fat body simultaneously with the increase of JH during the vitellogenesis phase which occurs at the beginning of imaginal life (Cayre et al., 1993).

In our study, it was observed that females kept under the stress of temperature (6°C and alternating 20/6°C) when compared to females at control temperature (25°C) (Fig. 3A and B) demonstrated significantly increased ODC activity. Similarly, a significant increase in ODC activity and putrescine content has been shown after traumatic brain injury or rat brain ischemia, and it was suggested that the induction of ODC activity and polyamines metabolism after trauma is an integral part of the biochemical protection program (Henley et al., 1997; Rohn et al., 1992). The increase in polyamines levels and ODC activity was recently demonstrated in the liver and brain of goldfish as a response to variations in the diet, salinity, temperature, season, and presence of heavy metals (Davalli et al; 1990; Notari et al., 2004). Wyatt et al. (1973), in studies with silkworm, demonstrated that the increase in ODC activity is due to a variety of stressful procedures, a phenomenon they called “injury syndrome”. In our experiment, the stressful continuous low temperature (6°C), as well as the alternating temperatures (20/6°C), induced an increase in ODC activity in females. This is in agreement with the suggestion of ODC’s and

polyamines' metabolism protective roles after trauma or stress. ODC's activity increase in *A. fraterculus* after stressful temperatures can be considered an adaptive process to environmental changes in the Brazilian apple production area.

Another important result of the present study was the potential action of JH incubation after temperature stress (6°C and 20/6°C). JH stimulated ODC activity in the abdomens of females kept at both temperatures. This result could be due to the fact that ODC can be induced rapidly up to a hundred fold by a great variety of cell growth and proliferation stimulating factors; among these factors are hormones. This stimulation of JH after temperature stress could suggest that the females kept under these conditions had reduced JH levels and when topical JH application is made hormonal levels are restored and this stimulates ODC activity. In cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, kept at short day and low temperature conditions, reduced JH levels and also reduced ovarian development were observed (Zhou et al., 2000). This was also observed in our experiment where ovarian measurements carried out in females reared at 6°C showed a smaller size when compared to ovaries of females kept at 25°C. At 6°C, full ovarian development was never observed. In alternating temperature cycle only in females 60 days old ovarian size was developed (Cardoso et al., 2002).

However, the amount of time for this potential JH stimulation was different in each treatment (Fig. 3). In alternating temperatures, only after 3 hours of incubation did a significant increase in ODC activity, whereas at a continuous temperature of 6°C a significant increase occurred after 1 hour. This response difference can be due to the fact that a continuous temperature (6°C) is more severe and more stressful than alternating temperatures. The combination of high and low temperatures minimized the effect of an extreme temperature (6°C)

functioning as a fly's acclimation. Meats (1983) analyzed the effect of alternating and constant temperature regimes in adult and pupal stages of *Dacus tryoni* and observed that the damage of low temperatures is minimized when the insect is submitted to brief periods of less severe temperatures. The increase in ODC activity after only 1 hour of JH treatment in females kept at 6°C can be due to the rapid need of polyamine synthesis in times of great stress, such as low temperatures.

When females kept at 6°C were JH treated for 3 or 18 hours they showed ODC activity similar to flies kept at 6°C without JH treatment. This result shows that JH incubation time and temperatures are very important in this process because at low temperature, after 3 hours of JH treatment, ODC activity didn't change. In alternating temperatures, a change occurs only after 3 hours or more of JH treatment. It can be inferred that ODC activity increases in the first hour of JH treatment but, after this time the hormone isn't needed to change ODC activity. The same pattern did not occur when flies were kept at alternating temperatures. This last pattern seems similar to that presented by flies kept at a control temperature of 25°C (Fig. 2).

Fifteen day old males kept at a low temperature showed significant differences in measurements (length and width) carried out in the ejaculatory apodeme when compared to males kept at 25°C. The ejaculatory apodeme, unlike the testis, has a progressive growth and plays an important role in the reproductive potential (ejaculation while mating, among other reproductive functions). However, ODC activity was not significantly different among males kept at 6°C and 25°C. This suggests, that in males, the pattern of ODC activity stimulation after temperature stress is different from the behavior observed in females, probably because, in males, vitellogenesis does not occur. This is in agreement with the results obtained by Birnbaum and Gilbert (1990) in

*Drosophila melanogaster* where ODC activity reaches a peak at 24 hours following the eclosion of females, and again this pattern was not observed in males. These authors suggested that polyamine synthesis is involved in the ovarian maturation in the abdomens of *Drosophila*.

Cold hardiness refers to the capacity of an organism to survive to low temperature exposure. A variety of factors are known to influence this capacity including the stage of development, genetic potential, season, duration of exposure, nutritional status, and thermal history. Cold hardening is the acquisition of enhanced cold tolerance through biochemical and physiological processes (Lee, 1991). One of the striking features of cold hardiness in insects is the production of dual cryoprotectants like glycerol and sorbitol (Storey and Storey, 1983). Another possibility of enhanced cold tolerance is the so-called cold shock response, when stress is inflicted by a brief and rapid exposure to low temperatures (Lee, 1991). Enhanced ODC activity is a common response to different stressful stimuli in the mammalian brain (Henley et al., 1997; Rohn et al., 1992) and, in *Escherichia coli* it was reported that spermidine accumulation results in increased synthesis of the cold shock protein at low temperatures (Kornvika and Jones, 2000). Therefore, the variation of ODC activity shown by females in the present work could be an adaptive response to cold in the adult insect submitted to temperature stress.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Luiz Gonzaga Ribeiro from EPAGRI, SC, Brazil, for *Anastrepha fraterculus* supply and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) for grants and fellowships.

### Literature Cited

- Birnbaum MJ, Whelan T. 1988. Temporal alterations of ornithine decarboxylase activity in development of *Manduca*. *Insect Biochem* 18: 853-859.
- Birnbaum MJ, Gilbert LI. 1990. Juvenile hormone stimulation of ornithine decarboxylase activity during vitellogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol B* 160: 145-151.
- Bateman MA. 1972. The ecology of fruit flies. *Ann. Rev. Entomol* 17: 493-511.
- Bressan S, Telles MC. 1991. Ovocênese em *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae). *Rev Bras Entom* 35:691-696.
- Cardoso VV, Ferreira MP, Montagner JM, Fernandez CG, Moreira JC, Oliveira AK. 2002. The effects of constant and alternating temperatures on reproductive potential, life span, and life expectancy of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann)(Diptera: Tephritidae). *Braz J Biol* 62(4): 775-786.
- Cayre M, Tirard A, Charpin P, Augier R, Strambi C, Strambi A. 1993. Age and tissue-dependent changes of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase activities in neuronal tissue and fat body of adults crickets. *Arch Insect Biochem Physiol* 24:219-228.
- Cayre M, Strambi C, Tirard A, Renucci M, Charpin P, Augier R, Strambi A. 1995. Effects of juvenile hormone on polyamines of fat body and neural tissues of the cricket *Acheta domesticus*. *Comp Biochem Physiol* 2: 241-250.

- Cousin MA, Lando D, Moguilewsky M. 1982. Ornithine decarboxylase activity induction by glucocorticoids in brain and liver of adrenalectomized rats. *J Neurochem* 38: 1296-1303.
- Davalli P, Carpena E, Serrazanetti GP, Bettuzzi S, Viviani R, Corti, A. 1990. Responses of polyamine metabolism to metal treatment (Co, Cu, Zn, Cd) in the liver of the goldfish (*Carassius auratus*): Distinct effect of season and temperature. *Comp Biochem Physiol* 97C: 305–310.
- Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Berger EM. 2002. Juvenile hormone signaling during oogenesis in *Drosophila*. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1555-1565.
- Gilbert LI, Granger NA, Roe, RM. 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 617-644.
- Handler MA. 1997. Development regulation of yolk protein gene expression in *Anastrepha suspensa*. *Arch Insect Biochem Physiol* 36:25-35.
- Heby O. 1981. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation*. 19: 1-20.
- Henley CM, Wey K, Takashima A, Mills C, Granmayeh E, Krishnappa I, Robertson CS. 1997. S-adenosylmethionine decarboxylase activity is decreased in the rat cortex after traumatic brain injury. *J Neurochem* 69: 259-265
- Humeres, E, Da Cruz, IB, Ribeiro, LG., Oliveira, AK. 1996. Detection of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) adults in field under winter conditions in São Joaquim county, Brazil. Annual 2nd Meeting of Working Group on Fruit Flies of Western Hemisphere 1: 51.
- Janne J, Poso H, Raina A. 1978. Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochim Biophys Acta* 473: 241-293.

- Kelly TJ, Adams TS, Schwartz MB, Birbaum MJ, Rubenstein EC, Imberski, RB. 1987. Juvenile hormone and ovarian maturation in the Diptera: a review of recent results. *Insect Biochem* 17: 1089-1093.
- Koeppel JK, Fuchs M, Chen TT, Hunt LM, Kovalick GE, Briers T. 1985. The role of juvenile hormone in reproduction. In: Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. (Eds), *Comp Insect Physiol Biochem Pharmacol* Pergamon Press: Oxford, pp. 165–204.
- Kornvika L, Jones P. 2000. Spermidine acetyltransferase is required to prevent spermidine toxicity at low temperatures in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182: 5373-5380.
- Lee RE. 1991. Principles of Insect Low Temperature Tolerance. In: Lee R., Denlinger D.L.(Eds), *Insects at low temperature*. Chapman and Hall Press, New York and London, pp.17-46.
- Lowry OH; Rosenbrough NJ; Farr AL, Randall RJJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 193: 265-275.
- Meats A. 1983. Critical periods for developmental acclimation to cold in the Queensland fruit fly, *Dacus tryoni*. *J Insect Physiol* 29: 943-946.
- Notari S, Lucchi R, Traversa U, Fabbri E, Poli A. 2004. Reversible changes in goldfish brain polyamine concentrations and synthetic enzymes after cold exposure. *Brain Research* 1006: 241– 247.
- Rauschenbach IY, Gruntenko NE, Khlebodarova TM, Mazurov MM, Grenback LG, Sukhanova M, Shumnaja LV, Zakharov IK, Hammock BD. 1996. The role of the degradation system of the juvenile hormone in the reproduction of *Drosophila* under stress. *J Insect Physiol* 42: 735-742.

- Rohn G, Schlenker M, Paschen W. 1992. Activity of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase in transient cerebral ischemia: relationship to the duration of vascular occlusion. *Experimental Neurology* 117: 210-215.
- Russel DH. 1989. The physiological significance of ornithine decarboxylase. In Bacharach, U., Heimer, Y.M., (Eds), *The physiology of polyamines.*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp. 255-288.
- Slotkin TA, Jonhson A, Whitmore WL, Slepatis RJ. 1984. Ornithine decarboxylase and polyamines in developing rat brain and heart: Effects of perinatal hypothyroidism, *Intern J Devel Neur* 2:155-161.
- Storey J.M, Storey KB. 1983. Regulation of crioprotectant metabolism in the overwintering gall fly larvae, *Eurostata solidaginis*: Temperature control of glicerol and sorbitol levels. *J Comp Physiol* 149: 495-502.
- Strambi C, Tirad A, Renucci M, Faure P, Charpin P, Augier R, Strambi A. 1993. Ecdysone deprivation affects polyamines metabolism in the house cricket *Acheta domesticus*. *Insect Biochem Mol Biol* 23: 165-170.
- Tabor CW, Tabor H. 1984. Polyamines. *Ann Review Biochem* 53: 749-790.
- Wyatt GR, Rothaus K, Lawler D, Herbst EJ, 1973. Ornithine decarboxylase and polyamines in silkworm pupal tissues: effects of ecdysones and injury. *Biochim Bioph Acta* 304: 482-494.
- Zhou X, Coll M, Applebaum SW. 2000. Effect of temperature and photoperiod on juvenile hormone biosynthesis and sexual maturation in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*: Implications for life history traits. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 863-868.

## LEGENDS

Figure 1. Effect of different concentrations (0ng, 250ng, 500ng, 750ng, 1000ng, and 2000ng) of juvenile hormone on ODC activity of *Anastrepha fraterculus* females (4 day old). Enzyme activity was assessed as described in Materials and Methods; each point represents mean activity  $\pm$  SE, n=3 different animals. Asterisk indicates statistical difference (ANOVA, Dunnett's test, all treatments were compared to control,  $p < 0.05$ ). This figure shows a representative experiment of 3 independent experiments.

Figure 2. Effect of different JH incubation times (1, 3, 7, and 18 hours) on ODC activity. Enzyme activity was assessed as described in Materials and Methods; each histogram bar represents mean activity  $\pm$  SE, n=3 different animals. Black histogram represents control (without JH incubation) and white histogram represents ODC activity after different JH incubation times. Asterisk indicates statistical difference between animals treated with JH and respective control without JH treatment (t-test for independent samples,  $p < 0.05$ ). This figure shows a representative experiment of 3 independent experiments.

Figure 3 . Effect of JH and temperature stress (6°C and 20/6°C) on ODC activity in females of *A. fraterculus*. Enzyme activity was assessed as described in Materials and Methods; each histogram bar represents mean activity  $\pm$  SE, n=3 different animals. A= females reared at temperature stress of 6°C. B = females reared at temperature stress of 20/6°C. One asterisk indicates statistical differences between temperature stress (6°C and

20/6°C) and control temperature (25°C) (t-test for independent samples,  $p < 0.05$ ). Two asterisks indicate statistical differences between temperature stress (6°C and 20/6°C) and JH incubation times (ANOVA, Dunnett's test, all treatments compared to control,  $p < 0.05$ ).

Figure 4. Effect of temperature stress (6°C) on ODC activity in males of *A. fraterculus*. Enzyme activity was assessed as described in Materials and Methods; each histogram bar represents mean activity  $\pm$  SE, n=3 different animals.

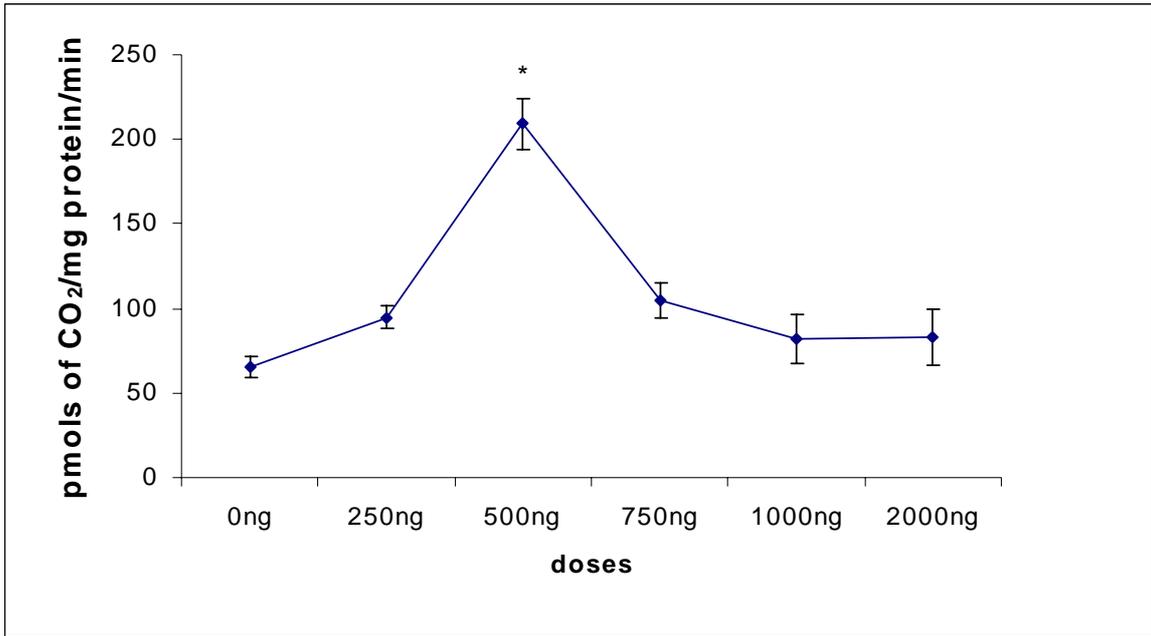


Figure 1

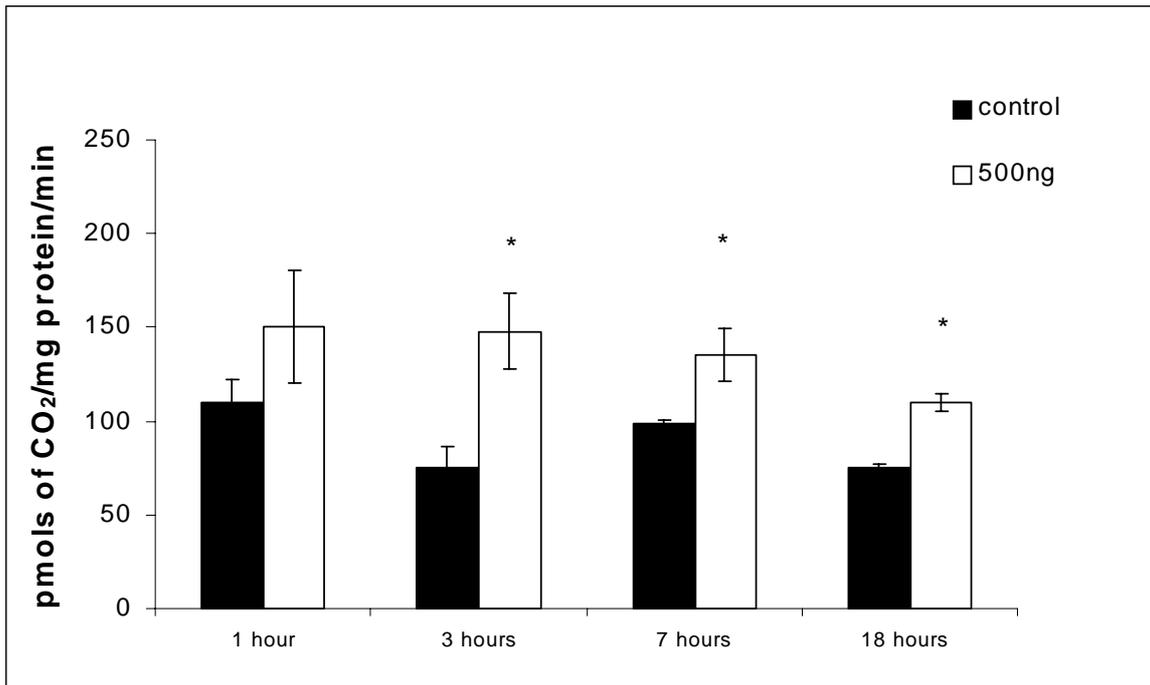


Figure 2

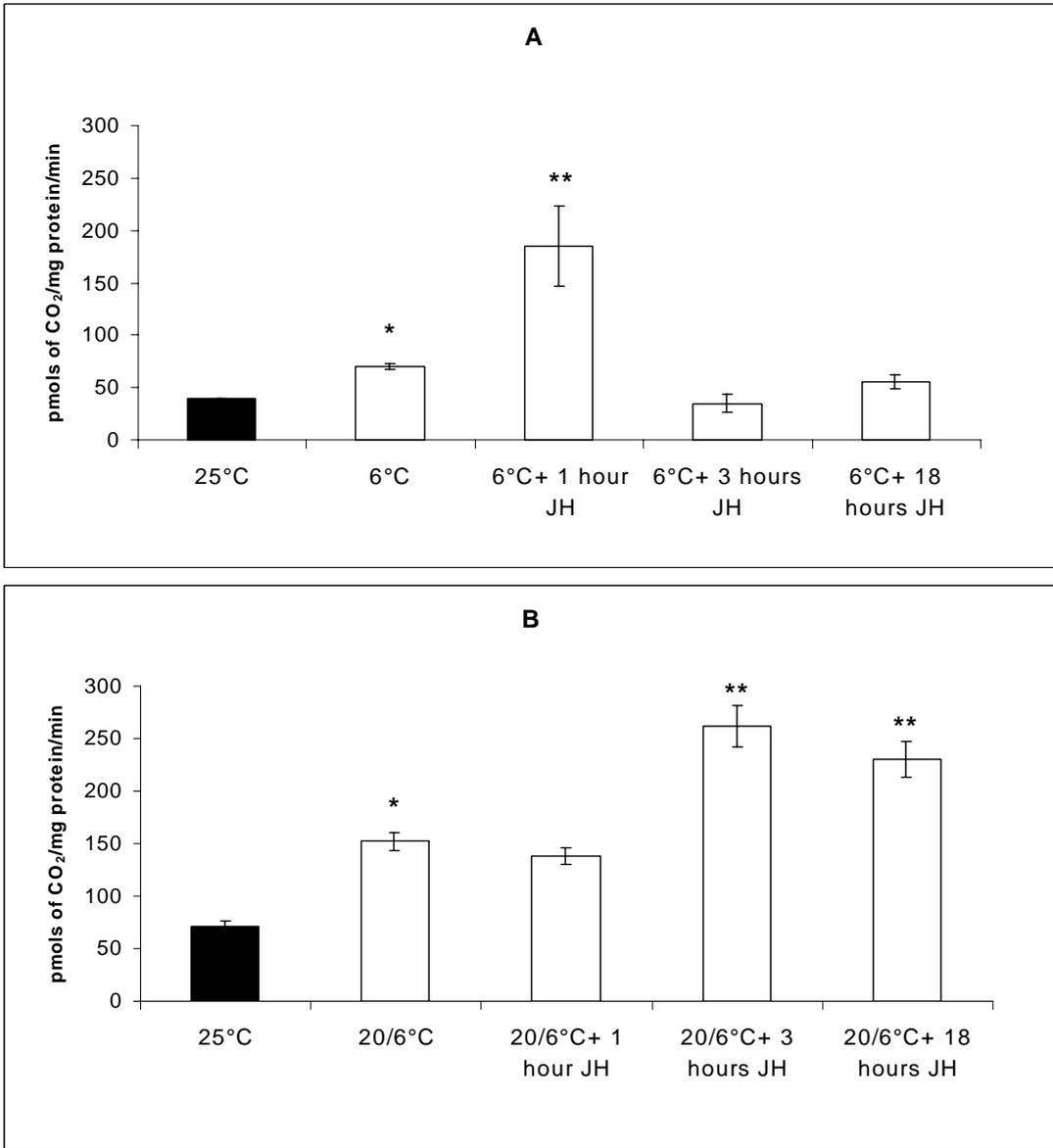


Figure 3

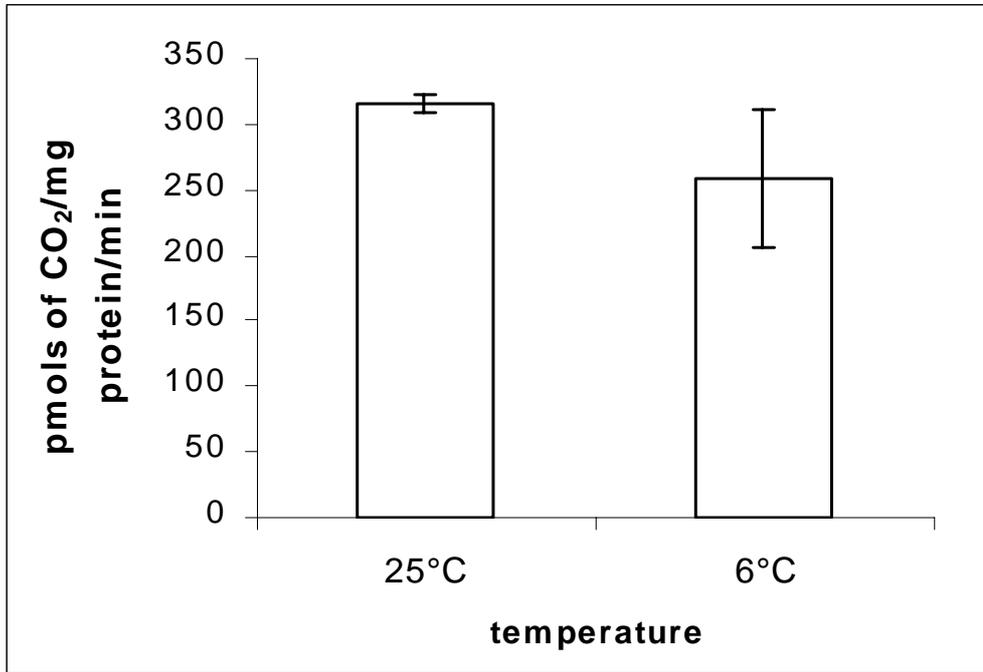


Figure 4

Table 1. Ejaculatory apodeme measurements (length and width) in *A.fraterculus* males. Data obtained at 25°C was control in non-parametric Kruskal-Wallis statistical analysis. \*= significant difference, p<0.05.

	<b>Length (mm)</b> <b>x<math>\pm</math>SE</b>	<b>Width (mm)</b> <b>x<math>\pm</math>SE</b>
<b>25°C</b>	0.0041 $\pm$ 0.0006	0.0019 $\pm$ 0.0005
<b>6°C</b>	0.0030 $\pm$ 0.0007 *	0.0010 $\pm$ 0.0006 *

### Capítulo III

#### Effect of $\alpha$ -difluormethylornithine on *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) ovary size

---

Cardoso VV, Moreira JCF, Oliveira AK

Manuscrito a ser submetido à revista Cellular and Molecular Biochemistry

Short Communication

**Effect of  $\alpha$ -difluormethylornithine on *Anastrepha fraterculus* (Diptera,  
Tephritidae) ovary size**

Cardoso, V.V.<sup>a</sup>, , Moreira, J. C. F.<sup>b</sup>, Oliveira, A. K.<sup>a</sup>.

a - Department of Genetic-IB *UFRGS - Porto Alegre - RS - Brazil*

b- Department of Biochemistry-ICBS; *UFRGS - Porto Alegre - RS – Brazil*

Send correspondence to:

Valesca Veiga Cardoso: Departamento de Genética - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio

Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP: 91501-970 - Agronomia, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 (51) 3316-6732. E-mail: [anastrefa@ig.com.br](mailto:anastrefa@ig.com.br)

## ABSTRACT

Ovarian sizes (length and width) were measured in young females of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera, Tephritidae) treated or not with the inhibitor  $\alpha$ -difluormethylornithine ( $\alpha$ -DFMO). The best concentration of  $\alpha$ -DMFO used was 50 mM and the ovarian measurements (length and width) of treated females were smaller than those of females without  $\alpha$ -DMFO. These data may suggest some relationship between ODC and sexual maturation in *A. fraterculus*.

**Keywords:** *Anastrepha fraterculus*,  $\alpha$ -difluormethylornithine, ovarian size

## INTRODUCTION

Vitellogenesis is a major component of insect oogenesis. Vitellogenesis comprises the synthesis of the yolk protein precursor vitellogenin in fat body, its secretion into the hemolymph, and its transport to the follicles, where they are selectively bound and internalized into oocytes as vitellin (Hagedorn and Kunkel, 1979). Almost all insect follow this paradigm. However in many higher diptera, the ovarian follicular epithelium also provides a source for the same proteins (Jowet and Postlethwait, 1980). In *Drosophila* the JH is thought to be secreted shortly after eclosion and acts in some way to initiate vitellogenin synthesis in both the fat body and ovary, as well as the ovarian uptake of vitellogenin synthesis from hemolymph (Postlethwait and Shirk, 1981; Bownes, 1982, 1986).

Many studies showed that ornithine decarboxylase (ODC; EC 4.1.1.17) activity is needed for insect vitellogenesis and sexual maturation (Birnbaum and Gilbert, 1990; Cardoso, et al. 2004). ODC is very important for polyamine biosynthesis (Tabor and Tabor, 1984). Polyamines are aliphatic cations involved in the control of growth and are required for a wide variety of biological events such as protein synthesis, DNA replication and cell division. Studies of the metabolism during embryonic development of vertebrate and invertebrate have indicated that polyamines can be very important for a good development process. The changes in ODC activity and polyamine synthesis have been followed in *Manduca sexta* (Birnbaum and Whelan, 1988), *Tenebrio molitor* (Besson et al, 1986), *Hyalophora cecropia* (Wyatt et al, 1973), *Drosophila melanogaster* (Birnbaum and Gilbert, 1990), and *Aedes aegypti* (Kogan and Hagerdorn, 2000). Moreover some studies associated normal vitellogenesis with ODC activity which in *Drosophila* reaches a peak at 24 hours following

adult eclosion and is reduced at 48 hours. This pattern is not observed in males. So, it is suggested that polyamine synthesis is involved in ovarian maturation (Birnbaum and Gilbert, 1990).

The  $\alpha$ -difluormethylornithine ( $\alpha$ -DFMO), which is the ornithine decarboxylase suicide inhibitor, have been extensively used to study the effects of limiting polyamines synthesis in cell culture and in experimental animals (Pegg, 1986; Grossie et al., 1987; Pöso and Pegg, 1982; Kogan and Hagedorn, 2000).

Inhibition of polyamine synthesis will help our understanding of the role of these ubiquitous molecules during insect growth processes. In the present study we observed ovarian size (length and width) in young females of *Anastrepha fraterculus* Wiedemann) (Diptera, Tephritidae) treated or not with the inhibitor  $\alpha$ -DFMO. *A. fraterculus* is one of about 195 species of the *Anastrepha* genus. This fly is distributed in the Continental America and it is considered one of the most important fruit culture pest.

## MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Animals

Infested fruits (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) were collected in the town of São Joaquim (SC-Brazil) and kept under laboratory conditions at 25°C ±1°C, L:D of 12:12 cycle, and 60-80RH. After adult eclosion, the F1 was distributed into plastic cages (19x13x13cm) and provided with food (brown sugar:soy bean flour:wheat flour 3:1:1) and water.

### 2.2. Chemicals

$\alpha$ -difluormethylornithine ( $\alpha$ -DMFO) was purchased from Sigma.

### 2.3. $\alpha$ -DMFO dose curve

Just after emergence, groups of 5 females were supplied with  $\alpha$ -DMFO in crescent concentrations ( 5 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM and 50 mM,) as drinking water solution placed in cotton square pieces, and other 5 female group (control) did not receive  $\alpha$ -DMFO. During 4 days the treatments were daily renewed. Then, in the fourth day, the ovaries were measured (length and width).

### 2.4. $\alpha$ -DMFO treatment

Just after emergence, a group of females was supplied with  $\alpha$ -DMFO (50mM) in the drinking solution, and other female group (control) did not receive  $\alpha$ -DMFO. During 4 days

the treatment was daily renewed. Then, in the fourth day, the ovaries were measured (length and width) .

Fifteen females treated and 15 females not treated with  $\alpha$ -DMFO were dissected in physiological Ephrussi solution and the ovaries measured (length and width) under a Leica microscope (x 5) coupled to a computer using a software called Somniun, an application for data processing developed in Interactive Data Language (IDL) by the Laboratory of Vegetable Anatomy at the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. IDL is a complete computing environment for the interactive analysis and visualization of data.

## **2.5 Statistical analysis.**

Effect of  $\alpha$ -DMFO treatment on young's *A. fraterculus* ovary measurements was analyzed by non-parametric Kruskal-Wallis statistical analysis and  $p < 0.05$ .

## Results

As can be seen in Fig. 1 the best concentration of  $\alpha$ -DMFO used was 50 mM. The other concentrations (5, 15 and 30 mM) didn't show difference in ovaries sizes (length and width) when compared to control not treated.

Fig.1 here

The concentration of 50 mM was then used to compare ovary size (length and width) of 15 females treated and 15 not treated with  $\alpha$ - DMFO. The ovary length of flies treated was  $0.0022 \pm 0.0002$  mm and those without  $\alpha$ - DMFO was  $0.003 \pm 0.0001$  mm. The ovary width of females treated was  $0.0013 \pm 0.0002$  mm and those without treatment was  $0.002 \pm 0.0001$  mm ( Fig. 2).

Fig. 2 here

## Discussion

Specific cellular changes that are needed for development, differentiation of cell type, and tissues reprogramming require polyamines. Moreover, massive RNA synthesis, necessary for embryogenesis, is blocked if ODC and polyamines are lacking (Frydman et al., 1992; Heby and Emanuelsson, 1981). Polyamines are important in embryonic development as evidenced on early sea urchin eggs (Kusunoki and Yamasu, 1978). Administration of  $\alpha$ -DMFO to neonate rats results in brain polyamine depletion, brain growth deficit together with a retardation of synaptic development (Slotkin et al., 1984). However, despite the increasing evidence of polyamines' importance for the cellular process, until now few studies have focused on the role of ODC and polyamines in insect development.

The ODC suicide inhibitor  $\alpha$ -DMFO has been used in studies of the roles of ODC and polyamines at the biochemical and physiological levels (Pegg, 1986; Bitonti et al, 1985). It was observed that it reduces the risk of cancer in animals. This inhibitor was also used as a plant fungicide and it showed protective role because it inhibits fungal pathogenic effects on plants (Rajam et al, 1985).

In the present study it was observed that in *A. fraterculus* young females ( $\pm 4$  days)  $\alpha$ -DMFO significantly inhibited the ovary development (length and width) when compared with females kept without  $\alpha$ -DMFO. In a previous study, we showed that *A. fraterculus* ODC activity in egg, young ovary and fat body were significantly higher than values recorded from other fly's tissues (Cardoso et al., 2004). This ODC activity pattern was suggested to have association with the process of oogenesis and vitellogenesis in the immature females

(Cardoso et al., 2004). The results in the present study corroborate the suggestion that ODC and polyamines are associated with sexual maturation in females of *A. fraterculus*.

Many studies correlate high levels of polyamines to the beginning of vitellogenin synthesis (Hagedorn and Kunkel (1979); Racioppi et al., 1986). Kogan and Hagedorn, (2000) suggested that ODC and polyamines are important for normal vitellogenesis in the mosquito *Aedes aegypti*. They observed that the inhibitor of ODC reduced significantly the number of mature oocytes. Cayre et al. (1996), using *Acheta domesticus* females observed that  $\alpha$ -DMFO treated ovarian development was similar to untreated control females. However some drug treated females, having reduced ovaries, were discarded and were not used in the course of the study. Moreover the treatment with the inhibitor altered the time between emergence and egg-laying behavior appearance.

Although it would be premature to hypothesize any causal link between sexual maturation and ODC activity, we suggest that it may be a good model for further study of the role of ODC and polyamines in the maturation of *A. fraterculus*.

## References

Besson MT, Delbecque J, Mathelin J, Boisson AM (1986) Epidermal polyamine levels related to cell cycle events during the metamorphosis of *Tenebrio molitor L.* (Insect, Coleoptera); effect of juvenoid application. *Comp Biochem Physiol* 83B: 589-593.

Birnbaum MJ and Gilbert LI (1990) Juvenile hormone stimulation of ornithine decarboxylase activity during vitellogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol* B160:145-151.

Birnbaum MJ, Whelan T (1988) Temporal alterations of ornithine decarboxylase activity in development of *Manduca sexta*. *Insect Biochem* 18: 853-859.

Bitonti AJ, Bacchi CJ, McCann PP, Sjoerdsma A (1985) Catalytic irreversible inhibition of *Trypanosoma brucei* ornithine decarboxylase (E.C.4.1.1.17) by substrate and product analogs and effects on murine trypanosomiasis. *Bioch Pharm* 34:1773-1778.

Bownes M (1982) Hormonal and genetic regulation of vitellogenin (yolk protein). *Quart Rev Bio* 57: 247-274.

Bownes M (1986) Expression of the genes coding for vitellogenin (yolk protein). *Ann Rev Entom* 31:507-531.

Cardoso VV, Prestes RP, Casali EA, Moreira JCF and Oliveira AK (2004) Ornithine decarboxylase activity during the development of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae). *Arch Insect Bioch Physiol* 57:151-159.

Cayre M; Strambi C; Charpin P; Augier R; Renucci M and Strambi A (1996) Inhibition of polyamine biosynthesis alters ovoposition behavior in female crickets. *Behavioral Neur.*

110(5): 1117-1125.

Frydman L, Rossomando PC, Frydman V, Fernandez CO, Frydman, B, Samejinma K (1992) Interactions between natural polyamine and tRNA : An N NMR analysis. Proc Nat Acad Scie USA 89: 9186-9190.

Grossie BVJr, Ota DM, Ajani JA, Nishihioka K (1987) Effect of intravenous  $\alpha$ -difluoromethylornithine on the polyamines levels of normal tissue and a transplantable fibrosarcoma. Cancer Res 47:1836-1840.

Hagedorn HH, O'Connor JD, Fuchs MS, Sage B, Schlaeger DA and Bohm MK (1975) The ovary as a source of  $\alpha$ -ecdysone in an adult mosquito. Proc Nat Acad Sci USA. 72: 3255-3259.

Hagedorn HH and Kunkel (1979) Vitellogenin and vitellin in insects. Annu Rev Entomol 24:475-505.

Heby O and Emanuelsson H (1981) Role of the polyamines in germ cell differentiation and in early embryonic development. Med Biol 59: 417-422.

Jowet T and Postlethwait JH (1980) The regulation of yolk polypeptide synthesis in *Drosophila* ovaries and fat body 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone analogue. Dev. Biol. 80:225-234.

Kogan HP, Hagedorn HH, (2000) Polyamines, and effects from reducing their synthesis during egg development in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. J Physiol 46: 1079-1095.

Kusunoki S and Yamasu I (1978) Inhibitory effect of  $\alpha$ -hydrazinoornithine on egg cleavage in sea urchin eggs. Dev Biol 67: 36-345.

Pegg AE (1986) Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J* 234: 249-262.

Pöso H and Pegg AE (1982) Effect of  $\alpha$ -difluoromethylornithine on polyamines and DNA synthesis by putrescine. *Biochem Biophys Acta* 696:179-186.

Postlethwait JH and Shirk PD (1981) Genetic and Endocrine Regulation of vitellogenesis in *Drosophila*. *Amer Zool*, 21:687-700.

Racioppi JV, Gemmill RM, Kogan PK, Calvo JM and Hagedorn HH (1986) Expression and regulation of vitellogenin messenger RNA in the *mosquito Aedes aegypti*. *Insect Biochem* 16: 255-262.

Rajam MV, Weinstein LH and Galston AW (1985) Prevention of a plant disease by specific inhibition of fungal polyamines biosynthesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 82: 6874-6878.

Slotkin, T. A., Johnson, A., Whitmore, W. L., Slepatis, R.J., 1984. Ornithine decarboxylase and polyamines in developing rat brain and heart: Effects of perinatal hypothyroidism, *Int J Dev Neuros* 2:155-161.

Tabor CW and Tabor H (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem.* 53: 749-790.

Wyatt GR, Rothaus D, Lawler and Herbst EJ (1973) Ornithine decarboxylase and polyamines in silkworm pupal tissues: effects of ecdysones and injury. *Biochim Biophys Acta* 304: 482-494.

## LEGENDS

Figure 1. Doses of the curve. Different concentrations (0 mM, 5 mM, 15 mM, 30mM and 50 mM) of  $\alpha$ -DMFO on the measurements (length and width) made in ovaries of *A. fraterculus* females (4 day old). Measurements were assessed as described in Materials and Methods  $\pm$ SE, n=5 different animals. Asterisk indicates statistical difference by non-parametric Kruskal-Wallis statistical analysis and  $p < 0.05$ .

Figure 2. Effect of  $\alpha$ -DMFO (50 mM) treatment on *A. fraterculus* young females (4 day old) ovaries measurements (length and width). Measurements were assessed as described in Materials and Methods  $\pm$ SE, n=15 different animals. Asterisk indicates statistical difference by non-parametric Kruskal-Wallis statistical analysis and  $p < 0.05$ .

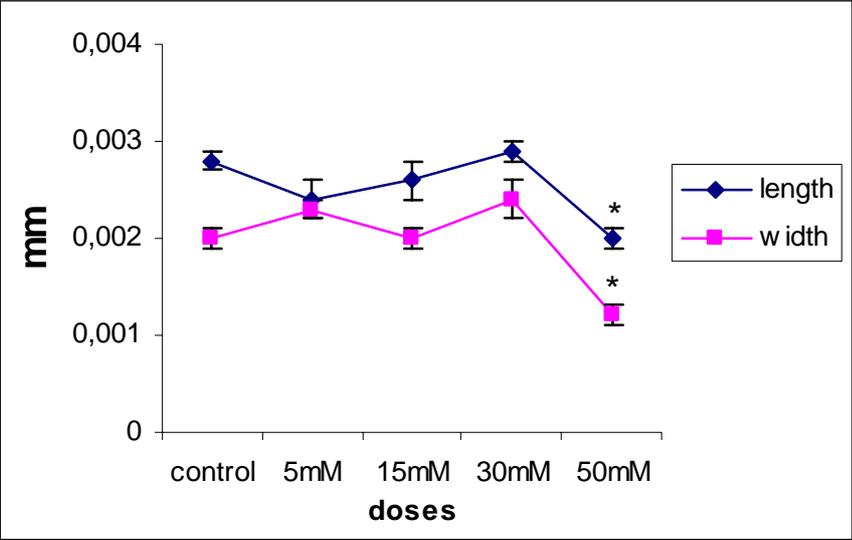


Figure 1

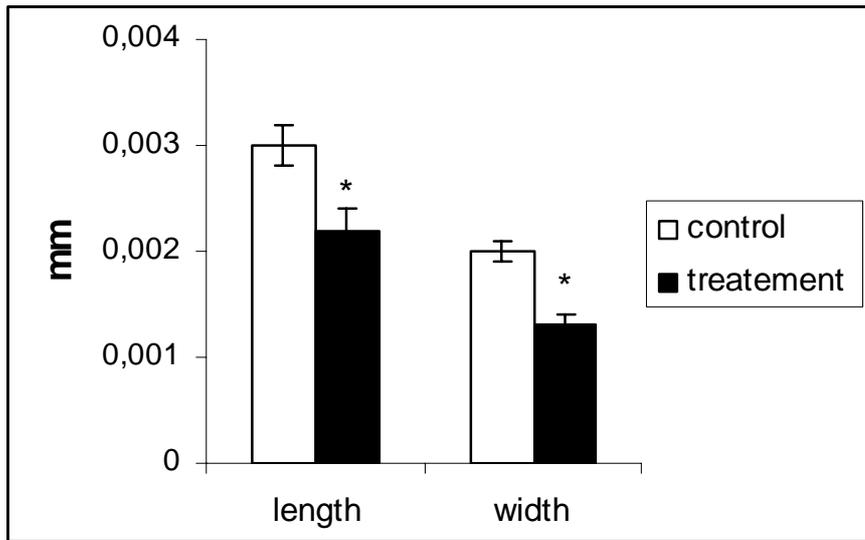


Figure 2

## Discussão

*A. fraterculus* tem uma grande importância para a fruticultura do eixo RS e SC, pois este díptero é uma das principais pestes nas regiões onde o cultivo da macieira está em rápida expansão não só para o consumo interno mas, também, para as exportações. O conhecimento das relações da enzima ODC com os estímulos hormonais e fatores ambientais em *A. fraterculus* pode fornecer dados importantes para os estudos de comportamento e, também, do controle biológico destes insetos. A noção de que o ambiente é capaz de alterar o metabolismo dos insetos em uma determinada época do ano, associada ao conhecimento prévio das condições de temperatura, por exemplo, anteriores ao aumento populacional das moscas (que se dá a partir do mês de setembro na região sul do Brasil) podem ajudar na escolha da melhor estratégia de defesa para as culturas atacadas pela peste. Além disso, estudos voltados ao conhecimento da fisiologia e bioquímica dos insetos abrem vias para encontrar metodologias capazes de interferir nos processos vitais desses insetos.

Cientes disso, a presente tese de doutoramento teve como primeiro objetivo a avaliação da atividade enzimática e dos parâmetros cinéticos da ODC durante o ciclo de vida da *A. fraterculus*. A ODC é uma enzima muito importante no crescimento e desenvolvimento tissular; ela é o passo limitante na biossíntese das poliaminas (putrescina, espermidina, e espermina), cátions orgânicos multifuncionais para um grande número de funções celulares.

Os parâmetros cinéticos ( $K_m$  app e  $V_{max}$ ) da ODC foram calculados por regressão linear utilizando o modelo matemático de Lineweaver-Burk em três estágios de desenvolvimento da *A. fraterculus*: larva, pupa e ovários de fêmeas jovens. Os valores dos parâmetros cinéticos da

ODC em *A. fraterculus*, foram de grande valia para o andamento dos demais experimentos, pois possibilitaram o conhecimento das características bioquímicas da enzima no organismo em estudo, o que permitiu desenvolver de maneira correta a metodologia para o estudo da atividade enzimática. Adicionalmente, as características cinéticas foram de suma importância do ponto de vista entomológico, já que dados bioquímicos e fisiológicos da ODC em insetos são ainda incipientes, existindo poucos estudos em *D. melanogaster*, *Manduca sexta* e *Hyalophora cecropia*, entre outros.

Os valores do  $K_m$  app encontrados para pupa de *A. fraterculus* foram muito similares aos encontrados nos insetos supracitados e também para os tecidos de mamíferos. No entanto, os valores de  $K_m$  app e  $V_{max}$  para os homogenados tissulares de larva e de ovário de fêmea jovem apresentaram uma grande variação, sofrendo um aumento de duas a oito vezes, respectivamente, quando comparados com os valores obtidos para pupa.

Isso indica que a atividade da ODC apresenta flutuações durante o ciclo de vida de *A. fraterculus* e essas mudanças na cinética da enzima sugerem que ela esteja sofrendo modificações pós-traducionais. Como citado anteriormente, esta enzima é intrinsecamente regulada *in vivo* e tem sido estudada a possibilidade de, além da regulação pós-traducional, ocorrer uma regulação da expressão do gene e/ou também regulação pelas próprias poliaminas (Tabor e Tabor, 1984; Kahana e Nathans, 1985). Em mamíferos, as modificações pós-traducionais e seus efeitos alostéricos foram inicialmente investigados em papiloma epidermal (O'Brien *et al.*, 1986), sendo demonstrado que existe um efeito de ativação pela GTP e este mesmo mecanismo foi também verificado ser importante em condições fisiológicas normais nos tecidos de mamíferos (O'Brien *et al.*, 1986; O'Brien *et al.*, 1987).

Para testar a possibilidade de estar ocorrendo uma regulação da atividade pós-traducional via GTP em nossos experimentos, primeiramente foi realizada uma curva de substrato na presença de várias doses de GTP (0,1 mM-10 mM) em homogenados de pupa e de ovários de fêmeas jovens para saber qual a concentração ótima de uso do GTP. A concentração mais efetiva obtida para ambos os homogenados foi de 0,1 mM, valor muito similar ao encontrado para mamíferos. Após esta etapa, homogenados de ovários de fêmeas jovens e de pupa foram ambos incubados na presença ou ausência de GTP. A presença de GTP aumentou a atividade específica da ODC em ambos os homogenados testados, mas o aumento foi estatisticamente significativo somente em pupa.

Esse resultado pode sugerir que, nos ovários jovens, a atividade da ODC já seja máxima e que a adição do GTP não tem um efeito significativo para incrementar a sua atividade. No entanto, em pupa, a adição de GTP mostrou ter um grande efeito quando comparada com o seu controle (homogenado de pupa sem adição de GTP).

Vários estudos em mamíferos demonstram que a ativação da ODC pode ser tecido-específica e que os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  podem ser alterados inclusive em diferentes regiões do cérebro, por exemplo. No cérebro de ratos, a habilidade do GTP ativar a ODC é forte em cerebelo e muito fraca em hipocampo (Kilpelainen e Heitala, 1994). Assim, as grandes diferenças ontogenéticas que existem entre os ovários de fêmeas jovens e pupas podem ser responsáveis pelos resultados observados no nosso trabalho.

As possibilidades de ação do GTP na ativação da ODC ainda não são totalmente entendidas mas, a princípio, o GTP poderia ligar-se diretamente na enzima afetando as suas funções catalíticas, ou o GTP poderia ativar uma proteína ligada ao GTP que, por sua vez, mediará a ativação da ODC ou, ainda, o próprio GTP poderia ser um substrato para uma

proteína quinase que fosforilaria a ODC. Essa última alternativa parece ser a mais realista. As proteínas quinases que usam GTP como substrato não necessitariam fosforilar a ODC diretamente, podendo estar envolvidas cascatas de sinalização que fosforilariam a ODC.

Entretanto, a alternativa na qual o GTP ativaria primeiramente uma proteína regulatória ligada a ele também é plausível. Esta proteína poderia regular a ODC diretamente ou ativar um sinal que conduzisse à fosforilação da ODC (Kilpelainen, 2002). Como se vê, tais alternativas precisariam ser testadas mas fugiriam do escopo de nosso trabalho.

Estes resultados do efeito ativador do GTP sobre a enzima ODC são de grande relevância pois, até então, nenhum outro dado foi publicado com relação aos efeitos do GTP na cinética da ODC em insetos em geral e especialmente em *A. fraterculus*.

Os estudos em ODC durante a ontogenia da *A. fraterculus* mostraram atividade enzimática em ovo (estágio embrionário) e quando esse estágio foi comparado com os outros estágios anteriores à eclosão do adulto (larval e pupal), verificou-se um aumento na atividade enzimática altamente significativo. O estágio embrionário tem sido relatado como um período de alta atividade da ODC em muitas espécies (Heby, 1981) e está cada vez mais claro que as mudanças específicas necessárias para o desenvolvimento, diferenciação celular e reprogramação tissular requerem poliaminas. A síntese massiva de RNA, necessária para o normal andamento destes processos durante a embriogênese, pode ser bloqueada se ocorrerem perdas nos níveis celulares de poliaminas (Heby e Emanuelsson, 1981).

Em *Drosophila*, os níveis de espermidina são elevados logo após a fertilização e declinam após algumas horas (Herbst e Dion, 1970) e não se sabe se as poliaminas são sintetizadas rapidamente após a fertilização ou se são produtos da síntese materna. Em *Calliphora erythrocephala*, a espermidina é sintetizada rapidamente justamente depois da

fertilização e acredita-se que tenha uma função na rápida síntese de macromoléculas que irá ocorrer neste estágio (Lundquist *et al.*, 1983).

Lillerberg *et al.* (1991) observaram os níveis de regulação do gene da ODC durante o desenvolvimento da *Musca domestica*, verificando que a atividade enzimática da ODC é somente detectada durante os últimos estágios da embriogênese e que a atividade máxima ocorre na ovoposição, mas é rapidamente reduzida na emergência larval.

Sparks *et al.* (1991) trabalhando também com *M. domestica*, observaram que após a ovoposição há um decréscimo da atividade da ODC e que os estágios iniciais da embriogênese são marcados por níveis muito baixos de atividade da ODC. Entretanto, níveis maiores são detectados nove horas após a ovoposição.

Em nosso estudo, utilizamos ovos em adiantados estágios de desenvolvimento (entre o 10° e 11° estágio) aproximadamente 24 horas depois da ovoposição, e este estágio é caracterizado por grandes alterações morfogênicas como o aparecimento dos sulcos intersegmentais na epiderme, a ocorrência de protuberâncias da mandíbula, maxila e lábio e o primórdio do intestino médio posterior, e também o surgimento de um claro espaço entre o embrião e o envelope vitelínico, sinalizando o encurtamento ou retração da banda germinativa (Nascimento e Oliveira, 1996; Selivon *et al.*, 1997). Face a isto, acreditamos que a alta atividade da ODC neste estágio esteja relacionada com esses importantes eventos morfogênicos e especialmente ao grande número de divisões celulares que ocorrem e que requerem poliaminas e, por consequência, da ativação da ODC.

Em larva de *M. domestica*, foi observado que a atividade da ODC foi significativamente baixa em relação à atividade nos embriões (Sparks *et al.*, 1991) o que corrobora nossos

resultados. O crescimento larval dos dípteros é caracterizado principalmente pelo aumento do tamanho das células, e não pelo aumento de seu número. Essa baixa taxa de divisão celular poderia estar contribuindo significativamente para o baixo nível de atividade da ODC no estágio larval. Da mesma forma, o pequeno aumento da atividade da ODC, demonstrado em nossas pupas, pode estar refletindo as necessidades dos processos biológicos desta fase denominada fanerocefálica, que é determinada pela evaginação da cabeça e dos discos imaginais que sofrem intensa divisão celular e diferenciação.

No estágio adulto, os ovários jovens, quando comparados com ovários maduros, apresentaram uma maior atividade da ODC. Este aumento pode estar refletindo os eventos de maturação pelos quais uma fêmea jovem passa. Processos ligados à oogênese têm sido associados com o aumento progressivo da atividade da ODC e do conteúdo de poliaminas em insetos (Birnbaum e Gilbert, 1990; Kogan e Hagedorn, 2000).

Conforme Bressan (1996) a *A. obliqua* emerge para a vida adulta imatura sexualmente e os ovários, no caso das fêmeas, completam sua maturação somente a partir do 15º dia depois da emergência; uma gama de alterações morfogenéticas iniciam-se a partir do 3º dia e a vitelogênese inicia pelo 4º dia. A expressiva atividade da ODC nas fêmeas jovens, em comparação com os ovários de fêmeas maduras, pode então estar refletindo este estado fisiológico relacionado ao processo de oogênese neste díptero.

Birnbaum e Gilbert (1990) sugerem uma intrínseca relação temporal entre a síntese vitelogênica e a atividade da ODC em *Drosophila*. Ao eclodir, o adulto apresenta uma baixa taxa de síntese de vitelogenina (Bownes e Hames, 1978; Jowet e Postlethwait, 1980) que aumenta substancialmente nos primeiros dias de vida adulta. Isto se reflete nos níveis de

vitelogenina que estão na hemolinfa durante este período (Wu e Ma, 1986). Um padrão similar na atividade da ODC é detectado neste mesmo período (Birnbaum e Gilbert, 1990). Somando-se a isto, não se observa este mesmo pico de elevação da atividade da ODC neste período da vida nos machos adultos, o que faz os autores novamente relacionarem a atividade da ODC com a vitelogênese neste díptero.

Outro resultado em nosso trabalho foi o da alta atividade da ODC em corpo gorduroso de fêmeas jovens. Em *Drosophila*, Birnbaum e Gilbert (1990) sugerem que o corpo gorduroso é responsável pelo dramático aumento da atividade da ODC na mosca, aumento que ocorre durante o período da vitelogênese. As vitelogeninas são lipoglicoproteínas geralmente sintetizadas no corpo gorduroso da maioria dos insetos e são os maiores constituintes dos ovos ovopositados e dos oócitos maduros (Bownes, 1986).

Em *Drosophila*, esta proteína tem dupla origem, uma no corpo gorduroso e outra nos ovários. Em *Anastrepha suspensa*, Handler (1997) discorda da dupla origem, sugerindo que a síntese de vitelogenina seja feita unicamente nos ovários. Este autor também não observou elevação da síntese de vitelogenina durante o uso de HJ, e que esta perda da regulação seja devido à síntese única das vitelogeninas pelos folículos ovarianos.

Entretanto, como ele próprio sugere (Handler, 1997) os efeitos hormonais sobre a síntese de vitelogeninas dependem de sua concentração específica, do período de desenvolvimento usado e/ou nutrição do organismo. Em seus estudos, ele usou fêmeas de 2,5 dias, período um pouco prematuro para o estudo da vitelogênese que normalmente se inicia pelo 4º dia (Bressan, 1996). Os resultados negativos tanto para a ativação das vitelogeninas pelo HJ quanto para a síntese de vitelogenina no corpo gorduroso, obtidos por Handler (1997) talvez fossem outros se ele tivesse usado fêmeas com aproximadamente quatro dias.

O tecido gorduroso parece ter um papel importante na maturação sexual e na síntese das vitelogeninas. Em *A. obliqua*, a partir do 7º dia, esse tecido que era abundante desaparece quase que por completo (Bressan, 1996). Em *A. fraterculus*, nós também observamos este padrão temporal de redução do corpo gorduroso (dados não publicados).

Em *Drosophila*, o HJ secretado pelo *corpora allata*, depois da eclosão do adulto age em algumas vias para iniciar a síntese da vitelogenina tanto no corpo gorduroso quanto nos ovários, bem como pode agir na captação da vitelogenina pela hemolinfa (Postlethwait e Shirk, 1981). Vários estudos também relacionam a atividade de hormônios com uma rápida indução da ODC acompanhando a maturação sexual e a vitelogênese (Birnbaum e Gilbert, 1990).

Considerando essas relações, procuramos então avaliar o efeito do HJ sobre a atividade da ODC no início do período de maturação sexual e da oogênese da *A. fraterculus* ( $\pm 4$  dias) e verificar também o efeito da associação dos estresses de temperatura (tão marcantes na região de pomicultura) com o HJ na atividade da ODC. O HJ demonstrou ação estimulatória na atividade da ODC em fêmeas de *A. fraterculus* no início da maturação sexual ( $\pm 4$  dias). Este comportamento estimulatório foi observado em três dos quatro tempos de incubação testados (3, 7 e 18 horas). Este resultado corrobora a vasta bibliografia que demonstra que o HJ tem uma ação efetiva sobre a atividade da ODC.

No presente estudo, o estresse de temperatura (6°C e 20/6°C) resultou no aumento da atividade da ODC quando fêmeas mantidas no estresse foram comparadas a fêmeas na temperatura controle (25°C).

Em trabalho anterior, Cardoso *et al.* (2002) observaram que as temperaturas de 6°C e 20/6°C causaram o retardo da maturação dos ovários, sendo sugerido que este seria um mecanismo biológico que o inseto lançaria mão para se manter na região macieira nos períodos de outono e inverno.

Mamíferos e insetos foram investigados em relação aos procedimentos que podem causar injúria e aumento da atividade da ODC. Este aumento da atividade das enzimas chaves de síntese das poliaminas como a ODC e do nível de poliaminas são demonstrados como resposta a uma variedade de estresses ambientais, como a dieta, a temperatura, a salinidade, disponibilidades de recursos, etc (Wyatt *et al.* 1973; Davalli *et al.*, 1990; Notari *et al.*, 2004).

Segundo Wyatt *et al.* (1973), os níveis da atividade da ODC aumentariam com certos estresses, fenômeno chamado por ele de “síndrome de dano”. Seus estudos demonstraram que a transferência de culturas de tecidos do meio natural de hemolinfa para meios sintéticos e também procedimentos estressantes como infusões hipertônicas ou injeções no integumento podem acarretar um choque, causando injúrias que favoreceriam o aumento da atividade de ODC. A temperatura de 6°C, evidenciada em Cardoso *et al.* (2002) como uma temperatura de alto estresse, causadora de várias conseqüências para a biologia da espécie *A. fraterculus*, estaria então influenciando a atividade da ODC, elevando seu conteúdo celular.

Essa elevação dos níveis de atividade da ODC pode também estar ligada a uma alternativa que recentemente tem sido discutida sobre o efeito protetor das poliaminas ao estresse e insultos aos tecidos (Davalli *et al.*, 1990; Notari *et al.*, 2004). Portanto, o aumento da atividade da ODC é sugerido aqui, como resposta da *A. fraterculus* às flutuações de temperatura que ocorrem no sul do Brasil na região de cultivo das macieiras.

Outro resultado interessante foi a efetiva estimulação do HJ quando este foi associado às temperaturas de estresse. Em *Helicoverpa armigera*, Zhou *et al.* (2000) observaram que os níveis de HJ são reduzidos após longos períodos de estresse ambiental. Unindo estas duas observações a do poder estimulatório do HJ na atividade da ODC e a redução do HJ após os estresses ambientais, podemos sugerir que fêmeas mantidas a temperaturas de estresse podem ter seus níveis de HJ reduzidos e quando ocorre aplicação tópica deste hormônio, nos abdomens das fêmeas, este passa a estimular a atividade da ODC. No entanto, apesar das duas condições de temperaturas testadas estimularem a atividade da ODC, os tempos de incubação que produziram significativo aumento foram diferentes entre as duas condições.

A resposta ao estímulo do HJ ocorreu a partir das 3 horas para a condição alternada, mas para a temperatura constante de 6°C o aumento da atividade foi significativo já a partir da primeira hora. Essa diferença nos tempos de estimulação pode ser interpretada como uma consequência da ação severa da temperatura baixa de 6°C sobre a fisiologia do inseto que então, necessitaria de uma resposta mais rápida aos efeitos do estresse, e que estes efeitos podem estar sendo minimizados nas temperaturas alternadas.

A temperatura de 6°C já foi anteriormente caracterizada por nós como sendo uma temperatura de grande estresse, pois nela as fêmeas mostraram menor desenvolvimento ovariano e longevidade e as que combinam uma temperatura baixa e alta, minimizam os efeitos das temperaturas extremas e constantemente baixas como se o animal estivesse se aclimatando lentamente ao estresse de temperatura.

Em 1983, Meats avaliou a aclimação ao frio em *Dacus tryoni* durante dois estágios da vida farata adulta e fase pupal. Utilizando regimes constantes e alternados, aclimatou-os à temperatura de 25°C, transferindo-os em diferentes tempos para regimes constantes e alternados

de temperatura e, logo após, submetendo-os à temperatura de congelamento (-4°C). Demonstrou, assim, que os danos das temperaturas baixas podem ser reduzidos quando os organismos são submetidos a breves períodos de temperaturas menos severas ou alternadas. Meats (1987) sugere que os organismos apresentam uma tolerância termal após utilizar uma variedade de combinações de taxas de congelamento e calor.

Tendo em vista os dados acima, podemos sugerir que o rápido estímulo do HJ na atividade da ODC em 1 hora a 6°C pode estar refletindo as necessidades fisiológicas pelas quais a mosca passa com a ação severa da temperatura contínua de 6°C; estas necessidades podem estar ligadas ao aumento da ODC e o conseqüente rápido aumento das poliaminas, com ação protetora a determinados fenômenos de injúria.

O efeito protetor das poliaminas tem sido estudado em uma variedade de espécies e, em mamíferos é sugerido que a acetilação das poliaminas é uma adaptação ao estresse. Em *E. coli* a acumulação de espermidina resulta no aumento de síntese das proteínas de choque térmico a baixa temperatura (Kornvika e Jones, 2000).

A tolerância ao frio está ligada diretamente a respostas do metabolismo no organismo. Uma das respostas dos insetos às baixas temperaturas é a conversão das reservas de glicogênio para um grande pool de poliois crioprotetores como, por exemplo, as proteínas “antifreeze” (Holden e Storey, 1994). Exposição à baixa temperatura num intervalo entre 0°C a 5°C, comuns a muitos ambientes, pode desencadear a síntese de proteínas crioprotetoras (Lee, 1991).

O aumento na atividade da ODC a 6°C talvez possa ser parte de um programa de proteção bioquímica e adaptação dos insetos.

Após conhecermos a atividade da ODC em fêmeas mantidas em estresses de temperatura,

nosso interesse voltou-se para os machos, submetendo-os logo após a sua eclosão, por 15 dias, à baixa temperatura de 6°C.

Conforme descrito na literatura, o desenvolvimento testicular em *Anastrepha ssp.* é do tipo não progressivo (Bressan 1995) e segundo a literatura, sabe-se que a maturidade dos machos está relacionada com o desenvolvimento do apódema ejaculatório.

Drew (1968) conclui que o apódema é obrigado a alcançar um tamanho ótimo para suportar a musculatura para a copulação. A contração do músculo na parede da cavidade da placa basal fecha a entrada do ducto ejaculatório, reduzindo o volume da cavidade, e o resultado disto é que o fluido seminal é forçado para baixo do ducto, para a ponta do edeago. A maturidade sexual está, então, relacionada com o tamanho do apódema e, dentro das condições de variação de temperatura e intensidade de luz, a maturação do macho de *Strumeta triony* não se dá em 24 dias, como na temperatura estável de 25°C, pois as medidas do apódema variam grandemente.

Em nosso trabalho, foram realizadas medidas no apódema ejaculatório, que é indicado como mensurador da potência e da maturidade sexual dos machos. Os machos mantidos à baixa temperatura obtiveram uma significativa redução no comprimento e largura de seu apódema ejaculatório, quando comparados com os dos machos mantidos à temperatura controle de 25°C.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos para machos de *D. triony* que no período de baixas temperaturas (inverno) são citados como não ativos sexualmente, sendo a longevidade similarmente baixa como a das fêmeas, demonstrando a influência das temperaturas baixas no comportamento reprodutivo dos machos (Fletcher, 1979).

No entanto, a atividade enzimática da ODC nos machos de *A. fraterculus* (submetidos a 6°C) não apresentou diferença significativa com a do controle. Este comportamento da atividade

da ODC não ser influenciada pelo estresse de temperatura em machos, nos sugere que nos machos o padrão de estimulação da atividade enzimática é diferente das fêmeas, provavelmente porque nos machos não estão envolvidos processos ligados a oogênese.

Birnbaum e Gilbert (1990) observaram em *Drosophila* um alto pico da atividade da ODC 24 horas após a eclosão das fêmeas, mas este padrão não foi observado no mesmo período da vida dos machos adultos, o que fez os autores relacionarem a atividade da ODC com a vitelogênese em *Drosophila*.

Depois de constatarmos uma relação entre um alto pico da atividade da ODC e o início da maturidade sexual da fêmea de *A. fraterculus*, restou-nos inibir essa atividade com  $\alpha$ -DMFO (inibidor da ODC) para verificarmos o desenvolvimento ovariano (comprimento e largura) de fêmeas jovens de *A. fraterculus*.

Foi possível observar que fêmeas no início da maturidade, tratadas com o  $\alpha$ -DMFO apresentam medidas (comprimento e largura) dos ovários significativamente reduzidas, o que denota uma imaturidade no desenvolvimento em relação às fêmeas mantidas sem o inibidor da ODC. Estes resultados enquadram-se perfeitamente com outros dados da bibliografia que associavam a vitelogênese com atividade da ODC, e também com os dados do capítulo II desta tese, que demonstram que os ovários teriam uma grande atividade da ODC devido as necessidades ligadas aos processos de oogênese e vitelogênese.

Assim, podemos concluir que a atividade da ODC pode estar conectada com os processos de maturação sexual (oogênese) em fêmeas jovens em *A. fraterculus*.

Quanto à expressão do gene da ornitina decarboxilase durante a ontogenia da *A. fraterculus* foram adotadas as seguintes metodologias.: utilizando-se dados disponíveis no

GeneBank, inicialmente construímos um par de oligonucleotídeos baseado nas seqüências de nucleotídios da *Drosophila melanogaster* (genes dODC1 e dODC2; Rom e Kahana, 1993) de números de acesso X66601 e X66600, respectivamente).

A extração do RNA foi realizada com Trizol<sup>TM</sup> conforme protocolo da Invitrogen. Para remover a contaminação com DNA tratou-se com DNase. Logo após foi sintetizado o cDNA e este foi submetido à reação de amplificação, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase, o RT-PCR, com o objetivo de efetuar a amplificação específica do gene da ODC em *A. fraterculus*. Apesar de termos feito várias tentativas (modificando as condições da reação de RT-PCR) não foi possível amplificar esse oligonucleotídeo em *A. fraterculus* (vide anexo).

Tentamos então alinhar as seqüências nucleotídicas do gene da ODC em *D. melanogaster* (genes dODC1 e dODC2, Rom e Kahana, 1993) e em *M. domestica* (número de acesso no GeneBank F411043) (Santoso e Sparks, 1996). A partir deste alinhamento foi possível identificar as regiões mais conservadas destas seqüências e foi então construído outro par de oligonucleotídeos. Depois desta primeira tentativa infrutífera foi construído outro par de oligonucleotídeo de outra região conservada das seqüências entre *D. melanogaster* e *M. domestica*. Todos os conjuntos de oligonucleotídeos sintetizados desta tentativa não amplificaram a ODC em *A. fraterculus*, o que nos fez concluir que as duas espécies (*D. melanogaster* e *M. domestica*) utilizadas para a construção das seqüências de oligonucleotídeos, apresentam um nível de divergência grande entre elas e a *A. fraterculus* para a seqüência do gene da ODC.

Para tentar contornar os problemas citados acima, oligonucleotídeos degenerados foram desenhados a partir do alinhamento do gene da ODC de diferentes espécies usando regiões

conservadas. Entre essas diferentes espécies estavam o *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Musca domestica*, *D. melanogaster*, *Bos taurus* e *Plasmodium falciparum* (Genebank números de acesso P00860, P11926, AAL06466, CAA47166, AAA79849, AAF14518, respectivamente). Também estes conjuntos de oligonucleotídeos não amplificaram a seqüência do gene da ODC em *A. fraterculus*. Outra tentativa foi realizada utilizando outras regiões conservadas entre as várias espécies, mas também foram infrutíferas.

Por último, por sugestão do Dr. Rom do Departamento de Genética Molecular e Virologia do Instituto Weizmann de Ciência, Rehovot, Israel, tentamos amplificar o gene da ODC em *A. fraterculus*, usando uma seqüência degenerada construída com base na seqüência de camundongos. Esta tentativa também obteve resultados negativos, amplificando outros genes que não o gene ODC.

A partir desse conjunto de resultados negativos, podemos concluir que o gene da ODC, mesmo tendo regiões conservadas para uma variedade de espécies, apresenta provavelmente uma conservação em nível de aminoácidos, mas em nível de nucleotídios essa homologia é reduzida pelo menos com relação a *A. fraterculus*. Esta baixa homologia já tinha sido descrita entre tripanossomo e a levedura quando comparada com camundongo (Rom e Kahana, 1993).

Quando observamos os escores de alinhamento entre algumas espécies podemos notar que mesmo sendo um gene conservado entre as espécies, quando analisamos a homologia dos nucleotídios, essa seqüência tem uma certa divergência entre as espécies, como exemplo temos:

Entre *D. melanogaster* e *M. musculus* é de 47.1 %

Entre *D. melanogaster* e *C. elegans* é de 41%

Entre *H.sapiens* e *C. elegans* é de 43%.

Quando comparamos a seqüência de nucleotídios entre *D. melanogaster* e *M. domestica* foi encontrada uma homologia de 40%, o que nos impossibilitou resultados positivos quando tentamos utilizar outra metodologia (Southern blot) usando a seqüência destes dois dípteros como sonda.

As dificuldades enfrentadas em nosso trabalho foram também encontradas por outros pesquisadores que tiveram como objetivo encontrar marcadores nucleares no grupo *fraterculus*. O alinhamento das seqüência dos genes *sxl*, *dsx*, e *fru* de *Drosophila* e do tefritídeo *Bactrocera tryioni*, e construção de oligonucleotídeos e tentativas de amplificação no grupo *fraterculus* mostraram que as seqüências eram grandemente divergentes indicando uma potencial alta taxa evolutiva entre essas espécies (Brito *et al*, 2004).

## Perspectivas futuras

No presente trabalho foi realizada uma análise dos parâmetros cinéticos da ODC e da flutuação da atividade desta enzima na ontogenia de *A. fraterculus*. Analisamos também os efeitos do estresse de temperatura, do estímulo do HJ e da associação do estresse de temperatura com o estímulo do HJ sobre a atividade da ODC. A análise do efeito isolado destas variáveis bem como da associação das mesmas sobre a atividade desta importante enzima em *A. fraterculus* constitui-se numa etapa inicial fundamental para o desenvolvimento de metodologias que visem um controle populacional mais efetivo e mais ecológico deste importante inseto-praga. Uma perspectiva de continuação do presente trabalho seria o delineamento de experimentos que utilizassem os resultados obtidos para a proposição de estratégias de controle.

Um outro aspecto importante que foi abordado no presente trabalho, mas que infelizmente não resultou em dados positivos, foi a obtenção de oligonucleotídeos para a análise do gene da ODC em *A. fraterculus*. Sendo a ODC uma enzima tão fundamental para a síntese de poliaminas esperar-se-ia uma conservação muito grande com relação aos oligonucleotídeos obtidos com os diferentes organismos testados. A conservação realmente ocorre só em nível de aminoácidos? A resposta a esta pergunta poderia ser obtida com uma análise mais aprofundada e que se coloca como uma perspectiva de continuação do presente trabalho.

Apesar de já possuímos um conjunto de oligonucleotídeos sintetizados a partir de seqüências específicas de vitelogeninas (com homologia com *A. suspensa*) não foi possível

analisar a expressão destas vitelogeninas em fêmeas jovens mantidas com o inibidor da ODC ( $\alpha$ -DMFO). Os resultados desta análise que poderia ser feita através de RT-PCR em tempo real corroborariam a sugestão da importância da ODC na síntese de vitelogeninas em *A. fraterculus*.

Finalmente, uma outra perspectiva que poderia ser analisada é quanto ao modo de ação do GTP sobre a atividade da ODC. Mediante metodologia adequada, que por si só poderia se constituir em outra tese, poder-se-ia verificar as 3 hipóteses sobre o mecanismo de regulação da ODC via GTP: (1) ligação direta do GTP à ODC afetando suas funções catalíticas; (2) GTP ativando uma proteína ligada ao GTP que por sua vez mediará a ativação da ODC; (3) GTP funcionando como substrato para uma proteína quinase que fosforilaria a ODC .

## Bibliografia

Abrahamsen MS, Li, RS, Dietrich-Goetz, W and Morris, DR (1992). Multiple DNA elements responsible for transcriptional regulation of the ornithine decarboxylase gene by protein kinase A. *J Biol Chem* 267(26): 18866-18873.

Aguiar-Menezes EL, Cassino PCR, Menezes EB, Bittar AC, Silva PS and Souza M (1998) Percentagens de parasitismo de *Anastrepha* spp por parasitóides OPIINAE em diferentes plantas hospedeiras no campus da UFRJ e bairros adjacentes. In Anais do XVII Congresso Brasileiro de Entomologia, Rio de Janeiro.

Almud JJ, Oliveira MA, Kern AD, Grishin NV, Phillips MA and Hackert, ML (2000) Crystal structure of human ornithine decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding. *J Mol Biol* 295(1):7-16.

Aluja M (1994) Bionomic and management of *Anastrepha*. *Ann Rev Entomol* 39:155.

Aluja M (1996) Future Trends in Fruit Fly Management. In *Fruit Flies Pest-Mc Pheron* and Steck, (eds), Florida, 563 pp.

Atmar VJ and Kuehn GD (1983) Polyamine-Dependent Protein Kinase and Phosphorylation of Ornithine Decarboxylase in *Physarum polycephalum*. *Methods Enzymol* 99: 366-372.

Bale JS (1991) Implications of cold hardiness for pest management. In *Insects at low temperature*. Chapman and Hall (eds), New York and London, 573 pp.

Bateman MA (1972) The ecology of fruit flies. *Ann Rev Entomol* 17: 493-511.

Bello-Fernandez C, Packham G and Cleveland JL (1993). The ornithine decarboxylase

gene is a transcriptional target of c-Myc. Proc Nat Acad Sci U S A 90(16): 7804-7808.

Besson MT, Delbecque J, Mathelin J and Boisson AM (1986) Epidermal polyamine levels related to cell cycle events during the metamorphosis of *Tenebrio molitor* L. (Insect, Coleoptera); effect of juvenoid application. Comp Biochem Physiol 83B: 589-593.

Birch LC (1948) The intrinsic rate of natural increased of an insect population. J Animal Ecol 173: 15-16.

Birnbaum MJ and Gilbert LI (1990) Juvenile hormone stimulation of ornithine decarboxylase activity during vitellogenesis in *Drosophila melanogaster*. J Comp Physiol B160:145-151.

Birnbaum MJ and Whelan T (1988) Temporal alterations of ornithine decarboxylase activity in development of *Manduca sexta*. Insect Biochem 18: 853-859.

Bitonti AJ, Bacchi CJ, McCann PP, Sjoerdsma A (1985) Catalytic irreversible inhibition of *Trypanosoma brucei* ornithine decarboxylase (E.C.4.1.1.17) by substrate and product analogs and effects on murine trypanosomiasis. Bioch Pharm 34:1773-1778.

Bleicher J (1982) A mosca-das-frutas em macieira e pessegueiro. Florianópolis, SC EMPASC, Boletim Técnico, 19: 28 pp.

Bownes M (1982) Hormonal and genetic regulation of vitellogenin (yolk protein). Quart Rev Bio 57: 247-274.

Bownes M (1986) Expression of the genes coding for vitellogenin (yolk protein). Ann Rev Entom 31:507-531.

Bownes M and Hames BD (1978) Analysis of yolk proteins of *Drosophila melanogaster*. FEBS Letters 96: 327-330.

Bressan S (1995) Desenvolvimento e potencial reprodutivo do macho de *Anastrepha ssp.* (Diptera: Tephritidae) em condições naturais. Rev Brasil Entom 39(4):849-854.

Bressan S (1996) Desenvolvimento e potencial reprodutivo de fêmeas de *Anastrepha obliqua* (Diptera Tephritidae) em condições naturais. Rev Brasil Entom 40(1):11-16.

Bressan S and Teles MC (1991) Ovogênese em *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1935) (Diptera, Tephritidae). Rev Brasil Entom 35: 691- 696.

Brito RA, Sobrinho J, Silva I and Scliar M (2004) Marcadores nucleares no estudo da mosca-das-frutas do grupo fraterculus. In 50º Congresso Nacional de Genética, Florianópolis, SC.

Brune B, Hartzell P, Nicotera P and Orrenius S (1991) Spermine prevents endonucleases activation and apoptosis in thymocytes. Exp Cell Physiol 179:323-329.

Byus CV and Herbst EJ (1976) Decarboxylases for polyamines biosynthesis in *Drosophila melanogaster* larvae. Biochem J 154: 31-33.

Canal Dazo N, Kovalski A and Zucchi, RA (1993) Levantamento de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em pomares de maçãs em Vacaria, RS. In Anais 14º Congresso Brasileiro de Entomologia, Piracicaba, São Paulo, 24.

Canal NA and Zucchi RA (2000) Parasitóides-Braconidea. Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. In Conhecimento Básico e Aplicado. Malavasi A e Zucchi RA. (eds) Holos editora, Ribeirão Preto, 327 pp.

Cardoso VV, Ferreira MP, Montagner JM, Fernandez CG, Moreira JC and Oliveira AK (2002) The effects of constant and alternating temperatures on reproductive potential, life

span, and life expectancy of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann)(Diptera: Tephritidae). Braz J Biol 62(4): 775-786.

Cardoso VV, Prestes RP, Casali EA, Moreira JCF and Oliveira AK (2004) Ornithine decarboxylase activity during the development of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae). Arch Insect Bioch Physiol 57:151-159.

Carvalho RS; Nascimento AS and Matrongolo WJR (2000) Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. In Conhecimento Básico e Aplicado. Malavasi A e Zucchi RA. (eds) Holos editora, Ribeirão Preto, 327 pp.

Cayre M, Tirard A, Charpin P, Augier R, Strambi C, Strambi A. (1993) Age and tissue-dependent changes of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase activities in neuronal tissue and fat body of adults crickets. Arch Insect Biochem Physiol 24: 219-228.

Cayre M; Strambi C; Charpin P; Augier R; Renucci M and Strambi A (1996) Inhibition of polyamine biosynthesis alters ovoposition behavior in female crickets. Behv Neur 110(5): 1117-1125.

Cayre, M., Strambi, C., Tirard, A., Renucci, M., Charpin, P., Augier, R., Strambi, A., (1995) Effects of juvenile hormone on polyamines of the fat body and neural tissue of the cricket *Acheta domesticus*. Comp Bioch Physiol 111: 241-250.

Chabanon H, Persson L, Wallace HM, Ferrara M and Brachet P (2000) Increased translation efficiency and antizyme-dependent stabilization of ornithine decarboxylase in amino acids supplemented human colon adenocarcinoma cells,caco-2. Biochem J 348: 401-408.

Coffino P (2001) Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:188-194.

Coffino P and Chen EL (1988) Nucleotide sequence of the mouse ornithine decarboxylase gene. *Nucleic Acids Res* 16 (6):2731-2732.

Cohen SS (1998) A guide to polyamines. Oxford University Press, INC, New York, 220 pp.

Cousin MA, Lando D, Moguilewsky M (1982) Ornithine decarboxylase activity induction by glucocorticoids in brain and liver of adrenalectomized rats. *J Neuroch* 38: 1296-1303.

Cox DR, Trouillot T, Ashley PL, Brabant M and Coffino P (1988) A functional mouse ornithine decarboxylase gene (*Odc*) maps to chromosome 12: Further evidence of homology between mouse chromosome 12 and the short arm of human chromosome 2. *Cytogenet Cell Genet* 48(2): 92-94.

Da Cruz IBM, Humeres E and Oliveira AK (1997) Toxicity of Fention to *Anastrepha fraterculus* (Wied) (Diptera:Tephritidae): Dose Response Analysis. *An Soc Entomol Brasil* 26(3) :471-479.

Da Cruz IBM, Taufer M; Nascimento JC and Oliveira AK (2000) Morfologia do aparelho Reprodutor e Biologia do Desenvolvimento. In *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Conhecimento Básico e Aplicado*. Malavasi A e Zucchi RA. (eds) Holos editora, Ribeirão Preto, 327pp.

Davalli P, Carpena E, Serrazanetti GP, Bettuzzi S, Viviani R and Corti A (1990) Responses of polyamine metabolism to metal treatment (Co, Cu, Zn, Cd) in the liver of the

goldfish (*Carassius auratus*): Distinct effect of season and temperature. *Comp Bioch Physiol* 97C: 305-310.

Dave KG (1996) Hormonal control of the follicular epithelium during vitellogenin uptake. *Inv Repr Devel* 30: 249-254.

Deng AY, Gu L, Rapp JP, Szpirer C and Szpirer J (1994) Chromosomal assignment of 11 loci in the rat by mouse-rat somatic hybrids and linkage. *Mamm Genome* 5(11): 712-716.

Drew RAI (1968) Morphology of Reproductive System of *Strumeta Tryoni* (Froggat) (Diptera: Thypetidae) with a Method of Distinguishing Sexully Mature Adult Males. *J Aust Ent Soc* 8: 21-32.

Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Berger EM (2002) Juvenile hormone signaling during oogenesis in *Drosophila*. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1555-1565.

Environmetal Protection Agency. Food and quality protection ct (FQPA) (1996) <http://www.epa.gov/opppsp1/fqpa>.

Ehler LE; Endicot PC, Hertlein MB and Alvarado Rodrigues B (1984) Medfly eradication in California. Impact Malathion bait sprays an endemic gall midge and its parasitoids. *Entomol Exp Appl* 36: 201-208.

Fachinello JC (2003) Situação e perspectiva da produção integrada na Europa In: Protas e Sanhueza (eds). *Produção integrada de frutas: o caso da maçã no Brasil*. Bento Gonçalves : Embrapa Uva e Vinho, (EMBRAPA: Circular Técnica, 34): 21-32.

Fitzgerald MC and Flanagan MA (1989) Characterization and sequence analysis of the human ornithine decarboxylase gene. *DNA* 8(9): 623-634.

Fletcher BS (1979) The Overwintering survival of adults of the Queensland fruit fly, *Dacus tryoni*, under natural conditions. Aust J Zool 27:403-411.

Fletcher BS (1989) Temperature-development rate relationships of the immature stages and adults of Tephritid fruit flies. In Fruit Flies: their biology natural enemies and control. Robson AS and Hooper G(eds). Elsevier Science Publ., New York, 446 pp.

Franceschetti M, Illingworth C, Mayer MJ, Michael AJ (1999) Isolation and characterisation of a cDNA for ornithine decarboxylase from *Schizosaccharomyces pombe* EMBL/Genbank/DDBJ/databases.

Fredlund JO, Johansson MM, Dahlberg E and Oredsoson TM. (1995) Ornithine decarboxylase and s-adenosylmethionine decarboxylase expression during the cell cycle of Chinese hamster ovary cells. Exp Cell Res 216: 86-92.

Frydman L, Rossomando PC, Frydman V, Fernandez CO, Frydman, B and Samejinma K (1992) Interactions between natural polyamine and tRNA : An NMR analysis. Proc Nat Acad Scie USA 89: 9186-9190.

Gilbert LI, Granger NA and Roe RM (2000) The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. Insect Bioch Mol Biol 30: 617-644.

Grens A, Steglich C, Pilz R and Scheffler IE (1989) Nucleotide sequence of the Chinese hamster ornithine decarboxylase gene. Nucleic Acids Res 17(24): 97-104.

Grossie BVJr, Ota DM, Ajani JÁ and Nishihioka K (1987) Effect of intravenous  $\alpha$ -difluoromethylornithine on the polyamines levels of normal tissue and a transplantable fibrosarcoma. Cancer Res 47:1836-1840.

Guo Y, Harris RB, Boorman D and O'Brien TG (2002) functional analysis of human

ornithine decarboxylase alleles. *Cancer Res* 60:6314-6317.

Hagedorn HH and Kunkel (1979) Vitellogenin and vitellin in insects. *Annu Rev Entomol* 24:475-505.

Hagedorn HH, O'Connor JD, Fuchs MS, Sage B, Schlaeger DA and Bohm MK (1975) The ovary as a source of  $\alpha$ -ecdysone in an adult mosquito. *Proc Nat Acad Sci USA*. 72: 3255-3259.

Handler MA (1997) Development regulation of yolk protein gene expression in *Anastrepha suspensa*. *Arch Insect Bioch Physiol* 36: 25-35.

Hartfelder K (2000) Insect juvenile hormone. *Braz J Med Biol Res*, 33(2), 155-177.

Heby O (1981) Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation*. 19: 1-20.

Heby O and Emanuelsson H (1981) Role of the polyamines in germ cell differentiation and in early embryonic development. *Med Biol* 59: 417-422.

Heby O, Sarna GP, Marton LJ, Omine M, Perry S and Russel DH (1973) Polyamines content of AKR leukemic cells in relation to the cell cycle *Cancer Res* 33: 2959-2964.

Heiskala M, Zhang J, Hayashi S, Holtta E and Andersson LC (1999) Translocation of ornithine decarboxylase to the surface membrane during cell activation and transformation. *The EMBO Journal* 18:1214-1222.

Hendrichs J (1996) Action Programs Against Fruit Flies of Economic Importance. Session Overview. In *Fruit Flies Pest.* –Mc Pheron and Steck (eds), Florida, 563 pp.

Henley C.M, Wey K, Takashima A, Mills C, Granmayeh E, Krishnappa I and Robertson CS (1997) S-adenosylmethionine decarboxylase activity is decreased in the rat cortex after traumatic brain injury. *J Neuroch* 69: 259-265

Herbst and Dion AS (1970) Polyamine changes during development of *Drosophila melanogaster*. *Fed Proc* 29: 1563-1567.

Hickok NJ, Wahlfors J, Crozat A, Halmekytö M, Alhonen L, Jänne J and Jänne, OA (1990). Human ornithine decarboxylase-encoding loci: nucleotide sequence of the expressed gene and characterization of a pseudogene. *Gene* 93(2): 257-263.

Hoggard N, Green CD (1986) Polyamines and growth regulation of cultured human breast cancer cells by 17- $\beta$ -oestradiol. *Mol Cell Endocr* 46:71-78.

Holden PC and Storey BK (1994) 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from a freeze tolerant insect : control of the hexose monophosphate shunt and NADPH production during crioprotectant synthesis. *Insect Bioch Molec Biol* 24 :167-173.

Humeres E, Da Cruz IB, Ribeiro LG, Taufer M, Nascimento JC and Oliveira AK (1996b) Survival and development of imature stages of *Anastrepha fraterculus* ( Diptera: Tephritidae) reared in environmental conditions. In Ann. 2nd Meeting of Working Group on Fruit Flies of Western Hemisphere. 1:51p

Humeres E, Da Cruz IBM and Oliveira AK (1999) Age and time Exposure related toxicity of fenthion to male and female *Anastrepha fraterculus* (Wied) (Diptera:Tephritidae). *An Soc Entomol Brasil* 28(2):285-292.

Humeres E, Da Cruz, IBM, Ribeiro LG and Oliveira AK (1996a) Detection of *Anastrepha fraterculus* ( Diptera: Tephritidae) adults in field under winter conditions in São

Joaquim county, Brazil. In Ann. 2nd Meeting of Working Group on Fruit Flies of Western Hemisphere. 1:51.

Jänne J, Pöso H and Raina A (1978) Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochim Biophys Acta* 473: 241-293.

Jänne J, Alhonen L, Pietilä M and Keinänen TA (2004) Genetic approaches to the cellular function of polyamines in mammals Review Article. *Eur J Biochem* 271:877-894.

Jowet T and Postlethwait JH (1980) The regulation of yolk polypeptide synthesis in *Drosophila* ovaries and fat body 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone analogue. *Devel Biol* 80: 225-234.

Kahana C and Nathans D (1985) Translational regulation of mammalian ornithine decarboxylase by polyamines. *J Biol Chem* 260: 5390-5393.

Kamali K and Schulz T (1974) Biology and Ecology of *Gymnocarena diffusa* (Diptera: Tephritidae) on Sunflower in North Dakota. *Ann Entomol Soc Amer* 67(4): 695-699.

Kanamoto R, Nishiyama M, Matsufuji S and Hayashi S (1991) Translational control mechanism of ornithine decarboxylase by asparagine and putrescine in primary cultured hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 291(2): 247-254.

Katz A and Kahana C (1998) Isolation and characterization of the mouse ornithine decarboxylase gene. *J Biol Chem* 263(16): 7604-7609.

Kelly TJ, Adams TS, Schwartz MB, Birbaum M.J, Rubenstein EC and Imberski RB (1987) Juvenile hormone and ovarian maturation in the Diptera: a review of recent results. *Insect Biochem* 17: 1089-1093.

Kilpelainen PT (2002) Ornithine decarboxylase. Expression and regulation in rat brain and in transgenic mice. PhD Thesis, Department of Biochemistry, University of Oslo, Oslo, Finland, 188 pp.

Kilpelainen PT and Heitala OA (1994) Activation of rat brain ornithine decarboxylase by GTP. *Biochem J* 300: 577-582.

Koeppe JK, Fuchs M, Chen TT, Hunt LM, Kovalick GE and Briers T (1985) The role of juvenile hormone in reproduction. In: Kerkut GA. and Gilbert LI (eds), *Compreh Insect Physiol Biochem Pharmacol*. Pergamon Press, Oxford, pp 165–204.

Kogan HP and Hagedorn HH (2000) Polyamines, and effects from reducing their synthesis during egg development in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Physiol* 46: 1079-1095.

Kornvika L and Jones P (2000). Spermidine acetyltransferase is required to prevent spermidine toxicity at low temperatures in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182, 5373-5380.

Kovaleski A (1997) Processos adaptativos na colonização de maçã (*Malus domestica* L.) por *Anastrepha fraterculus* (Wied) (Diptera: Tephritidae) na região de Vacaria, RS. PhD thesis,. Universidade de São Paulo-SP.

Kovaleski A, Botton M, Dias J and Sugayama RL (1998) Manejo da lagarta enroladeira *Bonagota cranaodes* (Tortricidae) e da mosca-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Tephritidae) em pomares comerciais de macieira. *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Entomologia*. 1: 380p

Kovaleski A and Ribeiro LG (2003) Manejo de pragas na produção integrada de maçãs. In: Protas e Sanhueza (eds). *Produção integrada de frutas: o caso da maçã no Brasil*. Bento Gonçalves : Embrapa Uva e Vinho, (EMBRAPA:Circular Técnica, 34): 61-76.

Kusunoki S and Yamasu I (1978) Inhibitory effect of  $\alpha$ -hydrazinoornithine on egg

cleavage in sea urchin eggs. *Dev Biol* 67: 36-345.

Lee RE (1991) Principles of Insect Low Temperature Tolerance. In: Lee R, Denlinger DL (eds), *Insects at low temperature*. Chapman and Hall Press, New York and London, pp 17-46.

Lillerberg SL, Killilea D; Vaskes DA, Leopold AR and Sparks RB (1991) Evidence for an inactive plasma membrane-associated precursor of active cytoplasmic ornithine decarboxylase in developing embryos of *Musca domestica*. *Biochem Biophys Res Commun* 174(2): 497-503.

Liu S; Zhang G and Zhu J (1995) Influence of temperature variations on rate of development in insects: Analysis of case studies from entomological literature. *Ann Entomol Soc Amer* 88:107-119.

Lopez MC, Garcia ,Ruiz Herrera J,Dominguez A (1997) The ornithine decarboxylase gene from *Candida albicans*. Sequence analysis and expression during dimorphism. *Curr Genet* 32:108-114.

Lövkvist-Wallström E, Takao K, Wendt A, Vargiu C, Yin H and Persson L (2001) Importance of the 3' untranslated region of ornithine decarboxylase mRNA in the translational regulation of the enzyme. *Biochem J* 356: 627-634.

Lowkvist B, Emmanuelsson H and Heby O (1983) Effects of polyamines limitation on nucleolar development and morphology in early chick embryos. *Cell Differentiation* 12: 19-26.

Lowry OH; Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall RJJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Bio Chem* 193: 265-275,

Lundquist A, Lowkvist B, Linden M, Heby O (1983) Polyamines in early embryonic

development: their relationship to nuclear multiplication rate, cell cycle traverse, and nucleolar formation in a dipteran egg. *Dev Biol* 95: 253-259.

Machado AE, Salles LAB and Loeck AE (1995) Exigências térmicas de *Anastrepha fraterculus* (WIED) e estimativa do número de gerações anuais em Pelotas, RS. *An Soc Entomol Brasil* 24(3): 573-577.

MacRae M, Kramer DL and Coffino P (1998) Development effect of polyamines depletion in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J* 333: 309-315.

Malavasi A, Zucchi RA and Sugayama R (2000) Parasitóides-Braconidea. Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. In *Conhecimento Básico e Aplicado*. Malavasi A e Zucchi RA. (eds) Holos editora, Ribeirão Preto, 327 pp.

Manzella JM, Rychlik W, Rhoads RE, Hershey JW and Blackshear PJ (1991) Insulin induction of ornithine decarboxylase. Importance of mRNA secondary structure and phosphorylation of eucaryotic initiation factors eIF-4B and eIF-4EJ. *Biol Chem* 266(4): 2383-2389.

Meats A (1983) Critical periods for developmental acclimation to cold in the Queensland fruit fly, *Dacus tryoni*. *J Insect Physiol* 29(2): 943-946.

Meats A (1987) Survival of step and ramp changes of temperature by the Queensland fruit fly, *Dacus tryoni*. *Physiol Entomol* 12: 165-170.

Morgante JS (1991) Moscas-das-Frutas (Tephritidae): características biológicas, detecção e controle. Brasília, SENIR, Boletim Técnico, 2: 19.

Morris DR and Fillingane RH (1974) Regulation of aminoacid decarboxylation. *Ann Ver Bioch* 43: 303-325.

Murakami Y; Tanaka K, Matsufuji S, Miyazaki Y and Hayashi S (1992) Antizyme a protein induced by polyamines, accelerates the degradation of ornithine decarboxylase in Chinese-hamster ovary-cell extracts. *Biochem J* 283: 661-664.

Myers DP, Jackson LK, Ipe VG, Murphy GA, Phillips MA (2001) Long-Range Interactions in Dimer Interface of Ornithine Decarboxylase are important for enzyme function. *Biochem* 40:13230-13236.

Nascimento JC and Oliveira AK (1996) Embryogenesis in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Interciencia* 21(3): 197-201.

Nascimento JC and Oliveira AK (1997a) Ontogenetic development of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae): isoenzyme patterns of isocitrate and alcohol dehydrogenase. *Comp Bioch Physiol* 118:847-854.

Nascimento JC and Oliveira AK (1997b) the isozymatic pattern of alkaline phosphatase during ontogenetic development of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) *Braz J Gen* 2092):197-201.

Nascimento JC, Taufer M, Gottlieb MG and Oliveira AK (1998) Velocidade de desenvolvimento e viabilidade de pupas de *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) submetidas a 4 diferentes temperaturas constantes. *Anais XVII Congresso Brasileiro de Entomologia* 1: 181.

Nijhout HF (1994) *Insect Hormones*. Princeton University Press, Princeton New Jersey, 267 pp.

Nora I, Hickel ER and Prando HO (2000) Ocorrência de moscas-das-frutas em Santa Catarina. In: *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Conhecimento Básico e Aplicado*. Malavasi A e Zucchi RA (eds). Holos editora, Ribeirão Preto, 327 pp.

Notari S, Lucchi R, Traversa U, Fabbri E and Poli A (2004) Reversible changes in goldfish brain polyamine concentrations and synthetic enzymes after cold exposure. *Brain Res* 1006: 241-247.

Obenrader MF and Prouty WF (1977) Detection of multiple forms of rat liver ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 252: 2860-2865.

O'Brien TG, Heitala O, O'Donnell and Holmes M (1987) Activation of mouse epidermal tumor ornithine decarboxylase by GTP: evidence for different catalytic forms of the enzyme. *Proc Nat Acad Sci U S A* 84(24): 8927-8931.

O'Brien TG, Madara T, Pyle JÁ and Holmes M (1986) Ornithine decarboxylase from mouse epidermis and epidermal papillomas: differences in enzymatic properties and structure. *Proc Nat. Acad Sci USA*. 83(24): 9448-9452.

Oliveira MA, Carrol D, Davidson L, Momany C and Hackert M (1997) The GTP effector site of ornithine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a: kinetic and structural characterization. *Biochem* 36: 16147-16154.

Orth A, Ribeiro LG, Reis and Filho W (1986) Manejo de Pragas. In *Manual da Cultura macieira*. EMPASC (eds), Florianópolis, SC, 479 pp.

Osterman AL, Kinch LN, Grishin NV and Phillips MA (1995) Acidic residues important for substrate binding and cofactor reactivity in eukaryotic ornithine decarboxylase identified by alanine scanning mutagenesis. *J Biol Chem* 270 (20): 11797-11802.

Otieno MA and Kensler TW (2000) A role for protein kinase C-delta in the regulation of ornithine decarboxylase expression by oxidative stress. *Cancer Res* 60(16): 4391-4396.

Pajunen AEI, Virransalo EL, Heitala AO and Piha RS (1978) Stimulation of L-ornithine and S-adenosylmethionine decarboxylase by  $\alpha$ -(chlorophenyl)- $\alpha$ -aminobutyric acid in mouse brain. *Acta Chemistry Scand B32*: 322-326.

Pegg AE (1986) Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Bioch J* 234: 249-262.

Pegg AE, Feith DJ, Fong LY, Coleman CS, O'Brien TG and Shantz LM (2003) Transgenic mouse models for studies of the role of polyamines in normal, hypertrophic and neoplastic growth. *Biochem Soc Trans* 31, 356-360.

Pendeville H, Carpino N, Marine JC, Takahashi Y, Muller M, Martial JA and Cleveland JL (2001) The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Mol Cell Biol* 21: 6549-6558.

Persson L; Holm I and Heby O (1988) Regulation of ornithine decarboxylase mRNA translation by polyamines *J Biol Chem* 260: 3528-3535

Pöso H and Pegg AE (1982) Effect of  $\alpha$ -difluoromethylornithine on polyamines and DNA synthesis by putrescina. *Biochim Biophys Acta* 696:179-186.

Postlethwait JH and Shirk PD (1981) Genetic and Endocrine Regulation of vitellogenesis in *Drosophila*. *Amer Zool* 21:687-700.

Poulin R and Pegg AE (1990) Regulation of ornithine decarboxylase expression by anisosmotic shock in alpha-difluoromethylornithine-resistant L1210 cells. *J Biol Chem* 265(7): 4025-4032.

Poulin R, Lu L, Ackermann B, Bey P and Pegg, AE (1992) Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alpha-difluoromethylornithine.

Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites. *J Biol Chem* 267(1): 150-158.

Pritchard G (1970) The ecology of a natural population of the Queensland fruit fly, *Dacus tryoni*. The maturation of females flies in relation to temperature. *Aust J Zool* 18:77-89.

Racioppi JV, Gemmill RM, Kogan PK, Calvo JM and Hagedorn HH (1986) Expression and regulation of vitellogenin messenger RNA in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem* 16: 255-262.

Rachinsky A and Tobe SS (1996) role of second messengers in the regulation of juvenile hormone production in insect, with particular emphasis on calcium and phosphoinositide signaling. *Arch Insect Biochem Physiol* 33:259-282.

Radford DM, Nakai H, Eddy RL, Haley LL, Byers MG, Henry WM, Lawrence DD, Porter CW and Shows TB (1990) Two chromosomal locations for human ornithine decarboxylase gene sequences and elevated expression in colorectal neoplasia. *Cancer Res* 50 (19): 6146-6153.

Rajam MV, Weinstein LH and Galston AW (1985) Prevention of a plant disease by specific inhibition of fungal polyamines biosynthesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 82: 6874-6878.

Rauschenbach IY., Gruntenko NE, Khlebodarova TM, Mazurov M.M, Grenback LG, Sukhanova M, Shumnaja LV, Zakharov IK and Hammock BD (1996) The role of the degradation system of the juvenile hormone in the reproduction of *Drosophila* under stress. *J Insect Physiol* 42: 735-742.

Riddiford L (1996) Juvenile Hormone: Status of its "Status Quo" action. *Arch Insect Biochem Physiol* 32: 271-286.

Rohn G, Schlenker M, Paschen W (1992) Activity of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase in transient cerebral ischemia: relationship to the duration of vascular occlusion. *Exp Neurol* 117: 210-215.

Rom E and Kahana C (1993) Isolation and Characterization of the *Drosophila* Ornithine Decarboxylase Locus: Evidence for the presence of two transcribed ODC genes in *Drosophila* Genome. *DNA Cell Biol* 12(6): 499-508.

Rui H and Purvis K (1987) Prolactin selectively stimulates ornithine decarboxylase in lateral lobe of rat prostate. *Mol Cell Endocr* 50:89-97.

Russel DH (1989) The physiological significance of ornithine decarboxylase. In Bacharach U, Heimer YM (eds), *The physiology of polyamines.*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp. 255-288.

Russell DH and Urie BGM (1978) Polyamines as biochemical markers of normal and malignant growth. Raven Press, New York, 278 pp.

Sakai T, Lundgren DW and Oka T(1978) Polyamines biosynthesis and DNA synthesis in cultured gland explants from virgin mice. *J Cell Physiol* 95:259-268.

Salles LAB (1993) Efeito da temperatura constante na ovoposição e no ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *An Soc Entomol Bras* 24:147-152.

Salles LAB (1995) Bioecologia e controle da mosca-das-frutas sul-americana. Pelotas : Embrapa-CPACT, 58p.

Santoso A and Sparks RB (1996) Housefly Ornithine Decarboxylase: DNA sequence of embryonic RT-PCR clone. Submitted to the EMBL/Genbank/ DDBJ databases Q27702.

Scoz PL, Mauro MB and Garcia MS (2004) Controle químico de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) em laboratório. *Ciência Rural*, v.34, n.6, Santa Maria 34(6) 1689-1694.

Selivon D, Morgante JS and Perondini ALP (1997) Egg size, yolk mass extrusion and hatching behavior in the cryptic species of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae). *Braz J Gen* 20: 587-594.

Shantz LM and Pegg AE (1999) Translational regulation of ornithine decarboxylase and others enzymes of the polyamines pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 107-122.

Sivinski MJ (1996) The pest and potential of biological control of fruit flies In *Fruit Flies Pest-Mc Pheron e Steck* (eds), Florida, pp563-575.

Slotkin TA, Jonhson A, Whitmore WL and Slepetic RJ (1984) Ornithine decarboxylase and polyamines in developing rat brain and heart: Effects of perinatal hypothyroidism. *Inter J Devel Neur* 2: 155-161.

Soto-Manatiu J, Jiron LF and Hernandez R (1987) Chemical control and ecological observations of the fruit flies of the genes *Anastrepha* (Diptera; Tephiritidae) on mango. *Turrialba* 37: 245-251.

Sparks RB; Vaske D; Lillerberg S and Leopold R (1991) Temporal expression of ornithine decarboxylase in developing embryos of *Musca domestica* L. *Arch Insect Biochem Physiol* 16: 177-187.

Storey JM and Storey KB (1983) Regulation of crioprotectant metabolism in the overwintering gall fly larvae, *Eurostata solidaginis*: Temperature control of glicerol and sorbitol levels. *J Comp Physiol* 149: 495-502.

Strambi C, Tirad A, Renucci M, Faure P, Charpin P, Augier R and Strambi A (1993)

Ecdysone deprivation affects polyamines metabolism in the house cricket *Acheta domestica*.  
Insect Biochem and Mol Biol 23: 165-170.

Svensson F, Ceriani C, Wallstrom EL, Kchum I, Algranati ID, Heby O and Persson L (1997) Cloning of trypanosomatid gene coding for an ornithine decarboxylase that is metabolically unstable even though it lacks the C-terminal degradation domain. Proc Nat Acad Sci USA. 94(2): 397-402.

Tabor CW and Tabor H (1984) Polyamines. Annu Rev Biochem. 53: 749-790.

Taufer M (1998) O efeito da temperatura na biologia de adultos de *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae): longevidade, desenvolvimento ovariano e isoenzima relacionadas com o metabolismo energético. Master Thesis, Curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, Porto Alegre, RGS.

Taufer M; Nascimento JC, Humeres E and Oliveira AK (1996) *Anastrepha fraterculus* adult resistance to low temperatures. In Ann. 2nd Meeting of Working Group on Fruit Flies of Western Hemisphere. 1: 36.

Taufer M; Nascimento JC; Canto MEP, Da Cruz IBM and Oliveira AK (1998) Desenvolvimento ovariano, taxa de ovoposição e velocidade do desenvolvimento embrionário em *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) quando submetidas a diferentes temperaturas. In Anais do XVII Congresso Brasileiro de Entomologia, 1: 180.

Taufer M; Nascimento JC; Canto MEP, Da Cruz IBM and Oliveira AK (2000) Efeito da temperatura na maturação ovariana e longevidade de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 29(4): 639-648.

Telfer WH (1965) The mechanism and control of yolk formation. *Ann Rev. Entom.* 10:161-84.

Thomas T and Thomas TJ (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 58: 244–258.

Tobe SS and Stay B (1985) Structure and regulation of the corpus allatum. *Adv Insect Physiol* 18: 305-432.

Tobias KE and Kahana C (1993) Intersubunit location of the active site of mammalian ornithine decarboxylase as determined by hybridization of site-directed mutants. *Biochemistry* 32(22): 5842-5847.

Hascilowicz T, Murai N, Matsufuji S, Murakami Y (2002) Regulation of ornithine decarboxylase by antisymes and antizyme inhibitor in Zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim Biophys Acta* 1578 (1-3): 21-28.

Tonin PN, Stallings RL, Carman MD, Bertino JR, Wright JA, Srinivasan PR and Lewis WH (1987) Chromosomal assignement of amplified genes in hydroxyurea-resistant hamster cells. *Cytogenet Cell Genet* 45(2): 102-108.

Van Daalen W, Macrae M, Brabant M, Sittler A and Coffino P (1989) Polyamines-mediated regulation of mouse ornithine decarboxylase is posttranslational. *Mol Cell Biol* 9: 5484-5490.

Van Steeg H, van Oostrom TM, van Kranen HJ and van Kreijl CF (1988) Nucleotide sequence of the rat ornithine decarboxylase gene. *Nucleic Acids Res* 16(16): 8173-8174.

Vargas RJ, Stark JD, Vahide GK and Purcell M (1993) Opiine parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) of oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) on Kanai. Island

Hawai: Island wide relative abundance and parasitism rates. In wild an orchard guava habits. Environm Entomol 22: 246-253.

Verma AK, Pong RC and Erickson D (1986) Involvement of protein kinase C activation in ornithine decarboxylase gene expression in primary culture of newborn mouse epidermal cells and in skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Cancer Res 46: 6149-6155.

Voigt J, Fausel M, Bohley P, Adam KH, Marquardt O (2004) Sctucture and expression of the ornithine decarboxylase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. Microbiol Res 159: 403-417.

We L, Huang JK and Blackshear PJ (1989) Rat ornithine decarboxylase gene. Nucleotide sequence, potential regulatory elements, and comparison to the mouse gene. J Biol Chem 264(15): 9016-9021.

Williamson DL (1989) Oogenesis and spermatogenesis. In Robison A. S. and Hooper (eds). Fruit flies their biology, natural enemies and control. World Crop Pest vol 3<sup>A</sup>, New York, Elsevier Science, 378 pp

Willis JH (1981) Juvenile hormone: The status of ‘‘status quo’’ Am Zool 21:763-773.

Winqvist R, Mäkela TP, Seppänen P, Jänne OA, Alhonen-Hongisto L, Jänne J, Grzeschik KH and Alitalo K (1986) Human ornithine decarboxylase sequences map to chromosome regions 2pter--p23 and 7cen-qter but are not coamplified with the NMYC oncogene. Cytogenet Cell Genet 42(3): 133-140.

Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne MH, Lyne R, Stewart A. *et al.* (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. Nature 415: 871-880.

Wu SJ and Ma M (1986) Hibridoma antibodies as specific probes to *Drosophila melanogaster* yolk polypeptides. *Insect Biochem* 16: 789-795.

Wyatt GR, Rothaus D, Lawler and Herbst EJ (1973) Ornithine decarboxylase and polyamines in silkmouth pupal tissues: effects of ecdysones and injury. *Biochim Biophys Acta* 304: 482-494.

Yang P, Carey RJ and Dowell RV (1994) Temperature influences on the development and demography of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in China *Ann Ent Soc Am* 23: 971-974.

Yao J, Zadworny D, Aggrey SE, Kuhnlein U and Hayes JF (1998) Bovine ornithine decarboxylase gene: cloning, structure and polymorphisms. *DNA Seq* 8(4): 203-213.

Yufera EP (1991) *Ecología química. Nuevos Métodos de lucha contra insectos.* Ediciones Mundi-Prensa, Castello, Madri, 191 pp.

Zhou X, Coll M and Applebaum SW (2000) Effect of temperature and photoperiod on juvenile hormone biosynthesis and sexual maturation in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*: Implications for life history traits. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 863-868.

Zucchi RA (2000) Espécies de *Anastrepha*, Sinonímias plantas hospedeiras e parasitóides. In *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Conhecimento Básico e Aplicado.* Malavasi A e Zucchi RA (eds). Holos editora, Ribeirão Preto, 327 pp.

**Anexo**

## **Expressão do gene para Ornitina decarboxilase**

### **Metodologia Básica**

#### **Extração do RNA total**

A extração foi realizada segundo protocolo da Invitrogen. As moscas foram colocadas em jejum em vidros de cultura contendo apenas papel umedecido em água "over-night". Três moscas foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas. Após maceração, o tecido foi incubado em Trizol™ Invitrogen (1 ml), clorofórmio (200 µl), álcool isopropílico (500 µl). O precipitado foi lavado com etanol 75% (1,0 ml), centrifugado a 2-8°C. Após remover o sobrenadante, o precipitado foi seco durante 10 minutos e posteriormente eluído em 20 ml de água tratada com Dnase. Por fim, o RNA obtido foi checado em gel de agarose e quantificado por espectrofotometria.

#### **Síntese de cDNA**

Para sintetizar o cDNA utilizamos o "Firts-Strand cDNA Synthesis Kit" da Amersham Biosciences. Para cada reação utilizou-se do Kit:

\* Bulk First- strand CDNA Reaction Mixes 5 µl (Cloned FLPCpure™ Murine Reverse Transcriptase, RNAGuard™ porcine, RNase/DNase-Free bsa, dATP, dGTP, dCTP e dTTP diluído em tampão);

\* solução DTT (1 µ) (200 mM em solução aquosa);

\* Pd(N)<sub>6</sub> Primer (1 µl);

\* RNA extraído 8µl (5µg)

Todos os reagentes foram misturados por pipetagem, pré-incubados durante 1 hora e 30 minutos a 37°C e logo após, incubados por mais 5 minutos a 90°C.

### **RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)**

O cDNA sintetizado foi amplificado por RT-PCR em termociclador (MiniCycler, MJ Research) .

Para cada reação de PCR com volume de 50 µl, foram misturados os seguintes reagentes:

- \* dNTP 10 mM (2,0 µl): 10 µl de cada dNTP+60 µl de água milliQ autoclavada;
- \* Tampão PCR 10 x (5 µl );
- \* MgCl<sub>2</sub> (1,5mM);
- \* Taq polimerase(5U/ µl);
- \* Primers (oligos) (2 µl) (20pmol/ µl);
- \* cDNA (1 µl);
- \* Água tratada.

### **No termociclador o programa utilizado inicialmente foi:**

Passo 1 94°C.....5 minutos

Passo 2 94°C.....1 minuto

Passo 3 50°C.....1 minuto      Repetir os Passos de 2 a 4, 40 vezes

Passo 4 72°C.....1 minuto

Passo 5 72°C.....7 minutos

## Passo 6 Resfriamento a 4°C

Juntamente com os primers para amplificação do gene da ODC foi utilizado outro conjunto de oligonucleotídeos específicos para *A. fraterculus* como controle interno, eles foram desenhados e sintetizados em nosso laboratório para o gene de actina a partir de *A. suspensa*.

Após não termos conseguido amplificar o conjunto de primers (oligonucleotídeos) de ODC, foram realizadas modificações nas condições da reação de RT-PCR. A temperatura de anelamento sofreu variações entre 45°C a 55°C, também foi variado o número de ciclos e foram modificadas as concentrações de sal ( $MgCl_2$ ) e de dNTP.

## **Eletroforese**

Para verificar o material amplificado utilizamos gel de agarose com Brometo de Etídio 1.5%. O gel de agarose foi preparado com 0.45 g de agarose em 30 ml de TBE (0,5%) e 1µl de Brometo de Etídio. Através da eletroforese foram aplicadas as amostras nos géis juntamente com o marcador de peso molecular de 100bp.

## **Extração de DNA**

A extração foi realizada segundo protocolo de Jowett com modificações. As moscas foram colocadas em jejum em vidros de cultura contendo apenas papel umedecido em água "over-night". As moscas selecionadas foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas. Após maceração, o tecido foi incubado em 750 µl de tampão de lise (NaCl 60 mM, EDTA

100 mM, Tris 100 mM, SDS 1% p/v) a 65°C por 1 hora. A extração das proteínas foi feita em um volume de fenol tamponado pH 8 (Invitrogen) por inversão durante 10 min. A separação das fases foi realizada por centrifugação de 16000 g por 15 min. O passo seguinte da extração foi feito por adição de um volume de fenol-clorofórmio. O passo final da extração foi realizado com um volume de clorofórmio. A precipitação foi feita com 20% do volume de cloreto de sódio 1 M e dois volumes de etanol absoluto por pelo menos 2 horas a -20°C. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco em estufa 37°C e eluído em 30 µl de água milliQ autoclavada. O DNA foi tratado com 15 mg/ml de RNase e checado em gel de agarose e quantificado por espectrofotometria.

### **Purificação**

Purificação do produto do PCR foi realizada com a Coluna GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit da Amersham Biosciences.

### **Clonagem**

Ligação: Produto purificado + pCR<sup>R</sup> 4-TOPO<sup>R</sup> Map (Invitrogen)

Transformação bacteriana por "choque térmico"

Meio líquido 2,5% do meio LB (1% de bacto-triptofano + 0,5% de extrato de levedura + 1% de NaCl. Meio sólido 1.5% de agar)

Choque térmico em banho-maria de 42°C por cinco minutos seguido de resfriamento no gelo por cinco minutos. Plaques 0,1 ml LB sólido contendo 50ug/ul tetraciclina e 100ug/ul de ampicilina.

### **Extração de DNA Plasmidial (Med Prep)**

A extração plasmidial foi realizada utilizando o Extraction and Purification DNA Kit (Promega).

### **Seqüenciamento**

O seqüenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o seqüenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados por PCR utilizando-se 3,2 pmol do primer 5'-NNNNNNNNNNNNNNN-3' e 2 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µl. As reações de marcação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundo, 55 °C por 5 segundo e 60 °C por 4 minuto. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavadas com etanol 70 %. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µl de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 minuto e eletroinjetados no seqüenciador automático. Os dados de seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set "Z"; Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"; BioLIMS Project "3100\_Project1.

**Condições de PCR para os primers degenerados sintetizados pelo professor Dr. Rom do Departamento de Genética Molecular e Virologia do Instituto Weizmann -**

**Israel, usando uma seqüência degenerada construída com base na seqüência de camundongos.**

Passo 1 94°C.....2 minutos

Passo 2 94°C.....45 segundos

Passo 3 52°C.....6 minutos     Repetir os Passos de 2 a 4, 14 vezes

Passo 4 72°C.....5 minuto

Passo 5 94°C.....45 segundos

Passo 6 52°C.....5 minutos     Repetir os Passos de 5 a 7, 26 vezes

Passo 7 72°C.....5 minuto

Passo 8 72°C.....2 minutos

Passo 9     Resfriamento a 4°C.

Com os resultados negativos, essas condições acima sofreram modificações nos números de ciclos, tempos e temperaturas de anelamento.

### **Síntese e alinhamento de oligonucleotídeos**

Os alinhamento das seqüência de ODC de várias espécies foram realizadas utilizando-se o programa Bioedit sequence alignment editor (Clustal x) e a construção de primers (oligonucleotídeos) foi realizada utilizando o programa Oligo 4.1 Primer analyze software copyright 1999 (Wojeiech Rythlik).