

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**"Seqüência de cDNA e modulação hormonal da expressão  
do receptor de ecdisona (*EcR*) em fêmeas de *Apis  
mellifera*"**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
da USP, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências,  
Área: Biologia Comparada.

Aluna: Aline Carolina Aleixo Silva Teles

Orientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

Ribeirão Preto - SP

2007

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Teles, Aline Carolina Aleixo Silva

“Seqüência de cDNA e Modulação Hormonal da Expressão do Receptor de Ecdisona (EcR) em Fêmeas de *Apis mellifera*”. Ribeirão Preto, 2007.

80 p. il, 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Biologia Comparada.

Orientadora: Simões, Zilá Luz Paulino

1. EcR, 2.receptores nucleares, 3. ecdisteróides, 4. hormônio juvenil, 5. castas.

Aos meus pais, Marlei e João Bosco, e ao meu marido William, por sempre estarem ao meu lado. Com carinho, DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à *Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões*, pela confiança para que eu desenvolvesse este trabalho e pelo aprendizado que me proporcionou ao longo destes anos.

Agradeço aos *colegas de laboratório* pelas dicas, pelas amostras e pela amizade.

Agradeço *Angel Roberto Barchuk* pelo apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à *Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi*, por possibilitar que uma parte importante do trabalho fosse realizada em seu laboratório. Agradeço também *Roseli de Aquino P. Ferreira* e *Diana Gras*, que foram parte fundamental para que isto ocorresse.

Agradeço aos *Técnicos Apícolas do Laboratório*, sem os quais este trabalho não seria possível.

Agradeço a *Renata Andrade Cavallari*, secretária da pós-graduação, por sua competência em tornar nossa pós-graduação um pouco mais fácil.

Agradeço ao *William*, meu marido, aos meus pais, *João Bosco e Marlei* e aos meus irmãos *Thiago e Gabriella*, que sempre acreditaram em mim e nunca me deixaram desanimar diante das dificuldades.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro.

# ÍNDICE

1. RESUMO .....	v
2. ABSTRACT .....	viii
3. INTRODUÇÃO .....	11
3.1 O HORMÔNIO JUVENIL E OS ECDISTERÓIDES .....	12
3.2 RECEPTORES NUCLEARES DE HORMÔNIOS .....	14
3.3 O RECEPTOR DE ECDISONA - <i>EcR</i> .....	16
3.4 SOBRE O RECEPTOR DE ECDISONA DE <i>Apis mellifera</i> .....	18
4. OBJETIVOS .....	20
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
5.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	23
5.2 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA ORGANIZAÇÃO DO <i>EcR</i> .....	24
5.3 TRATAMENTO COM ECDISONA E HORMÔNIO JUVENIL .....	24
5.4 EXTRAÇÃO DE RNA .....	25
5.5 NORTHERN BLOT .....	26
5.5.1 PREPARAÇÃO DA MEMBRANA .....	26
5.5.2 PREPARAÇÃO E MARCAÇÃO DA SONDA .....	27
5.5.3 PARA HIBRIDAÇÃO .....	27
5.6 SÍNTESE DE cDNA .....	28
5.7 AMPLIFICAÇÃO POR PCR .....	28
5.8 CLONAGEM DO cDNA .....	28
5.8.1 LIGAÇÃO DO FRAGMENTO AO VETOR OU CLONAGEM .....	28
5.8.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA .....	29
5.8.3 DIGESTÃO .....	29
5.9 SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS.....	30
5.10 RT-PCR SEMI-QUANTITATIVA PARA OS ESTUDOS DE EXPRESSÃO .....	30
6. RESULTADOS .....	33
6.1 A SEQÜÊNCIA DE cDNA DO <i>EcR</i> .....	34
6.2 A EXPRESSÃO DE <i>EcR</i> .....	49
6.2.1 PERFIL DE EXPRESSÃO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE OPERÁRIAS DE <i>A. mellifera</i> .....	49
6.2.2 PERFIL DE EXPRESSÃO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE RAINHAS DE <i>A. mellifera</i> .....	50
6.2.3 A AÇÃO HORMONAL NA EXPRESSÃO DE <i>AmEcR</i> .....	52
7. DISCUSSÃO .....	56
7.1 SOBRE <i>AmEcR</i> E SEU TRANSCRITO .....	57
7.2 SOBRE O PERFIL DE EXPRESSÃO DE <i>EcR</i> DURANTE O DESENVOLVIMENTO .....	63
7.3 INFLUÊNCIA HORMONAL NA EXPRESSÃO DE <i>EcR</i> .....	66
7.3.1 TRATAMENTO COM 20E (20-HIDROXIECDISONA).....	66
7.3.2 TRATAMENTO COM HJ (HORMÔNIO JUVENIL).....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

**RESUMO**

---

O hormônio lipofílico ecdisona, juntamente com o hormônio juvenil (HJ), inicia e coordena os processos de muda e metamorfose em insetos ao desencadear cascatas de expressão gênica após ligação ao receptor formado pelas proteínas EcR (Receptor de Ecdisona) e USP (ultraspiracle). *EcR* pertence à superfamília dos receptores nucleares de hormônios, cujos membros são caracterizados por dar origem a uma proteína que pode ser dividida em quatro ou cinco módulos independentes, mas funcionalmente interativos, os domínios. Esses domínios são: o A/B (modulador), o C de união a DNA, o D de conexão, o E de união a ligante e o domínio F, para o qual ainda não se conhece a função. Na maioria das espécies estudadas, este gene está presente como cópia única, mas dá origem a mais de uma isoforma. Em *Drosophila melanogaster*, as isoformas são amplamente distribuídas pelo organismo, em embriões e em vários tecidos pré-pupais. Embora conheçamos aspectos da biologia de *usp* de *Apis mellifera*, pouco se sabe sobre o seu parceiro *EcR*. Então conhecer sua estrutura e sua biologia, através de seu perfil de expressão, interações com hormônios, com outros receptores ou com outras moléculas (como co-reguladores), seria interessante para uma melhor compreensão do papel que este receptor desempenha no desenvolvimento de *A. mellifera* e outros insetos.

Para isso um fragmento de *EcR* desta espécie foi seqüenciado e utilizado como ferramenta para anotação do gene no genoma da abelha e posteriormente, seqüência anotada foi utilizada para análises *in silico*. Através de comparações foi observado que a seqüência anotada corresponde ao gene estudado, devido a sua estrutura em módulos e também pela sua similaridade e elevado grau de identidade com seqüências de *EcR* de outras espécies de insetos e artrópodes já estudadas.

Os perfis de expressão determinados para *EcR* de rainhas e operárias de *A. mellifera* mostraram importantes picos de expressão, alguns deles correspondentes aos picos de ecdisteróides e HJ das duas castas, além de outros que parecem não sofrer influência direta dos títulos hormonais. Apesar de semelhantes, os perfis de *EcR* nas duas castas apresentam algumas diferenças em relação à fase e à intensidade em que cada pico de expressão ocorre, sugerindo a diferente fisiologia entre as castas.

Para uma melhor compreensão dos perfis de expressão encontrados, foram feitos experimentos de aumento artificial nas concentrações endógenas de hormônios. Os resultados obtidos mostraram que a ecdisona e o HJ regulam positivamente a expressão de *EcR* em operárias durante a fase estudada, Pb (pupa de olho marrom) em que os títulos de ecdisteróides são relativamente altos e os



títulos de HJ são muito baixos. Em rainhas, doses adicionais de HJ também regulam positivamente este receptor, no entanto, em menor intensidade do que o verificado nas operárias. Apesar disso, com o tratamento com ecdisona não foi observada alteração na expressão de EcR em rainhas, o que pode de outra maneira estar refletindo diferenças fisiológicas existentes entre ambas as castas.

Estes resultados sugerem uma importante função de *EcR* no desenvolvimento de *A. mellifera*, mostrando sua diferente influência nas castas. Sugerindo que ele pode ser um dos fatores que contribui para a diferenciação das mesmas.

**ABSTRACT**

---

The lipophilic hormone, ecdysone, with the juvenile hormone (JH), initiates and coordinates the molting and metamorphosis processes in insects by triggering cascades of gene expression after binding to the receptor formed by EcR (Ecdysone Receptor) and USP (ultraspiracle) proteins. *EcR* belongs to the nuclear receptors superfamily, whose members are marked for originate to a protein that can be divided in four or five independent but functionally interactive parts called domains. These domains are the A/B (modulator), the C or DNA-binding domain, the D domain that connect the other domains, the E or ligand-binding domain and the F domain, whose function is still unknown. In the most species, EcR is a single copy gene, but it codifies for more than one isoform. In *Drosophila melanogaster*, the isoforms are found widely through the organism, in embryos and in several prepupal tissues. Although some aspects about the *Apis mellifera usp* biology are known, the knowledge about its partner *EcR* remains essentially unknown. Then, know its structure and its biology, through its expression profile, its interaction with hormones and with other receptors or molecules (like co-regulators), would be interesting to us, for a better comprehension of the role which this receptor plays in the *A. mellifera* and another insects development.

Through comparative analysis we could observe that the annotated sequence corresponds to the studied gene. The expression profiles of *A. mellifera EcR* showed important peaks of expression in queens and workers. Some of these peaks are analogs to ecdysteroids and JH peaks in both castes, besides others that seem not to be directly biased by hormone titers. Although they are alike, *EcR* profiles in both castes showed some differences related to the stage and to the intensity where each peak was observed, suggesting a differential physiology between castes.

For a better comprehension of the expression profiles found, we made experiments to increasing the endogenous hormones concentration. Our results showed that ecdysone and JH up-regulate *EcR* expression in workers during the studied stage, Pb (brown-eyed pupae), where ecdysteroid titers are relatively high and JH titers are in basal levels. In queens, additional doses of JH also up-regulates this receptor, but the intensity is less evident than in workers. Despite of this, the ecdysone treatment in queens no alteration in *EcR* expression was observed, what can be reflecting, in another way, physiological differences between both castes.

These results suggest an important function for *EcR* in *A. mellifera* development, showing its differential influence in the castes. Then it can be suggested that *EcR* could be one of the factors contribut to cast differentiation.

# INTRODUÇÃO

---

### 3.1 O HORMÔNIO JUVENIL E OS ECDISTERÓIDES

A metamorfose em insetos geralmente envolve a destruição de tecidos larvais e sua substituição por células do adulto, na maioria das vezes, muito diferentes (em Gilbert, 1994). Nestes animais este processo é regulado por hormônios, sendo os principais o hormônio juvenil e os ecdisteróides. O hormônio juvenil (HJ) é importante durante o desenvolvimento e reprodução, tendo, além disso, papel fundamental na determinação de castas em insetos sociais, na regulação do comportamento em colônias de abelhas melíferas, na regulação da diapausa larval e adulta, na síntese de vitelogenina, no desenvolvimento do ovário, em vários aspectos do metabolismo associado a essas funções, além de ser determinante na metamorfose, momento em que deve estar ausente ou em níveis muito baixos (em Nijhout, 1994; Riddiford, 1994; Lan et al., 1999). O HJ é secretado pelos *corpora allata* e pode ser encontrado nas formas: HJ-I, HJ-II e HJ-III, entre outras. Alguns insetos secretam apenas uma das três formas, outros secretam uma mistura de duas ou três delas, mas o HJ-III é a forma principal encontrada em Hymenoptera (em Nijhout, 1994). Como hormônio de desenvolvimento, o HJ age durante discretos períodos críticos (sensíveis a HJ) controlando mudanças entre diversos pontos do ciclo de vida. Em geral, se o HJ está presente durante o período crítico, não ocorrem mudanças no desenvolvimento, mas, se ele está ausente durante tais períodos, na presença de ecdisteróides, ocorrem mudanças na expressão gênica e novos processos de desenvolvimento se iniciam. A natureza exata das mudanças durante o desenvolvimento depende da espécie e de quando, no ciclo de vida, o período crítico ocorre (em Nijhout, 1994). Em ovários de rainhas e operárias de *A. mellifera* se observa um importante envolvimento do HJ. Em níveis altos, durante o 5º estágio larval, este hormônio previne a degradação, por apoptose, do DNA nos ovários, conseqüentemente a eliminação dos ovariolos (Schmidt Capella & Hartfelder, 1998). A morte celular programada dos ovariolos é um evento importante na determinação de castas, já que nas operárias ela reduz os 150 a 200 ovariolos da fase larval, para aproximadamente 10, ou menos, durante a fase pupal. Em rainhas praticamente todos os ovariolos do ovário sobrevivem no estágio adulto (Schmidt Capella & Hartfelder, 2002). Este processo em que ocorre a regulação casta-específica da divisão celular (em rainhas) em conexão com a morte celular programada (em operárias) dos ovariolos, reflete a diferença entre as castas em relação aos

títulos de HJ, durante o estágio em questão (L5) e a multifuncionalidade deste hormônio (Schmidt Capella & Hartfelder, 1998). O HJ é conhecido como hormônio “status quo”, já que quando está presente em altos níveis, ele inibe mudanças morfológicas próprias do desenvolvimento pós-embriônico de holometábolos, exercendo ação juvenilizante nas fases larvais, ele está associado a respostas diferenciais durante o desenvolvimento de abelhas eussociais e, além disso, em operárias adultas ele desempenha um papel fundamental na divisão de trabalho (Robinson & Vargo, 1997).

Juntamente com o HJ, os ecdisteróides desempenham um importante papel na regulação do desenvolvimento e reprodução em insetos (Kumar & Thompson, 2003), pois iniciam e coordenam a muda nesses animais (Kothapalli et al., 1995; Riddiford, 1996). Os ecdisteróides conduzem cada uma das principais transições do desenvolvimento pós-embriônico (Koslova et al., 2002). A ecdisona foi o primeiro composto químico identificado como um hormônio de inseto, ela é um pró-hormônio relativamente inativo que é convertido para a forma ativa na maioria dos insetos, 20-hidroxiecdisona (20E), pelo corpo gorduroso (CG) e células epidérmicas (Horn et al., 1966; em Nijhout, 1994; em Gilbert, 1994). O papel principal deste hormônio é iniciar e coordenar as mudas larvais e a metamorfose (Riddiford, 1985), pulsos de ecdisteróides na presença de HJ disparam mudas larval-larval (Riddiford, 1978). Porém, no último estágio larval há um declínio nos níveis de HJ e aumento nos níveis de ecdisteróides o que ocasiona muda metamórfica e desenvolvimento pupal. Durante a fase pupal, os níveis de HJ são extremamente baixos e a pupa, estimulada por 20E se transforma em adulto (Sakagami, 1982; em Gilbert, 1994). Portanto, é um princípio central no desenvolvimento de insetos que picos de ecdisteróides na presença de HJ causem muda larval-larval, enquanto altos níveis de ecdisteróides na escassez de HJ levem à muda metamórfica (Sakagami, 1982).

Além do papel exercido no desenvolvimento de insetos, os ecdisteróides (conjuntamente com o HJ), desempenham um importante papel na regulação da síntese de vitelogenina, uma proteína da reprodução, incluindo *A. mellifera* (Bownes, 1994; Bitondi et al., 1996; Barchuk et al., 2002). Foi observado que altos níveis de ecdisteróides atrasam a transcrição de vitelogenina (Barchuk et al., 2002) sugerindo-se, então, que existe um duplo modo de ação dos ecdisteróides no CG de pupas, onde a vitelogenina (*vg*) é produzida. O primeiro em que a ecdisona pode inibir expressão de *vg*, como ocorre em *A. mellifera* e *Diatraea grandiosella*, nas quais sua síntese ocorre após a eclosão do adulto e

requer um pulso inicial de HJ, juntamente com o decréscimo dos níveis de ecdisteróides (Shu et al., 1997; Barchuk et al., 2002). O segundo modo de ação se dá em espécies que desenvolvem os ovários durante estágios larvais ou durante a transição larval/pupal, nele a expressão de *vg* é estimulada pelos hormônios, como mostrado em *Lymantria dispar* (Davis et al., 1990; Hiremath et al., 1992) e *Bombyx mori* (Ohnishi, 1987). O processo de melanização cuticular em *A. mellifera*, parece depender de títulos decrescentes de ecdisteróides (Zufelato et al., 2000), algo semelhante também ocorre com a expressão do gene da pro-fenoxidase (precursor da enzima que participa da síntese de melanina) que, apesar de ser observada durante todo o período pupal em abelhas, torna-se mais intensa no final deste período quando os títulos de ecdisteróides estão relativamente baixos e os títulos de HJ apresentam um discreto aumento (Rembold, 1987; Lourenço et al., 2004). Foi demonstrado também que níveis artificialmente aumentados de ecdisteróides atrasam o início da pigmentação cuticular em abelhas (Bitondi et al., 1998; Zufelato et al., 2000). No gene *AmAbd-1*, envolvido na síntese da cutícula larval, pupal e adulta, durante o ciclo de muda, após injeção de ecdisona, foi observado uma diminuição da expressão gênica (Soares, com. pessoal), sugerindo que este hormônio exerce regulação negativa sobre o gene. Apesar disso, o gene *Lac2*, responsável por melanização, esclerotização e diferenciação cuticular, mostrou ter sua transcrição aumentada de acordo com aumento nos títulos de ecdisteróides (Elias Neto, com. pessoal). Além do mais, a morte celular programada nas glândulas de seda anteriores de *Bombyx mori* (Sekimoto et al., 2006), no intestino e glândula salivar de *D. melanogaster* (Jiang et al., 1997) e parada na neurogênese das células Kenyon (neurônios presentes nos corpos cogumelares) em *A. mellifera* (Malun et al., 2003) são disparadas por um aumento nos títulos de ecdisteróides. Contrariamente, baixos níveis de ecdisteróides disparam a apoptose de neurônios tipo II em *M. sexta* (Schwartz & Truman, 1983) e em *D. melanogaster* (Robinow et al., 1993).

### 3.2 RECEPTORES NUCLEARES DE HORMÔNIOS

Receptores nucleares são fatores de transcrição ligante-dependentes responsáveis por controlar diferenciação, crescimento e desenvolvimento em eucariontes superiores (Grad et al. 2002; Patrick, et al. 2001). Eles fornecem aos organismos multicelulares um meio de controlar diretamente a expressão



gênica em resposta a uma grande variedade de estímulos de desenvolvimento, fisiológicos e ambientais, sinais hormonais que alteram a expressão gênica (Chawla et al., 2001), fenômeno conhecido por transdução de sinais. Sabe-se que a atividade dos receptores nucleares pode ser controlada através de pelo menos três mecanismos diferentes: 1) união a ligante lipofílico; 2) modificação covalente, geralmente por fosforilação regulada por eventos na membrana celular ou durante o ciclo celular; e 3) interações proteína-proteína, através de contato com outros fatores de transcrição (Giguère, 1999). Tal atividade é modulada pela ligação de proteínas adicionais, co-moduladores, que influenciam a potência de transativação (Kumar & Thompson, 2003) e de interações intramoleculares, que modificam funções dos domínios individuais dos receptores dentro da mesma molécula (Doesburg et al., 1997; Kumar et al., 1999).

Os receptores nucleares formam complexos homodiméricos e/ou heterodiméricos que reconhecem seqüências específicas no DNA, os elementos de resposta a hormônios, que estão dispersos pelo genoma e regulam a expressão de genes vizinhos em combinação com outros fatores de transcrição (Truss & Beato, 1993; Cherbas, 1993). Esses receptores formam a superfamília dos receptores nucleares (SRN), que incluem membros identificados apenas pela seqüência de DNA, para os quais ainda não foi identificado nenhum ligante, os denominados receptores “órfãos” (Tsai & O’Malley, 1994; Escriva et al., 1977). Os membros desta superfamília são caracterizados por dar origem a uma proteína que pode ser dividida em quatro ou cinco módulos independentes, mas funcionalmente interativos, conhecidos como domínios. Esses domínios são: o domínio modulador ou A/B, o domínio de união a DNA (DBD – *DNA-binding domain*) ou domínio C, o domínio D e o domínio de união a ligante (LBD – *ligand-binding domain*) ou domínio E. Em alguns receptores pertencentes à SRN, uma seqüência de proteínas se estende além do LBD na região C-terminal (Domínio F), mas ainda não se conhece sua função (Evans, 1988; Green & Chambon, 1988; Beato, 1989; Mangelsdorf et al. 1995; Giguère, 1999).

O domínio A/B apresenta a maior variabilidade entre os receptores, tanto em tamanho (número de nucleotídeos) quanto em seqüência. Geralmente esse domínio tem função de transativação, atuando sobre seus genes alvo mediante a interação com componentes do “core” da maquinaria de transcrição ou com co-ativadores (Mangelsdorf et al., 1995; Henrich et al., 1995). O DBD de receptores nucleares

é o domínio mais conservado. Ele é composto por dois *zinc fingers* do tipo C4 (que contém quatro cisteínas) contendo 66-70 resíduos de aminoácidos e uma extensão carboxi-terminal com aproximadamente 25 resíduos (Giguère, 1999). Ele apresenta subdomínios, um que confere reconhecimento de elementos de resposta a hormônios (ERHs), e especificidade a elas, o P-box (Umesono & Evans, 1989; Grad et al., 2002). O outro se encontra envolvido na dimerização, o D-box (Zechel et al. 1994; Perlmann et al., 1993; Mangelsdorf et al., 1995; Henrich et al., 1995). O domínio D tem como principal função unir o DBD ao LBD (Mangelsdorf et al., 1995; Henrich et al., 1995), mas também atua como localizador nuclear e/ou transativador (Mangelsdorf et al., 1995; Henrich et al., 1995). O domínio E é o domínio mais longo em número de nucleotídeos, ele é caracterizado por sua multifuncionalidade, pois está envolvido na dimerização, interação com proteínas de choque térmico, localização nuclear e transativação e tendo como sua principal função união a ligante (Billas et al., 2003).

### 3.3 O RECEPTOR DE ECDISONA - *EcR*

O receptor de ecdisona (EcR) apresenta a maioria dos critérios moleculares e biológicos que justificam sua identidade como o receptor de 20E em *Drosophila* (*DmEcR*). É dividido em domínios, possui blocos de aminoácidos conservados, ativa ou reprime a transcrição de genes (Koelle et al., 1991). O receptor de ecdisteróides funcional é, na verdade, um heterodímero composto pelo produto do gene *EcR* e pelo produto de um outro gene, também membro da SRN, o *usp* (*ultraspiracle*), um ortólogo do receptor de ácido retinóico (RXR) de vertebrados (Yao et al., 1992, 1993). Esse heterodímero se liga a ecdisteróides e a elementos de resposta a ecdisteróides (EcREs), presentes em regiões promotoras dos genes que respondem a esses hormônios, regulando sua expressão (Patrick et al., 2001; Palli et al., 2005).

Em *Drosophila*, *EcR* é induzido por ecdisona, promovendo um circuito auto-regulatório que aumenta os níveis da proteína receptora em resposta a esse ligante (Grebe et al., 2003; Lezzi et al., 2002). São observadas, neste inseto, três isoformas de *EcR*, *EcR-A*, *EcR-B1* e *EcR-B2* (Yao et al., 1993; Talbot, 1993), a existência dessas três isoformas explica parcialmente como um único hormônio

pode desencadear uma grande variedade de respostas tecido- e estágio-específicas, pois, foi mostrado que a expressão dessas três isoformas é diferencialmente regulada de acordo com o destino de estruturas larvais e adultas (Robinow et al., 1993; Truman et al., 1994). As três isoformas possuem 652 aminoácidos em comum, incluindo entre eles o DBD e o LBD, e diferem apenas em seus domínios A/B sugerindo que a região amino-terminal desempenha um papel crucial em mediar respostas isoforma-específicas (Kraus et al., 1995; Onate et al., 1998).

A seqüência de cDNA de *EcR* de *Drosophila* é dividida em seis éxons, cuja pauta de leitura (ORF) começa no segundo éxon, terminando no sexto. A organização íntron/éxon para a parte do gene *EcR* que codifica a região C difere daquela tipicamente encontrada na SRN, que é codificada por dois éxons, um para cada um dos motivos semelhantes a *zinc fingers* (Segraves et al., 1990), em *Drosophila* essa região é codificada por apenas um éxon (Koelle et al., 1991). Estudos de expressão revelaram que, em *Drosophila*, *EcR* mostra alguns picos de expressão importantes. Estes picos são observados durante a fase embrionária e no final de L3, sendo que após este estágio, a expressão se mantém relativamente alta durante PP até a metade do estágio pupal, depois da qual cai, mantendo estes níveis baixos até a emergência do adulto (Koelle et al., 1991). A proteína *EcR* é amplamente distribuída pelo organismo, em embriões, e em vários tecidos pré-pupais como discos imaginais, CG, traquéia, glândulas salivares, sistema nervoso central, intestino e células associadas com estruturas cuticulares (Koelle et al., 1991).

Receptores de ecdisteróides (*EcR*) foram caracterizados também em outros dípteros como *Chironomus tentans* (Imhof et al., 1993) e *Aedes aegypti* (Cho et al., 1995); em lepidópteros, *Manduca sexta* (Fujiwara et al., 1995, Jindra et al., 1996), *Bombyx mori* (Swevers et al., 1995), *Heliothis virescens* (Martinez et al., 1999) e em *Plodia interpunctella* (Siaussat et al., 2004) e também em crustáceos como *Amblyomma americanum* (Guo et al., 1997), entre outras espécies. Tais estudos revelaram alto nível de conservação dos domínios de ligação ao DNA (DBD) e ao ligante (LBD) do *EcR* entre tais espécies.

### 3.4 SOBRE O RECEPTOR DE ECDISONA DE *Apis mellifera*

Em *Apis mellifera*, o gene *usp* (*Amusp*), cuja proteína, em dípteros, forma o heterodímero com EcR mediando a ação dos ecdisteróides (Yao et al., 1992, 1993), está presente como uma cópia única que dá origem a transcritos diferentes por *splicing* alternativo, sendo que tais transcritos se expressam diferencialmente no corpo do animal. A seqüência da proteína de *Apis mellifera*, *Amusp* possui a típica organização protéica dos membros da SRN e, além disso, tem um alto nível de similaridade com USP de outros animais, sendo essa semelhança maior com seus ortólogos do grupo vertebrado-*Tenebrio-Locusta* que em relação ao *usp* do grupo Díptera/Lepidoptera. Tais características juntamente com o aumento de sua expressão induzida por HJ sugerem que algumas das funções de USP em *A. mellifera* podem depender de ligante (Barchuk et al., 2004).

Mas, apesar de conhecermos alguns aspectos da biologia de *usp* em *A. mellifera*, apenas a seqüência de cDNA, se conhece sobre o seu parceiro (*EcR*). Em *A. mellifera*, assim como na maioria dos insetos, os ecdisteróides exercem um importante papel coordenando as mudanças estruturais e fisiológicas que ocorrem durante o desenvolvimento pós-embriônico. Eles são responsáveis por iniciar a muda e a metamorfose, ativando ou inibindo a transcrição de genes relacionados a esses processos. Além disso, regulam a síntese de vitelogenina pelo CG, durante o desenvolvimento pupal, que é estimulada pelo HJ em presença de níveis baixos de ecdisteróides na hemolinfa (Barchuk et al., 2002). Níveis baixos de ecdisteróides influenciam também a apoptose de neurônios tipo II em *M. sexta* (Schwartz & Truman, 1983) e em *D. melanogaster* (Robinow et al., 1993), além do processo de melanização cuticular que em *A. mellifera* parece também depender de títulos decrescentes deste hormônio (Zufelato et al., 2000). Em contrapartida, níveis altos de ecdisteróides estão associados à morte celular programada nas glândulas de seda anteriores de *Bombyx mori* (Sekimoto et al., 2006), no intestino e glândula salivar de *D. melanogaster* (Jiang et al., 1997) e, ainda, interrupção na neurogênese de células Kenyon (neurônios presentes nos corpos cogumelares) em *A. mellifera* (Malun et al., 2003). Em *A. mellifera* o HJ exerce um importante papel na diferenciação de castas no que diz respeito a apoptose casta-específica de ovariolos (Schmidt Capella & Hartfelder, 1998, 2002)

Mas apesar disso, necessitamos conhecer a biologia e fisiologia do *EcR* em *Apis mellifera*, o que ajudaria numa melhor compreensão dos processos de desenvolvimento e diferenciação de castas deste inseto.

## **OBJETIVOS**

---

- Determinar a organização gênica do *EcR* de *Apis mellifera*;
- Avaliar a eventual presença de mais de um transcrito que dá origem a diferentes isoformas, e estimar seu(s) tamanho(s);
- Determinar o perfil de expressão de *EcR* no desenvolvimento pós-embrionário das castas de abelhas;
- Avaliar sua participação nos processos de desenvolvimento e de diferenciação de castas mediante estudos de expressão em corpo gorduroso;
- Avaliar a interação do hormônio com seu receptor, através de aumento artificial nos níveis endógenos de hormônios.

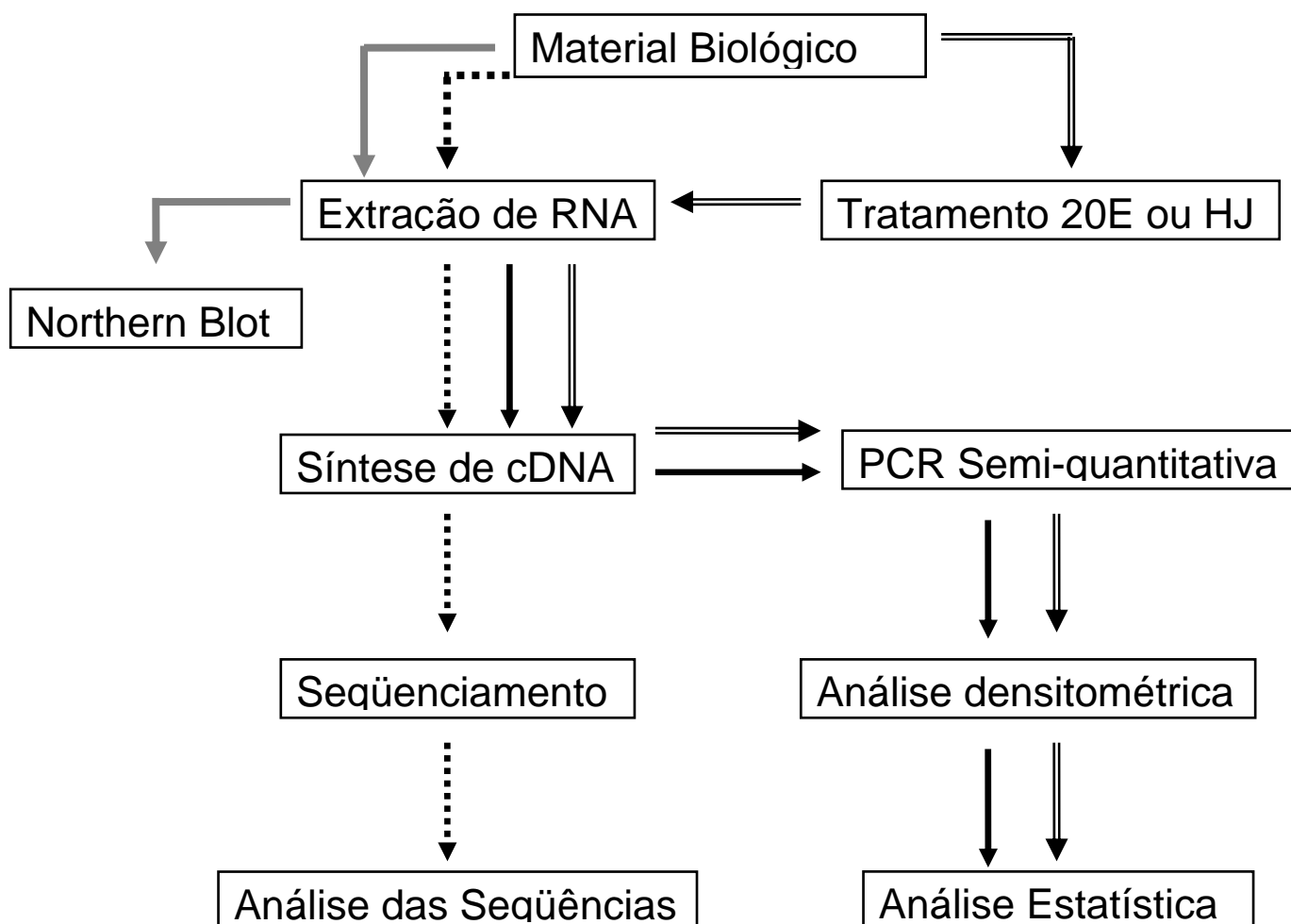
# **MATERIAL E MÉTODOS**

---



## 5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico utilizado para o desenvolvimento deste trabalho, operárias e rainhas de *Apis mellifera* em diferentes estágios de desenvolvimento pós-embrionário, foi coletado no Apiário do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. As rainhas foram obtidas através de postura controlada e transferência de larvas para real eiras artificiais, que foram colocadas nas colônias para que fossem alimentadas e se desenvolvessem em condições apropriadas até atingirem a fase de interesse, segundo método tradicionalmente utilizado. As operárias foram obtidas de posturas planejadas que se desenvolveram em colônias experimentais. O esquema que segue apresenta o fluxo experimental de nosso trabalho (Figura 1).



**FIGURA 1:** Fluxograma demonstrando os métodos e a seqüência nas quais foram utilizados. Setas cinza indicam de experimentos utilizados para o Northern Blot. Setas pontilhadas indicam os experimentos realizados para seqüenciamento do cDNA de *EcR*. Setas vazadas indicam experimentos realizados para análise de expressão do gene após tratamento com hormônios. Setas pretas indicam experimentos utilizados para análise de expressão durante as fases de desenvolvimento de *A. mellifera*.

## 5.2 ANÁLISE *IN SILICO* DA ORGANIZAÇÃO DO *EcR*

A versão 4.0 do genoma de *A. mellifera* (<http://zulu.fmrp.usp.br/beelab>), bastante completa e com seqüências codificadoras preditas (*Official Set*) já está disponível no site <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>. A partir desta disponibilização tornou-se desnecessário o seqüenciamento do DNA genômico da maioria dos genes estudados no momento. Assim, neste trabalho, apenas um fragmento do cDNA de *EcR* foi seqüenciado para validação do gene predito. Os procedimentos para anotação do gene *EcR* se basearam em uma EST (*Expressed Sequence Tag*) depositada no GenBank (AB095514) por Takeuchi et al. (2003) sobre a qual desenhamos seqüências iniciadoras que foram utilizadas em reações de PCR. Os fragmentos produzidos foram seqüenciados e comparados com a base de dados de genes preditos (*Official Set*). A anotação do gene foi feita mediante a utilização do programa *Artemis* (Sanger Institute <http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>), uma ferramenta que permite a visualização de características gênicas, realização de alinhamentos, análises e anotação de seqüências de DNA. Outras ferramentas que auxiliaram na anotação do gene foram utilizadas, como BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para análises das seqüências, ClustalW (<http://align.genome.jp/>) para alinhamento das seqüências e JustBio e Expasy (<http://www.justbio.com> ; <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) para tradução, em aminoácidos, da seqüência de nucleotídeos.

## 5.3 TRATAMENTO COM ECDISONA E HORMÔNIO JUVENIL

Com o objetivo de avaliar a resposta de *EcR* a ecdisona (20E) e hormônio juvenil (HJ-III), para determinar a interação de 20E com seu receptor e sua possível regulação positiva por este hormônio, além da possível regulação indireta de HJ na expressão de *EcR*, pelo fato de *usp*, seu parceiro no receptor, ser ligante deste hormônio, foram feitos, separadamente, experimentos de aplicação desses hormônios em pupas de olho marrom, corpo não pigmentado (Pb) e posteriormente testada sua expressão no corpo gorduroso destes indivíduos. O corpo gorduroso é o órgão responsável pela síntese de vitelogenina (*vg*), a principal proteína da reprodução em insetos, cuja expressão em abelhas se inicia quando os títulos de ecdisteróides estão relativamente baixos e os títulos de HJ estão aumentando (Barchuk et al., 2002). Por este motivo a fase Pb foi escolhida, nela as concentrações de

ecdisona começam a cair continuamente, após um pico elevado (ver Fig. 11) e os títulos de HJ, relativamente baixos, começarão a aumentar em Pbm. Assim procedendo, poderíamos verificar se ação hormonal de 20E continuaria com a aplicação de dose exógena mesmo após a queda do hormônio e também o comportamento em relação ao HJ. Neste caso as pupas receberam uma injeção contendo 5µg de 20E, a forma ativa deste hormônio em abelhas, diluída em 2µl de etanol+ringer. As pupas que tratadas com HJ receberam 10µg de HJ-III, a forma encontrada em himenópteros, diluído em 2µl de acetona. As quantidades de hormônios utilizadas (5µg de 20E e 10µg de HJ) foram determinadas com base em experimentos realizados anteriormente por Barchuk et al. (2004). Os grupos controles receberam apenas os respectivos solventes. Pelo menos três grupos, consistindo de aproximadamente sete indivíduos cada um, quando se tratavam de operárias e dois indivíduos, quando eram rainhas, foram usados em cada experimento.

Todos os grupos, controles e tratados, eram mantidos em estufa (34°C, 80% de umidade relativa) por 1, 12, 24 e 48 horas após os tratamentos. É interessante ressaltar que cada um desses experimentos (1h, 12h, 24h e 48h) foi feito independentemente, pois não era nosso objetivo avaliar a duração da resposta gênica ao aumento artificial de hormônios endógenos, mas sim quão rápida ou lenta seria essa resposta. Para a coleta do corpo gorduroso era feita uma incisão longitudinal no abdômen das pupas, que em seguida eram colocadas em placas de cultivo contendo solução salina (0,9%) e agitadas dentro dessa solução para que o seu corpo gorduroso (CG) se dispersasse nela. Em seguida essa solução contendo o CG de pupas de operárias ou de rainhas era colocada em tubos de 2ml e submetida a uma centrifugação leve (3000 rpm – 1 minuto) para que o pellet de CG formado fosse utilizado para extração do RNA e para posterior RT-PCR semi-quantitativa.

#### **5.4 EXTRAÇÃO DE RNA**

O RNA total das amostras de CG de pupas tratadas com 20E e HJ e de indivíduos inteiros nas diversas fases do desenvolvimento, para determinação do perfil de expressão do gene em estudo e para o Northern Blot, foi extraído pelo TRIzol (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina, Invitrogen) segundo protocolo fornecido pelo fabricante.

## 5.5 NORTHERN BLOT

Como *EcR*, na maioria das espécies, dá origem a mais de um transcrito, foi feito um experimento de Northern Blot, para investigar a ocorrência de múltiplas formas também em abelhas. Esse experimento não foi realizado com a intenção de se avaliar os níveis de expressão do gene, mas sim verificar a possível presença mais de um transcrito de *EcR* na espécie estudada e também para estimar o tamanho do(s) transcrito(s) presente(s). O Northern Blot foi feito no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos, que tem como responsável a Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi, a quem agradeço a permissão para o uso do laboratório de radioisótopos.

### 5.5.1 PREPARAÇÃO DA MEMBRANA

Para tal experimento foram utilizadas amostras de RNA de pré-pupas (PP1) e pupas de olho marrom (Pb) de rainhas e operárias. Estas fases foram utilizadas por serem elas as de maiores níveis de expressão de *EcR* de acordo com o perfil determinado para operárias (ver Fig. 10). Foram utilizados aproximadamente 15µg de RNA total de cada amostra (não foi necessário utilizar quantidades exatamente iguais das amostras, pois a finalidade do experimento não era avaliar expressão e sim número e tamanho de transcritos presentes). A elas foi adicionado front (tampão) para RNA<sup>1</sup> na razão de 1:1 e esta mistura foi incubada a 65°C e depois mantida no gelo por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5%<sup>2</sup> (15X20cm, já adicionado de brometo de etídio) submerso em MOPS 1X<sup>3</sup>, e submetidas à eletroforese, por 4 horas e 80V de corrente constante. Após a eletroforese, o gel foi fotografado e incubado durante 20 minutos em NaOH 50mM. Em seguida, esse gel foi lavado com água DEPC e depois incubado por 45 minutos em SSC 20X. Todos esses procedimentos foram realizados em temperatura ambiente e sob leve agitação, em seguida foi feita a transferência à vácuo para membrana de polivinilideno (de aproximadamente 10X15cm) no aparelho

<sup>1</sup> Front para RNA: 930µl de água DEPC; 150µl de MOPS 10X; 240µl de formamida; 100µl de glicerol; 80µl de bromofenol e 5µl de brometo de etídio.

<sup>2</sup> Gel de agarose 1,5%: 40ml de formaldeído; 3,0g de agarose fundida em 120ml de água DEPC; 40ml de tampão MOPS 5X.

<sup>3</sup> MOPS 1X (p/ 500ml): 50ml MOPS 10X, 450ml água DEPC. (MOPS 10X (p/ 250ml): 10,46g MOPS, 1,025g acetato de sódio, 5ml EDTA – 0,5M, pH 8 – completar com água DEPC e acertar pH para 7 com NaOH)

VacuGene XL Vacuum Blotting System (GE Healthcare formerly Amersham Biosciences). Após aproximadamente 16 horas, o gel foi exposto rapidamente à luz UV no Mighty Bright (Mod. UVVIS-20, Hoefer Scientific Instruments) para verificar se não restavam amostras que não transferiram. Em seguida a membrana foi seca em papel de filtro e exposta a UV por 2 minutos de cada lado para fixar as amostras a ela e, posteriormente, foi incubada a 80°C por 10 minutos em forno Memmert (Uniscience). Esta membrana foi armazenada em envelope feito com papel de filtro e ao abrigo de umidade até sua utilização.

### 5.5.2 PREPARAÇÃO E MARCAÇÃO DA SONDA

Para preparação da sonda de DNA que hibridou com as amostras presentes na membrana, foi feita uma PCR utilizando-se os *primers* Kubo F/R (Tabela 1). Esses *primers* amplificam um fragmento de aproximadamente 160pb, que compreende parte do DBD (domínio C, de união a DNA) de *EcR*. O produto da PCR foi aplicado em um gel, purificado com o Kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega cat.# A9280, lot.# 156022), sua concentração foi medida e após isso ele foi armazenado a -20°C até sua marcação e posterior utilização nos experimentos de hibridação.

A sonda foi marcada com isótopos radiativos. Para isto foram utilizados os Kits Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen, cat. # 18187-013) e Redivue <sup>32</sup>P-, <sup>33</sup>P- Nucleotides. O volume final de sonda utilizado é 20µl, contendo 300ng de DNA radioativamente marcado.

### 5.5.3 PARA HIBRIDAÇÃO

A membrana umedecida em SSC 2X foi colocada no frasco de hibridação, onde, em seguida foram colocados 500ml de solução de pré-hibridação<sup>4</sup> aquecida a 42°C. O frasco com a membrana e a solução foi mantido em forno de hibridação a 42°C overnight. Após este período foram adicionados 20µl da sonda (15ng/µl) marcada radioativamente e o frasco foi colocado novamente no forno de hibridação (Mini Oven MKII – Hybaid) mantido a 42°C por 3 horas, após as quais a membrana foi submetida à lavagem. Essa lavagem foi feita com 500ml de tampão de lavagem (SSC 0,1X/ 0,1%

---

<sup>4</sup> Solução de Pré-hibridação (Church Buffer - p/ 500ml): 450ml de água MilliQ, 1ml EDTA (0,5M); 17,745g NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,25M); 1ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%); 5g casaminoácidos (1% caseína hidrolisada); 35g de SDS (SDS 7%), completar para 500ml com água MilliQ.

SDS) pré-aquecido (42°C) durante 5 minutos. A presença de marcação radioativa foi verificada com um contador Geiger (mod. 3007A - Dosimeter Corporation 973-887-7100) e em seguida repetiu-se a lavagem por mais 15 minutos. Posteriormente a membrana marcada foi colocada em contato com um *screen* (Super Sensitive Type: ST, tamanho 12,5x19,2cm; PPN 7001482; PerkinElmer®) e posta dentro de um K-7 (Sigma Chemical Company) por 4-24 horas. Após isso o *screen* foi revelado no Cyclone™ Storage Phosphor System (Perkin Elmer®).

## 5.6 SÍNTESE DE cDNA

Tanto para os experimentos de amplificação do cDNA para posterior clonagem, quanto para as PCR semi-quantitativas, os RNAs totais foram tratados com DNase e posteriormente submetidos à transcrição reversa (RT) usando-se o sistema SuperScript II (Cat. 18064-014, Gibco Brl) e Oligo (dT<sub>12-18</sub>) (Cat. 18418-012, Invitrogen) como *primer*, para síntese da fita simples de cDNA.

## 5.7 AMPLIFICAÇÃO POR PCR

As amplificações do cDNA de *EcR* de *Apis mellifera*, utilizando-se *primers* específicos, foram feitas misturando-se 1µl de *primer* forward (10µM); 1µl de *primer* reverse (10µM); 1µl de cDNA (obtido segundo seção anterior); 12µl água destilada estéril; 10µl de Eppendorf MasterMix (2,5X) (Lot. NN 150A), em um tubo de 200µl. Em seguida essa mistura foi submetida a (\*): 94°C por 2 minutos; 94°C por 30 segundos; X°C (esta temperatura varia de acordo com a seqüência dos *primers*, ver Tabela 1) por 30 segundos; 72°C por 40 segundos; por 45 ciclos e 72°C por 10 minutos. (\*) As amplificações foram feitas no GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems.

O produto destas amplificações foi analisado em géis de agarose 1%, as bandas obtidas foram recortadas e o DNA foi recuperado usando-se QIAquick Gel Extraction Kit (Cat. 28706, QIAGEN).

## 5.8 CLONAGEM DO cDNA

### 5.8.1 LIGAÇÃO DO FRAGMENTO AO VETOR OU CLONAGEM

Os fragmentos de cDNA amplificados e recuperados dos géis de agarose foram inseridos no plasmídeo que acompanha o Kit Invitrogen 45-0641 Topo TA Cloning® Kit (PCR® 2.1-TOPO®

Vector, Cat. K4500-01, Lot. 602 458). Para isso foram utilizados 4µl do produto da PCR; 1µl de solução salina (tampão de ligação); 0,7µl da solução que contém o vetor; 0,3µl de água destilada estéril. Esta mistura foi posteriormente incubada à temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ) por 30 minutos.

### 5.8.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Para a transformação bacteriana foram utilizados os 6µl de solução plasmidial, obtidos no item anterior. A solução plasmidial foi colocada em um tubo de 1,5ml, contendo aproximadamente 1ml de suspensão bacteriana (células competentes) e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, a suspensão foi submetida a  $42^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos sendo resfriada imediatamente em gelo e permanecendo nele por mais 2 minutos. Depois disso, foram adicionados 250µl de meio líquido (LB) e o conjunto foi incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação orbital (160rpm). Após 1 hora de incubação, a suspensão foi retirada da estufa e centrifugada para que se formasse um precipitado e o excesso de meio fosse descartado ( $\cong 100\mu\text{l}$  de meio). Após isso o precipitado foi ressuspenso com o restante do meio e então essa suspensão foi usada para semear uma placa de Petri contendo 20ml de meio sólido com 4µl de X-Gal, 40µl de IPTG e 10µl ampilicina, para seleção blue/white. As placas foram mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 16 horas depois foram levadas à geladeira ( $\sim 4^{\circ}\text{C}$ ) para que as colônias azuis se destacassem.

As colônias brancas, que continham o inserto, foram inoculadas em tubos de 15ml contendo 5ml de meio líquido com antibiótico (LB + Ampicilina) e estes foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$ , sob agitação orbital (160rpm), *overnight*. Após isso, através de repetidas centrifugações ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ , 3000 rpm por 1 minuto) em tubo de 2ml, as células foram recuperadas, e delas foi extraído o DNA plasmidial, nas mini-preparações, usando-se o kit QIA Prep. Spin Miniprep Kit (250) (Cat.27.106, Lot. 10.927.717) seguindo-se as orientações do fabricante.

### 5.8.3 DIGESTÃO

O produto das mini-preparações foi submetido à digestão enzimática com EcoR-I para extração do inserto. Posteriormente, os produtos da digestão foram separados em géis de agarose 1% e visualizados sob luz ultravioleta, para localização dos clones que continham o fragmento gênico de interesse.

## 5.9 SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS

O seqüenciamento foi feito pelo método Sanger (1977) com DNA dupla fita marcado com fluorescência usando-se o kit BigDye Terminator v3 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems). Para marcação do DNA foi usada reação de PCR e para seqüenciamento o aparelho ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Ambas as fitas foram seqüenciadas usando-se os *primers* universais M13-F (5'– CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT –3') e M13-R (5'– CAG GAA ACA GCT ATG AC –3').

Os cromatogramas gerados pelo seqüenciador foram interpretados pelo programa Sequencing Analysis v3 4.1 e convertidos em seqüências de DNA do tipo FASTA. Essas seqüências foram traduzidas em aminoácidos (<http://www.justbio.com> e <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>). As seqüências deduzidas de aminoácidos foram analisadas usando o programa BLAST, do banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para obtenção da seqüência genômica, correspondente ao fragmento amplificado, foram feitas análises comparativas consultando o banco de dados do genoma de *Apis mellifera* (<http://zulu.fmrp.usp.br/beelab>). Esta análise permitiu descrever, por meio de ferramentas informáticas (Artemis), a estrutura do gene *EcR* de *A. mellifera*. Com a seqüência completa correspondente foram feitos alinhamentos e construções filogenéticas com ajuda do programa ClustalW (<http://align.genome.jp/>) e MEGA versão 3.1 (Kumar et al., 2004), respectivamente.

## 5.10 RT-PCR SEMI-QUANTITATIVA PARA OS ESTUDOS DE EXPRESSÃO

Para a determinação do perfil de expressão de *EcR* foi utilizado RNA de abelhas em diferentes fases do desenvolvimento, de embriões até adultas de 10 dias de idade (Tabela 2). Para determinação de alterações na expressão de *EcR* em resposta a um aumento artificial na concentração de hormônios, foi utilizado RNA de corpo gorduroso (CG) de pupas de olho marrom (Pb) tratadas separadamente com ecdisona (20E) e hormônio juvenil (HJ). O RNA extraído foi quantificado por 2 ou 3 vezes, sendo 2µg foi utilizados para síntese do cDNA (transcrição reversa) para as subseqüentes análises de expressão por PCR semi-quantitativa.

A realização dos experimentos de PCR semi-quantitativa requer a determinação do número de ciclos de amplificação que se corresponda a um aumento linear na quantidade de produto, o qual pode ser avaliado pela visualização num gel de agarose corado com brometo de etídio (tomando amostras de diferentes números



de ciclos). De acordo com os experimentos realizados, o número de ciclos a ser utilizados com o par de *primers* Kubo-F/R (Tabela 1) é 38. A PCR semi-quantitativa requer também a amplificação controle de um RNA, de preferência, presente em proporções relativamente constantes durante o desenvolvimento. Em nosso caso, utilizamos o RNA codificador de RP-49 (sub-clonado e seqüenciado em nosso Laboratório, GenBank AF441189) para normalização do perfil de expressão em operárias e RNA codificador de  $\beta$ -actina (GenBank BAA74592) para normalização dos grupos tratados com hormônios (rainhas e operárias), bem como do perfil de expressão de rainhas. Para a amplificação do cDNA das amostras, foram adicionados em tubos de 200 $\mu$ l; 1 $\mu$ l de *forward primer* (Kubo-F – tabela 1; 10 $\mu$ M); 1 $\mu$ l de cDNA (obtido segundo detalhado em seção anterior); 1 $\mu$ l de *reverse primer* (Kubo-R – tabela 1; 10 $\mu$ M); 12 $\mu$ l água destilada estéril; 10 $\mu$ l de MasterMix (2,5X; Eppendorf, Cat.0032.002.250); 12 $\mu$ l água destilada estéril e submetidos a: 94°C por 2 minutos; em seguida 38 ciclos a 94°C por 30 segundos; 58°C (temperatura ideal de anelamento para o par de *primers* utilizado, Kubo-F/R Tabela 1) por 1 minuto ; 72°C por 40 segundos, e depois as amostras foram submetidas a 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em géis de agarose (1%, com brometo de etídio). Após eletroforese, os géis foram fotografados e submetidos à análise densitométrica pelo programa analisador de imagens (Kodak 1D 3.6). Os resultados obtidos para *EcR* foram normalizados pelos resultados obtido para RP-49 e para  $\beta$ -Actina. Com o auxílio do programa Excel, foram construídos gráficos representando o perfil de expressão de *EcR* nas diversas fases do desenvolvimento estudadas para rainhas e operárias, e gráficos comparando tratamento e controle, para 20E e para HJ nos diferentes tempos aos quais as amostras foram submetidas. Os resultados obtidos para controle e tratamento com ambos os hormônios foram analisados estatisticamente com o programa SigmaStat 2.0, e utilizados na construção de gráficos comparativos através dos Programas Sigma Plot e Excel.

**TABELA 1:** *Primers* utilizados para amplificação do fragmento de *EcR* utilizado para anotação do gene e determinação do Perfil de Expressão e modulação da expressão de *EcR* pelos hormônios (através de RT-PCR) mostrando suas seqüências de nucleotídeos e a temperatura ideal a ser usada na PCR.

NOME DO PRIMER	SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS	TEMPERATURA (°C)
Kubo-F (forward)	5'- GGT CTA TCA GTG TAA ATA CG -	56
Kubo-R (reverse)	5'- CTG GGC CTT TTT CTC CTT C - 3'	58
EcR-F (forward)	5' – ATG GAC ACC AGC GAC TCC – 3'	58
EcR-R (reverse)	5' – CTA GGG TGT CAC GTC CCA – 3'	58

**TABELA 2:** Fases do desenvolvimento utilizadas para a determinação do perfil de expressão de *EcR* e abreviaturas dos seus nomes utilizadas nas figuras 10, 11, 12 e 13.

<b>FASES DO DESENVOLVIMENTO</b>	<b>ABREVIATURA</b>
Embrião	Emb
1º instar larval	L1
2º instar larval	L2
3º instar larval	L3
4º instar larval	L4
5º instar larval fase de alimentação 1	F1
5º instar larval fase de alimentação 2	F2
5º instar larval fase de alimentação 3	F3
5º instar larval fase de tecelagem do casulo 1	S1
5º instar larval fase de tecelagem do casulo 2	S2
5º instar larval fase de tecelagem do casulo 3	S3
Pré-pupa 1	PP1
Pré-pupa 2	PP2
Pré-pupa 3	PP3
Pupa de olho branco	Pw
Pupa de olho rosa	Pp
Pupa de olho rosa escuro	Pdp
Pupa de olho marrom sem pigmentação na cutícula	Pb
Pupa de olho marrom com pigmentação leve na cutícula	Pbl
Pupa de olho marrom com pigmentação mediana na cutícula	Pbm
Pupa de olho marrom com forte pigmentação na cutícula	Pbd
Recém nascida	RN
Adulto com 5 dias após emergência	5d
Adulto com 10 dias após emergência	10d

## **RESULTADOS**

---

## 6.1 A SEQÜÊNCIA DE cDNA DO *EcR*

Usando-se o par de *primers* Kubo-F/ *EcR*-R (tabela 1), desenhados com base na seqüência de *EcR* depositada nos bancos de dados por Takeuchi et al. (2003, não publicado, GenBank AB095514) (*primer* Kubo – Tabela 1), bem como na seqüência predita pelo programa *GNOMON* (contendo 2608 nucleotídeos; *primer* *EcR* – Tabela 1) foi possível amplificar, clonar e seqüenciar um fragmento de 825 nucleotídeos correspondente ao cDNA do *EcR* de *Apis mellifera*. Através de análises comparativas foi identificada uma pauta de leitura para 275 aminoácidos, dos 869 preditos no *Official Set* que, apesar de incompleta, contém alguns dos domínios característicos dos receptores nucleares. O fragmento seqüenciado contém parte do DBD (*DNA-Binding Domain*), sendo que o *Znf2* (*Zinc-finger* 2) e o D-box, localizados dentro deste domínio, estão completos. Além disso, o domínio D também foi seqüenciado por completo, juntamente com parte do LBD (*Ligand-Binding Domain*). De posse destes resultados e comparando-se a seqüência obtida com o genoma de *A. mellifera* (disponível no banco de dados <http://zulu.fmrp.usp.br/beelab>), foi verificado que tal fragmento corresponde ao gene *EcR* (*e value*  $2e^{-95}$ ), incluído no Grupo8.26/GB15434, um gene pertencente a superfamília dos receptores nucleares (SRN), cujos membros se caracterizam por conter módulos independentes (os domínios), mas funcionalmente complementares.

Com o auxílio desta seqüência e dos resultados do BLAST, foi feita uma anotação *in silico* de *EcR* no genoma de *Apis mellifera*, e desta forma foi obtida sua seqüência completa de nucleotídeos e também de aminoácidos deduzida (Fig. 2). Pôde-se observar, além disto, que o gene está organizado em 4 éxons (3 íntrons; Fig. 3) localizados entre os nucleotídeos 134.463 e 137.071 do grupo 8.26 no genoma da abelha. Na seqüência deduzida de aminoácidos, que contém 462 aminoácidos, nota-se a presença dos domínios característicos dos membros da SRN, sendo eles o A/B, C ou DBD, D, E ou LBD e o F. O domínio A/B, o DBD e a parte inicial do domínio D (22 aminoácidos) estão localizados no primeiro éxon. O segundo éxon contém a parte final do domínio D (71 aminoácidos) e a inicial do LBD (16 aminoácidos). No terceiro éxon se localiza uma região mediana do LBD (125 aminoácidos), sendo o restante deste domínio (78 aminoácidos) localizado no quarto éxon, juntamente com o domínio F (Fig. 3). Em alguns dos domínios foram observados resíduos de aminoácidos e regiões

conservadas (Fig. 2). No domínio A/B, observou-se uma região de baixa complexidade contendo 37 glicinas (G) contínuas, cuja função é ainda desconhecida, e no DBD foram encontrados dois *zinc fingers* que contêm também regiões conservadas denominadas P-box e D-box (Fig. 2).

```

1 - ATGTTGAACGTGTTGTTCGGCAGGTAGGGACGAGTTGTTCGCAGCCTGGCTCTTTGAACGGG - 60
1 - M L N V L S A G R D E L S Q P G S L N G - 20
61 - TATGGGAGCAGCGGAGGCGGAGGCGGCGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGCGGCGGCGGCGGA - 120
21 - Y G S S G G G G G G G G G G G G G G G G - 40
121 - GGCGGAGGCGGCGGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGTGGTGGAGGAGGA - 180
41 - G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G - 60
181 - GGCAGCGACGGGTGCGACGCGAGGAAGAAGAAGGGACCGACCCCGAGGCAGCAGGAGGAG - 240
61 - G S D G C D A R K K K G P T P R Q Q E E - 80
241 - CTGTGCCTGGTCTGCGGGATCGCGCCTCCGGTTACCACTACAACGCGCTCACGTGCGAG - 300
81 - L C L V C G D R A S G Y H Y N A L T C E - 100
301 - GGGTGCAAAGGTTTCTTCCGGCGGAGCATCACTAAGAACGCGGTCTATCAGTGTAATAC - 360
101 - G C K G F F R R S I T K N A V Y Q C K Y - 120
361 - GGAACAATTGCGAGATCGACATGTACATGAGGCGCAAGTGTGAGGAGTGCAGGTTGAAG - 420
121 - G N N C E I D M Y M R R K C Q E C R L K - 140
421 - AAGTGTGTTGACGGTTCGGGATGAGGCCGAGTGCCTGGTGCCTGCGCCGATACAGTGC - 480
141 - K C L T V G M R P E C V V P E Y Q C A V - 160
481 - AAGCGGAAGGAGAAGAAGGCGCAAAGGAGAAGGACAAGCCGACAGTACAACGATGAAC - 540
161 - K R K E K K A Q K E K D K P N S T T M N - 180
541 - GGGTCCCGGGCAGCGGCGGTATACGGAGCGATCAGATGGGGGTGAAGATCGAGCCGGCC - 600
181 - G S P G S G G I R S D Q M G V K I E P A - 200
601 - GAGGCGGAGTCGTTGTCCACGTCCGGGAGCAGCGGATCCTCAGCCTGTGAGCCCTTAC - 660
201 - E A E S L S T S G S S G I L T P V S P Y - 220
661 - GGCTACGTGAAACCGATCAGCCCCGAGCAGGAGGAATTGATACACAGGCTCGTCTACTTC - 720
221 - G Y V K P I S P E Q E E L I H R L V Y F - 240
721 - CAGAACGAGTACGAGCAACCGAGCGAGGAGGATCTCAAGAGGATCACGAATCAGCCCTCG - 780
241 - Q N E Y E Q P S E E D L K R I T N Q P S - 260
781 - GAGGGAGAGGACATCAGTGATTACAAGTTCAGGCACATAACCGAGATCACGATCCTCAG - 840
261 - E G E D I S D Y K F R H I T E I T I L T - 280
841 - GTCCAATTGATCGTGAATTCTCGAAGAGATTGCCAGGCTTCGACGAGCTGATGCGGGAG - 900
281 - V Q L I V E F S K R L P G F D E L M R E - 300
901 - GATCAGATCGCTCTGCTCAAGCCTGCTCCAGCGAGGTGATGATGCTTCGAATGGCGAGG - 960
301 - D Q I A L L K A C S S E V M M L R M A R - 320

```

```

961 - AAGTACGACGTGCAGACGGACAGCATAATATTCGCCAATAATCAGCCTTACACGAAGGAC - 1020
321 - K Y D V Q T D S I I F A N N Q P Y T K D - 340
1021 - AGCTATACCGTGGCGGGTATGGGCGAGACGATCGAGGATTTGCTACATTTCTGCCGGCAG - 1080
341 - S Y T V A G M G E T I E D L L H F C R Q - 360
1081 - ATGTACGCCATGAAGGTGAACAACGCCGAGTACGCGTTGTTGACCGCCATCGTCATATTC - 1140
361 - M Y A M K V N N A E Y A L L T A I V I F - 380
1141 - TCAGAGAGGCCGAACCTGCTCGAGGGCTGGAAGGTGGAGAAGATTTCAGGAGATCTATCTG - 1200
381 - S E R P N L L E G W K V E K I Q E I Y L - 400
1201 - GAGGCGTTGAGGGCGTACGTGGACAACAGGCGCAGACCGAATCCGGGCACGGTTTTTCGCC - 1260
401 - E A L R A Y V D N R R R P N P G T V F A - 420
1261 - AGATTGCTGTCCGTGTGACCGAGCTGCGGACCTCGGCAACCAGAACAGCGAGATGTGC - 1320
421 - R L L S V L T E L R T L G N Q N S E M C - 440
1321 - TTCAGCCTCAAGTTCAAGAACAAAAAGCTGCCAGTTTTCCTCGCCGAGATCTGGGACGTG - 1380
441 - F S L K F K N K K L P V F L A E I W D V - 460
1381 - ACACCCTAG - 1389
461 - T P * X - 480

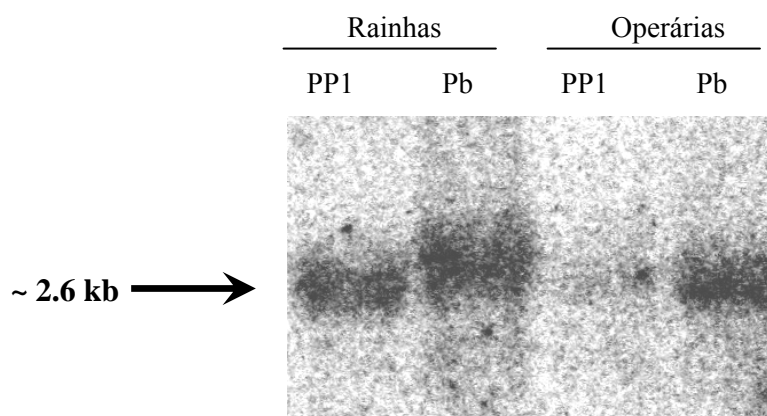
```

**FIGURA 2:** Seqüência completa de nucleotídeos e seqüência deduzida de aminoácidos de *EcR* de *Apis mellifera* obtida no banco de dados pela anotação manual feita com base no fragmento de cDNA seqüenciado neste trabalho. Em destaque na seqüência de aminoácidos estão os domínios característicos de receptores nucleares. Domínio A/B: em negrito; Região de baixa complexidade, composta por 37 Glicinas (G), dentro do domínio A/B: grifado em cinza; DBD: letra normal, contendo *Zinc finger* 1: sublinhado e *Zinc finger* 2: duplamente sublinhado; P-box: grifado em verde, dentro do *Zinc finger* 1 e D-box: grifado em amarelo, dentro do *Zinc finger* 2; Domínio D: em itálico; LBD: sublinhado pontilhado; domínio F: em vermelho após o LBD.



**FIGURA 3:** Desenho esquemático de *EcR* com base na seqüência completa, representando a organização do gene. E1, E2, E3 e E4: éxons 1, 2, 3 e 4; I1, I2 e I3: íntrons 1, 2 e 3. Números entre parênteses: tamanho dos éxons e íntrons em número de nucleotídeos. Box azul claro: domínio A/B, box azul escuro: domínio C (DBD), boxes pretos: domínio D, boxes brancos: domínio E (LBD) e box vermelho: domínio F. Os boxes estão proporcionalmente distribuídos de acordo com o número de aminoácidos que os compõem.

Visando avaliar a eventual presença de diferentes transcritos e seu(s) tamanho(s) foi feito um Northern Blot, através do qual foi obtida a membrana hibridada com sonda específica para *EcR* de *Apis mellifera*. Esta sonda, de acordo com sua seqüência, deveria hibridar com uma região comum à maioria das isoformas já descritas, uma região do domínio C (DBD) que, de acordo com a literatura disponível, é um domínio conservado nas diferentes isoformas já estudadas (Talbot et al., 1993). O resultado deste experimento sugere a existência de apenas um transcrito para *EcR* em fêmeas *A. mellifera*, um gene presente como cópia única no genoma desta espécie. Tanto as amostras de rainhas (PP1 e Pb) como as de operárias (PP1 e Pb) mostram apenas uma banda resultante da hibridação (Fig. 4), no tamanho aproximado de 2.6kb, conforme o esperado. Este número aproximado de nucleotídeos esperados foi predito no genoma e confirmado através do marcador utilizado no gel que foi transferido para a membrana. O tamanho identificado pela análise *in silico* do cDNA (orf) de *EcR* é de 1389 nucleotídeos, que corresponde apenas às regiões codificadoras (éxons). O tamanho total esperado para o gene engloba não somente as regiões codificadoras, mas também as regiões não traduzidas do gene, os íntrons.



**FIGURA 4:** Northern Blot mostrando uma banda após hibridação com sonda radioativa correspondente a um fragmento do cDNA de *EcR* que inclui o DBD. PP1 (pré-pupa 1) e Pb (pupa de olho marrom, sem pigmentação no corpo). *EcR* parece dar origem a apenas um transcrito em fêmeas *Apis mellifera*. Seta indica o tamanho molecular aproximado das bandas obtidas.

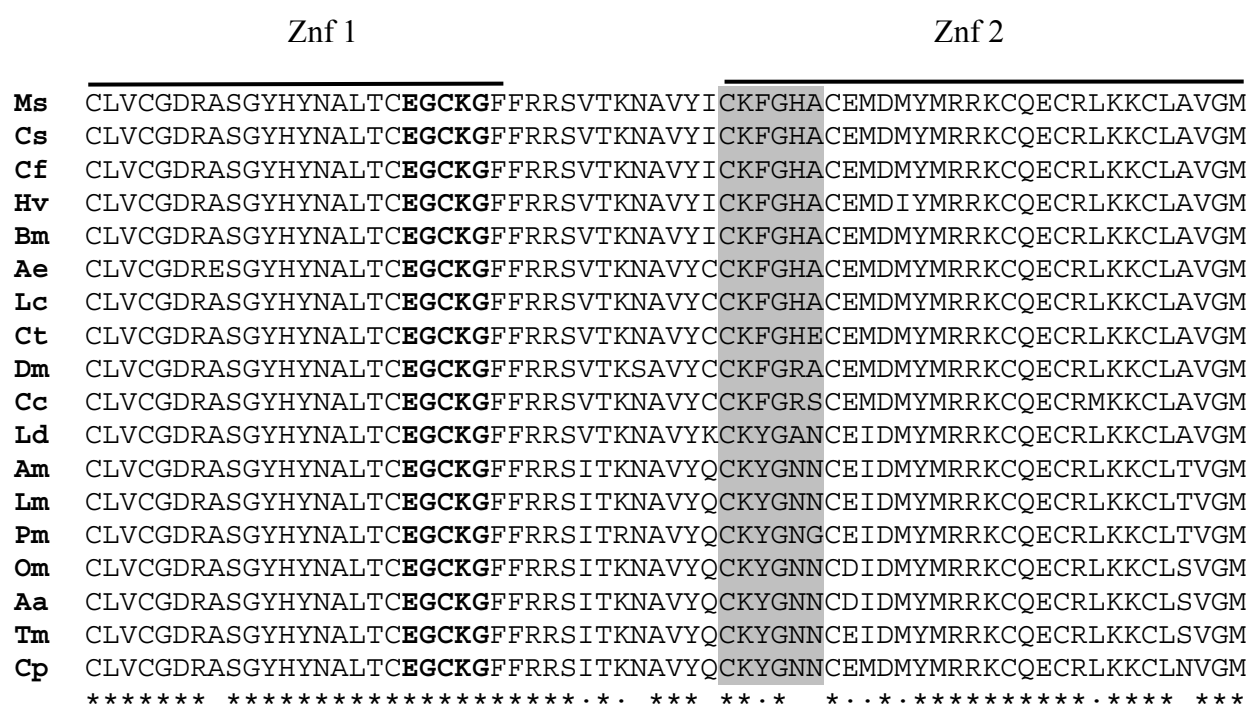
A seqüência deduzida de aminoácidos obtida pela anotação manual foi utilizada para os alinhamentos e construções filogenéticas utilizando-se seqüências de outras espécies de insetos e outros artrópodes. Foram feitos alinhamentos utilizando a seqüência inteira de *EcR* e também os

domínios DBD e LBD separadamente. Estes alinhamentos mostraram alto grau de identidade em relação aos domínios conservados DBD (Fig. 5, tabela 3) e LBD (Fig. 6, Tabela 3) de EcR de *A. mellifera* em relação às outras espécies comparadas (Tabela 3). Tais identidades variam de 100% com *Locusta migratoria* a 88% em *Aedes aegypti* e *Drosophila melanogaster* no DBD (Tabela 3) e de 85% com *P. megacephala* a 57% com *Choristoneura fumiferana* no LBD (Tabela 3). Além de apresentar graus de identidade elevados, o DBD apresenta os subdomínios conservados P-box (EGCKG) e D-box, localizados dentro dos *zinc fingers* 1 e 2, respectivamente (Figs. 2 e 5), como mencionado anteriormente. Análises comparativas mostraram que tais subdomínios também são altamente conservados entre EcR das espécies comparadas, sendo que os *Znfs* são muito semelhantes em seqüência e número de aminoácidos, a seqüência de aminoácidos do P-box é idêntica em todas elas e o D-box possui uma seqüência que varia pouco entre cada uma delas (Fig. 5). Analisando-se os alinhamentos feitos com base na seqüência do LBD nota-se que, apesar de ser considerado um domínio conservado e de apresentar identidades elevadas entre as espécies, pode-se observar neste domínio alguns *gaps*. São observados seis *gaps*, o primeiro deles compartilhado por duas das espécies de Lepidoptera analisadas, *Bombyx mori* e *Heliothis virescens*. O segundo é compartilhado por três das espécies de Díptera, *Drosophila melanogaster*, *Lucilia cuprina* e *Ceratitis capitata*. O terceiro *gap* é compartilhado por espécies pertencentes a mais de uma ordem, sendo elas Hymenoptera (*A. mellifera* - Am e *P. megacephala* - Pm), Coleoptera (*L. decemlineata* - Ld e *T. molitor* Tm) e Orthoptera (*L. migratoria* - Lm), um quarto *gap* é observado apenas em *CelUCA pugilator*, um Decapoda. Um quinto *gap* se mostra mais abrangente, ele é compartilhado por todas as ordens comparadas exceto Lepidoptera. O sexto e último *gap* identificado pode ser observado apenas em não Díptera/Lepidoptera (Fig. 6).

O alinhamento feito utilizando as seqüências inteiras da proteína apresentou identidades relativamente altas, mas não como aquelas apresentadas pelos domínios conservados. Elas variam de 79% entre a espécie estudada e *P. megacephala* a 48% entre ela e *Bombyx mori* (Tabela 3). Em relação aos demais domínios, os graus de identidade se mostraram relativamente baixos, exceto quando se relaciona com o himenóptero *P. megacephala*, com o qual todas as identidades foram relativamente altas (Tabela 3). Com base nesses dados e de posse das seqüências de EcR das espécies



usadas para comparação, foi observado também que os domínios são similares ou diferentes não apenas em seqüência, mas também em número de aminoácidos que os compõem. EcR de *A. mellifera* apresenta 81 aminoácidos no domínio A/B, 66 no DBD, 95 no domínio D, 224 no LBD e 3 no domínio F (Fig. 7 e Tabela 4). Comparando-se tais resultados com o número de aminoácidos presentes nos domínios das outras espécies analisadas, observou-se que o DBD e o LBD são os mais conservados, sendo que o DBD possui exatamente o mesmo número em todas as espécies utilizadas para comparação (66 aminoácidos), enquanto o LBD possui um número que varia pouco entre elas (218-225; tais comparações não consideram a espécie utilizada como grupo externo, Tabela 4). Já os domínios A/B, D e F, mostraram-se muito variáveis quanto ao número de aminoácidos, sendo o mais variável entre eles o domínio F, contendo de 3 a 223 aminoácidos (Tabela 4).



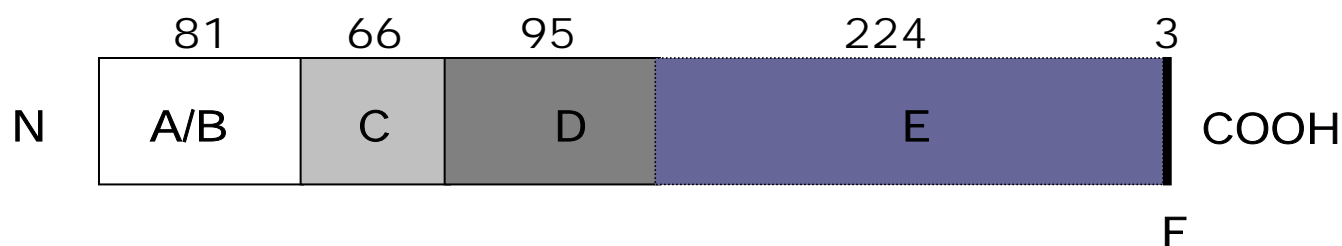
**FIGURA 5:** Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas do DBD de EcR de *Apis mellifera* e de outras espécies. P-box: em negrito dentro do *Znf 1*, D-box: box cinza dentro do *Znf 2*. (\*) indicam posições que possuem um único resíduo completamente conservado; (:.) e (.) indicam que houve substituição de um resíduo por outro com características semelhantes, pertencentes a um mesmo grupo (ácido, básico ou neutro), o que não altera a característica geral da proteína. \* Ver tabela 5 contendo o nome das espécies (representadas acima por siglas) e a ordem a que pertencem.



Am CRQMYAMKVNNAEYALLTAIVIFSE-RPNLLEGWKVEKIQEIYLEALRAYVDNR--RFPN  
 Pm CRQMYAMRVNNAEYALLTAIVIFSE-RPNLLESRKVEKIQEIYKTLKAYVDNR--RFPK  
 Ld CRTMYSMKVDNAEYALLTAIVIFSE-RPALIEGWKVEKIQEIYLEALRAYVDNR--RFPK  
 Tm CRTMYSMKVDNAEYALLTAIVIFSE-RPSLIEGWKVEKIQEIYLEALRAYVDNR--RSPS  
 Lm CRQMYAMKVDNAEYALLTAIVIFSE-RPSLVEGWKVEKIQEIYLEALKAYVDNR--RFPK  
 Om CRKMCQLRVDNAEYALLTAIVIFSE-RPCLVDPHKVERIQEYYIETLRMYSENH--RFP-  
 Aa CRKMCQLRVDNAEYALLTAIVIFSE-RPSLVDPHKVERIQEYYIETLRMYSENH--RFP-  
 Cp CRSLCKMKVDNAEYALLAAIAIFSE-RPNLKELKKVEKIQEIYLEALKSYVENR--RFP-  
 \*\* : : : \* : \*\*\* : \* : \*\*\* : \* \* \* . \* : : \* \* . : \* : \* \* :

Bm CAVIYGRILSVLTELRTLTGQNSNMCISLKLKNRKLPPFLEEIWD  
 Hv GAVIFGEILGILTEIRTLGMQNSNMCISLKLKNRKLPPFLEEIWD  
 Cs CAVLYAKILSVLTELRTLTGQNSNMCISLKLKNRKLPPFLEEIWD  
 Ms CAVLFGKILGVLTELRTLTGQNSNMCISLKLKNRKLPPFLEEIWD  
 Cf SSVIYGKILSILSELRTLTGQNSNMCISLKLKNRKLPPFLEEIWD  
 Dm SLVFFAKLLSILTELRTLTGNQNAEMCFSLKLKNRKLPKFLEEIWD  
 Lc SLVFFAKLLSILTELRTLTGNQNAEMCFSLKLKNRKLPKFLEEIWD  
 Cc SLVFFAKLLSILTELRTLTGNQNAEMCFSLKLKNRKLPKFLEEIWD  
 Ae CSVIFAKLLSILTELRTLTGNQNSEMCFSLKLKNRKLPRFLEEIWD  
 Ct CSVQFAKLLGILTELRTMTGNKNSEMCFSLKLRNRKLPRFLEEVD  
 Am PGTVFARLLSVLTELRTLTGNQNSEMCFSLKFKNKKLPVFLAEIWD  
 Pm SGTIFAKLLSVLTELRTLTGNQNSEMCLNLKFKNKKLPLFLAEIWD  
 Ld PGTIFAKLLSVLTELRTLTGNQNSEMCFSLKLKNKKLPPFLAEIWD  
 Tm RGTIFAKLLSVLTELRTLTGNQNSEMCSLKLKNKKLPPFLDEIWD  
 Lm SGTIFAKLLSVLTELRTLTGNQNSEMCFSLKLKNKKLPPFLAEIWD  
 Om GKNYFARLLSTLTELRTLTGNMNAEMCFSLKVQNKKLPPFLAEIWD  
 Aa GKNYFARLLSILTELRTLTGNMNAEMCFSLKVQNKKLPPFLAEIWD  
 Cp SNMVFAKLLNILTELRTLTGNINSEMCFSLTLKNKRLPPFLAEIWD  
 : . . : \* . \* : \* : \* : \* \* \* \* : \* : \* : \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

**FIGURA 6:** Alinhamento entre a seqüência aminoacídica do LBD de EcR de *Apis mellifera* e de outras espécies. Círculo vermelho: *gap* compartilhados por *Bombyx mori* e *Heliothis virescens* (ambos Lepidoptera); círculo cinza: *gap* compartilhado por *Drosophila melanogaster*, *Lucilia cuprina* e *Ceratitis capitata* (as três Diptera); círculo preto: *gap* compartilhado apenas por Hymenoptera, Coleoptera e Orthoptera. Retângulo vermelho: *gap* presente apenas em *Celuca pugilator* (Decapoda); retângulo cinza: *gap* compartilhado por todas as espécies exceto Lepidoptera; retângulo preto: *gap* compartilhado somente por espécies não Diptera/Lepidoptera. (\*) indicam posições que possuem um único resíduo completamente conservado; (:) e (.) indicam que houve substituição de um resíduo por outro com características semelhantes, pertencentes a um mesmo grupo (ácido, básico ou neutro), não alterando a característica geral da proteína. \* Ver tabela 5 contendo o nome das espécies, representadas acima por siglas, e a ordem a que pertencem.



**FIGURA 7:** Desenho esquemático de EcR mostrando os domínios com os respectivos números de aminoácidos que os compõem. N representa a amina localizada na região amino-terminal (ou N-terminal) e COOH representa a carboxila localizada na região carbóxi-terminal (ou C-terminal) da proteína.

**TABELA 3:** Graus de identidade, em porcentagem, entre EcR de *Apis mellifera* e de outras espécies.

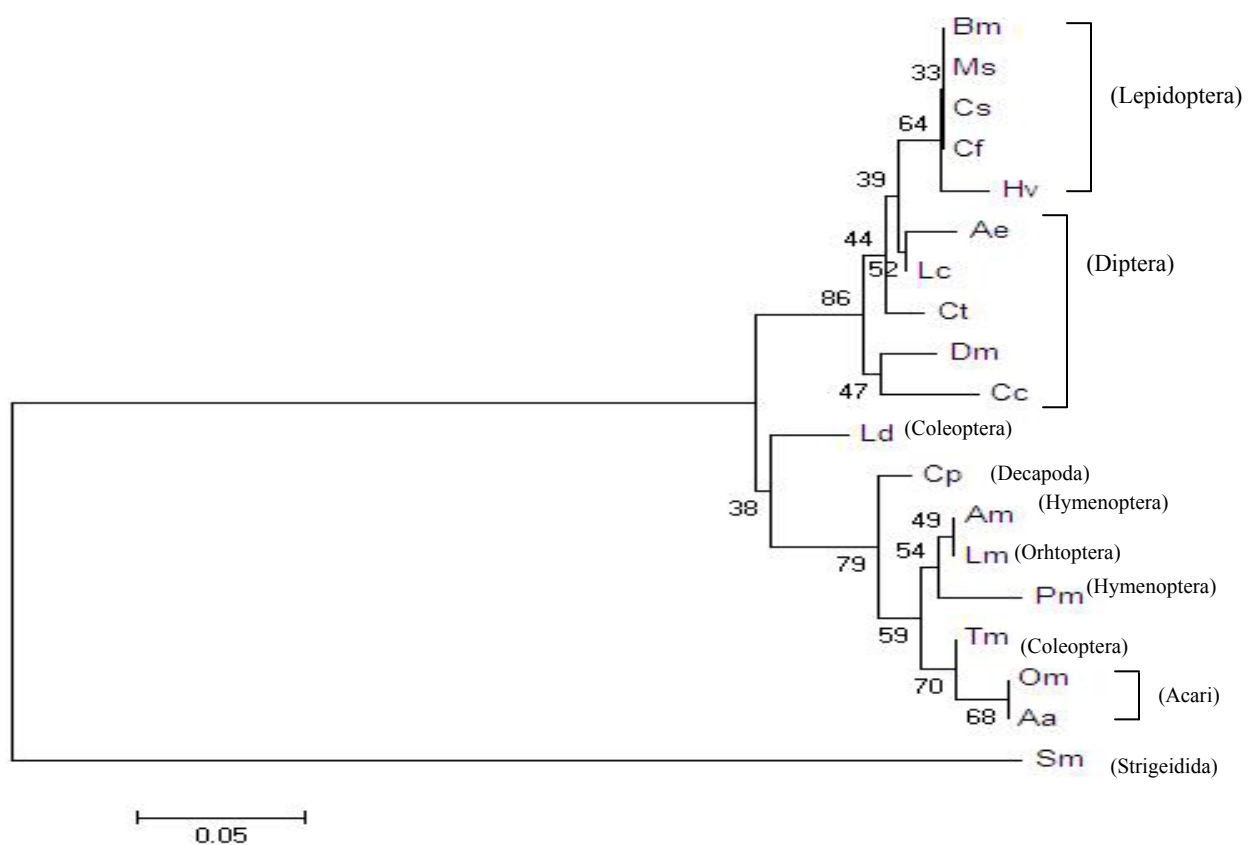
IDENTIDADES	Seqüência inteira	A/B	DBD	D	LBD	Número de acesso no GenBank
<i>Pheidole megacephala</i>	79	57	97	83	85	<a href="#">BAE47510</a>
<i>Locusta migratoria</i>	68	32	100	58	84	<a href="#">AAD19828</a>
<i>Tenebrio molitor</i>	64	26	99	53	80	<a href="#">CAA72296</a>
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	66	28	94	56	82	<a href="#">BAD99297</a>
<i>CelUCA pugilator</i>	56	28	97	40	68	<a href="#">AAC33432</a>
<i>Ornithodoros moubata</i>	57	30	97	43	64	<a href="#">BAE45855</a>
<i>Amblyomma americanum</i>	56	28	97	38	64	<a href="#">AAB94567</a>
<i>Aedes aegypti</i>	54	30	88	28	65	<a href="#">P49880</a>
<i>Heliothis virescens</i>	51	26	88	33	59	<a href="#">O18473</a>
<i>Chilo suppressalis</i>	50	26	89	32	58	<a href="#">BAC11714</a>
<i>Choristoneura fumiferana</i>	51	28	89	33	57	<a href="#">AAC36491</a>
<i>Chironomus tentans</i>	51	25	89	31	59	<a href="#">P49882</a>
<i>Drosophila melanogaster</i>	55	31	88	33	63	<a href="#">AE003784</a>
<i>Bombyx mori</i>	48	25	89	23	58	<a href="#">BAA07890</a>
<i>Ceratitidis capitata</i>	51	25	88	28	63	<a href="#">CAA11907</a>
<i>Lucilia cuprina</i>	52	25	89	32	65	<a href="#">AAB81130</a>
<i>Manduca sexta</i>	51	25	89	32	58	<a href="#">AAA86699</a>

**TABELA 4:** Número de aminoácidos contidos em cada domínio de *EcR* de *Apis mellifera* e de outras espécies.

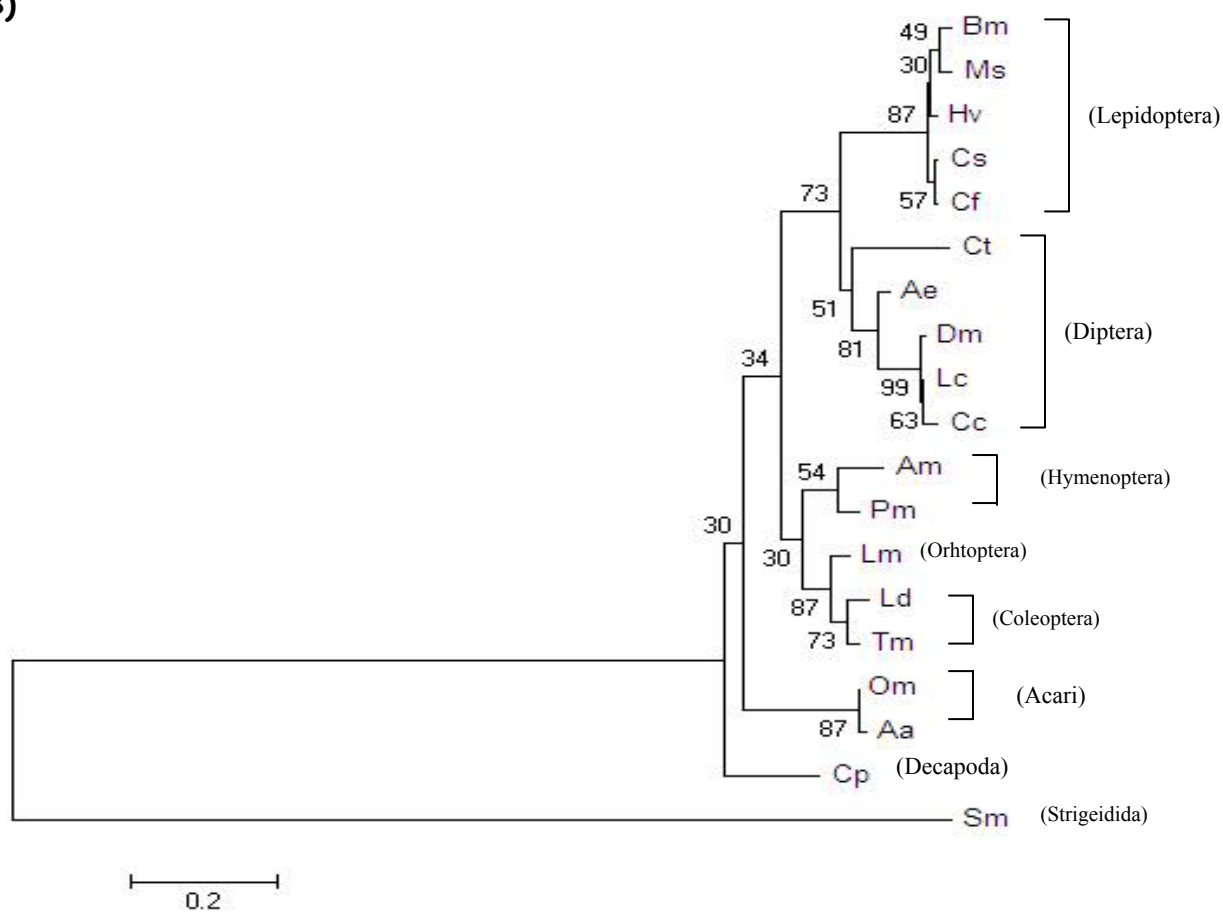
ESPÉCIES	NÚMERO DE AA NOS DOMÍNIOS				
	A/B	C – DBD	D	E - LBD	F
<i>Apis mellifera</i>	81	66	95	224	3
<i>Pheidole megacephala</i>	253	66	92	219	3
<i>Locusta migratoria</i>	179	66	74	219	3
<i>Tenebrio molitor</i>	137	66	74	219	5
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	121	66	77	219	5
<i>CelUCA pugilator</i>	156	66	74	218	4
<i>Ornithodoros moubata</i>	195	66	83	219	3
<i>Amblyomma americanum</i>	188	66	94	219	3
<i>Aedes aegypti</i>	290	66	92	222	106
<i>Heliothis virescens</i>	162	66	97	220	31
<i>Chilo suppressalis</i>	141	66	97	224	19
<i>Choristoneura fumiferana</i>	140	66	92	224	19
<i>Chironomus tentans</i>	114	66	109	222	25
<i>Drosophila melanogaster</i>	263	66	101	221	223
<i>Bombyx mori</i>	146	66	91	220	20
<i>Ceratitis capitata</i>	247	66	105	221	47
<i>Lucilia cuprina</i>	300	66	87	221	83
<i>Manduca sexta</i>	146	66	92	224	28

Através de dendrogramas construídos com base na seqüência de *EcR* da espécie estudada e também daquelas utilizadas para comparação e dos domínios relativamente conservados DBD e LBD, foi possível analisar semelhanças e diferenças entre elas, tendo como referência este gene. Estes dendrogramas foram feitos por *neighbor-joining* com o intuito de analisar agrupamentos por semelhança, ressaltando-se que não foram feitos com a intenção de se analisar a filogenia dos grupos. A seqüência de E78 de *Schistosoma mansoni* (um receptor nuclear induzido por ecdisona – GenBank AAR30507) foi utilizada como grupo externo. As árvores resultantes, apesar de apresentarem algumas diferenças entre si, mostraram uma característica peculiar. Nelas se observa um agrupamento entre dípteros e lepidópteros e uma clara divisão entre esses dois grupos e as demais espécies analisadas, sendo elas outros insetos, aracnídeos e crustáceos (Fig. 8).

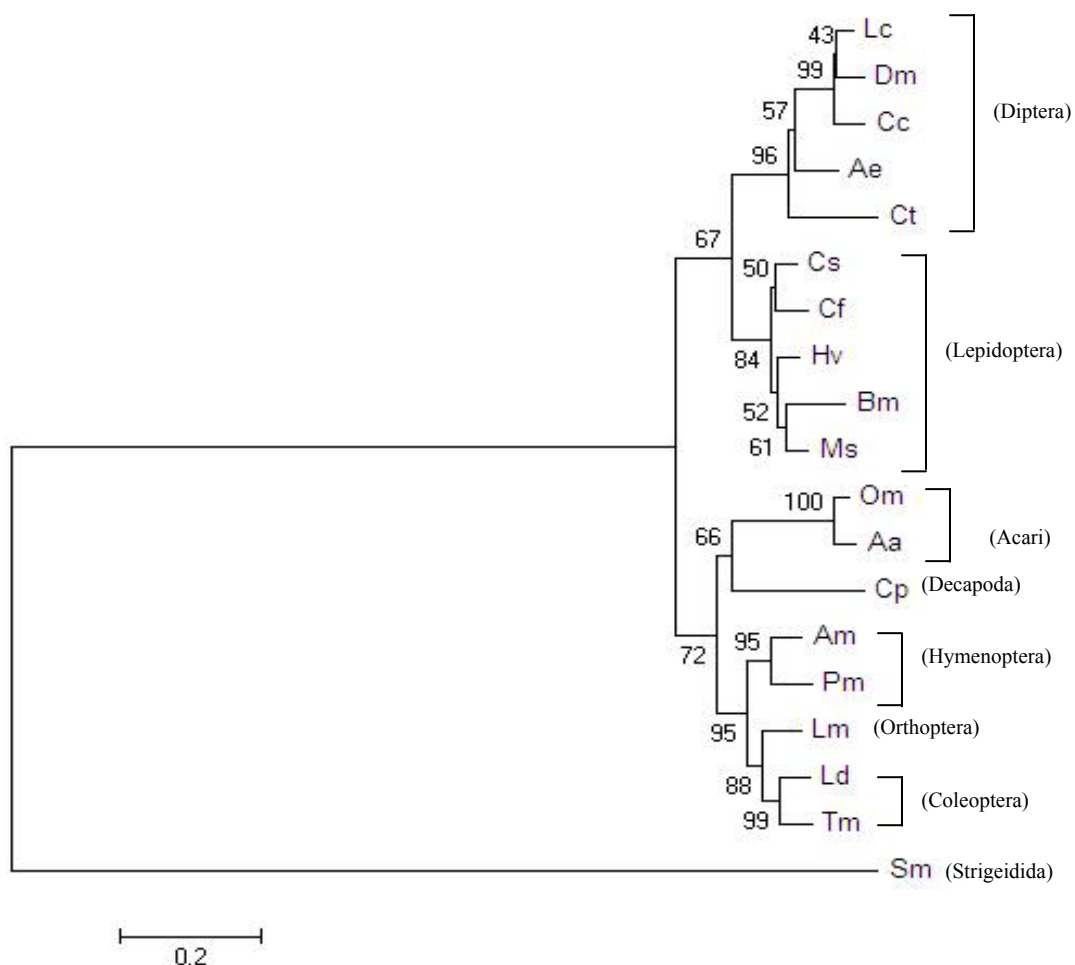
A)



B)

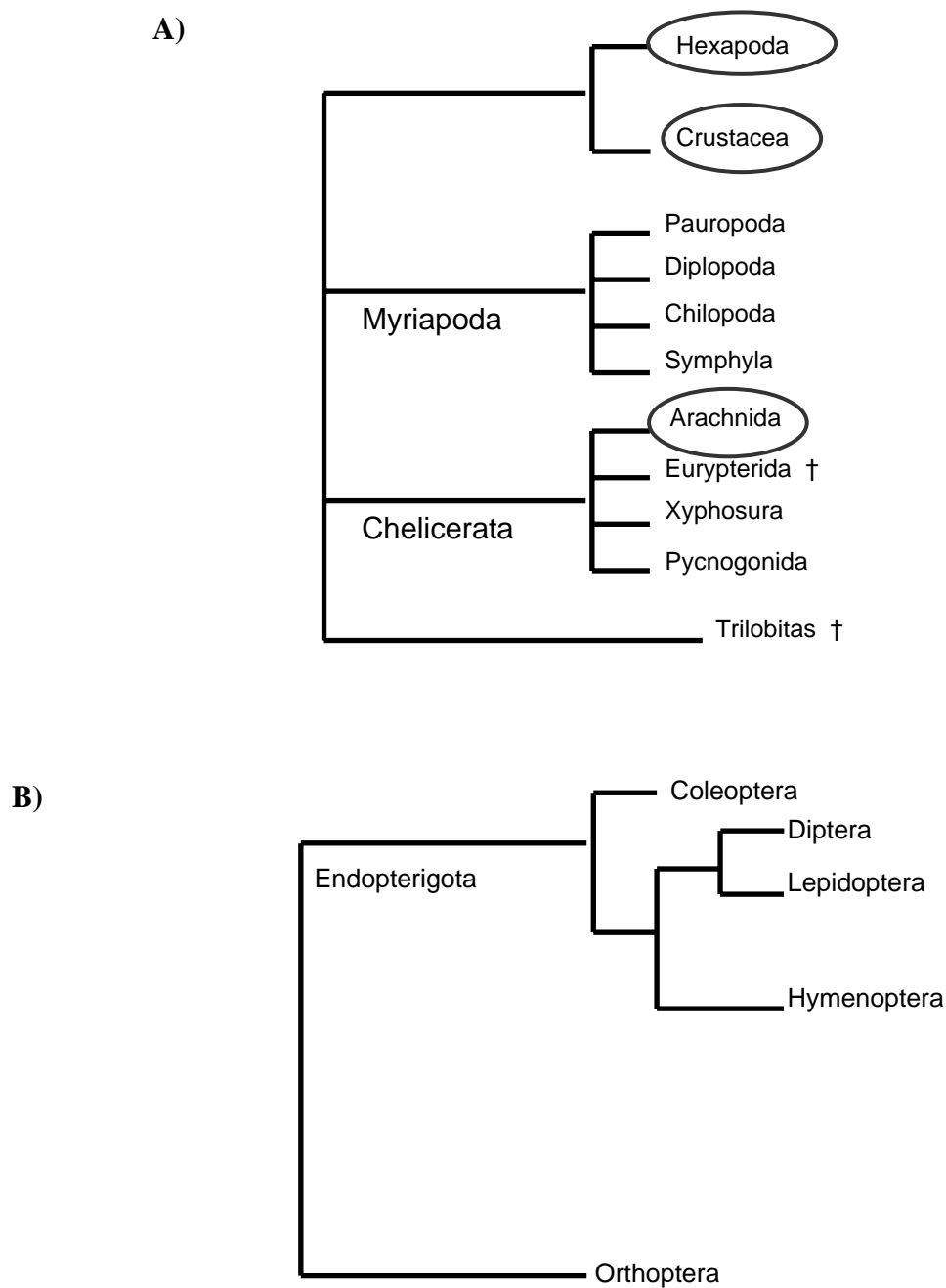


C)



**Figura 8:** Árvores filogenéticas construídas por *neighbor-joining* com auxílio do programa MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004), tendo por base as seqüências de EcR de *Apis mellifera* e de outras espécies. A seqüência de E78 de *Schistosoma mansoni* foi utilizada como grupo externo. Árvore filogenética construída com base na seqüência de DBDs (A), LBDs (B) e na seqüência inteira de EcR (C). Os números nas separações dos ramos significam o valor do *Bootstrap*, isto é, quão confiável é este ramo; e o número localizado abaixo de cada dendrograma determina que a distância determinada pelas barras seja igual ao valor da taxa de substituição de aminoácidos. À direita das árvores estão as ordens às quais as espécies pertencem. \*Veja tabela 5 contendo o nome das espécies (representadas acima por siglas).





**FIGURA 9:** Árvores filogenéticas feitas com base na filogenia aceita de artrópodes e insetos. (A) Filogenia aceita para artrópodes. Os círculos cinza indicam os grupos que foram usados para comparação neste trabalho, Hexapoda (Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera), Crustacea (Decapoda) e Arachnida (Acari). As cruzes indicam grupos extintos. (B) Filogenia aceita para insetos (está incompleta; as árvores foram desenhadas apenas com os grupos utilizados nas análises) (Modificado de Wheeler et al., 1993; Wheeler et al., 2001).

**TABELA 5:** Nome das espécies, correspondentes às siglas usadas nas figuras 5,6 e 8, e ordem a que pertencem.

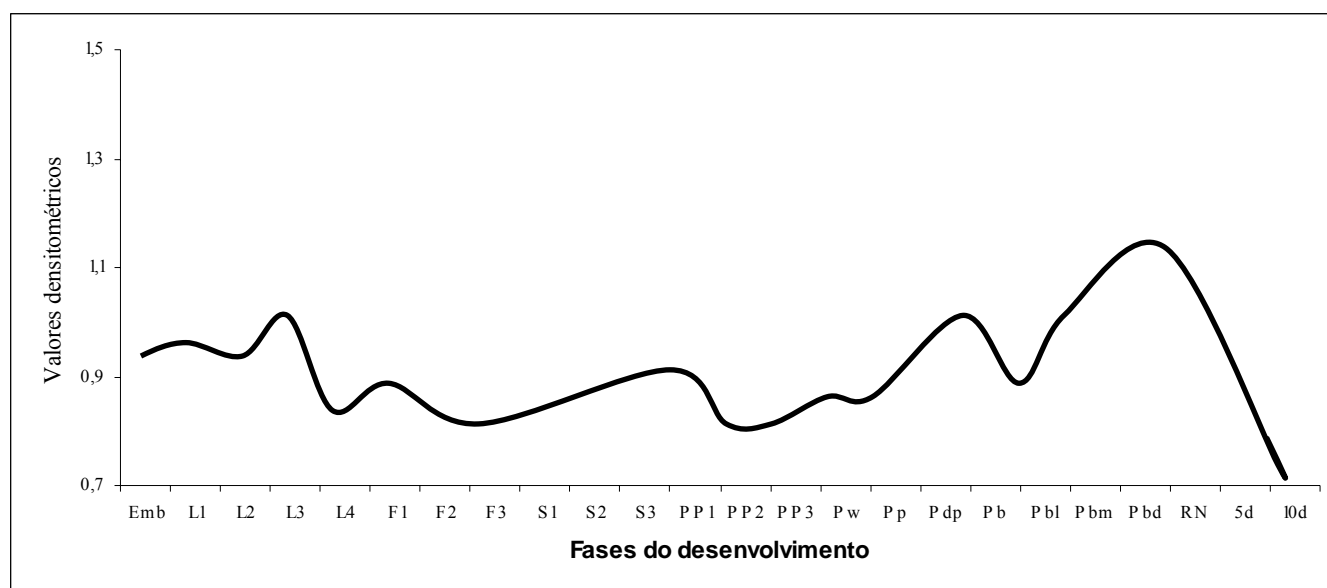
<b>SIGLA</b>	<b>NOME DA ESPÉCIE</b>	<b>ORDEM</b>
Am	<i>Apis mellifera</i>	Hymenoptera
Pm	<i>Pheidole megacephala</i>	Hymenoptera
Lm	<i>Locusta migratoria</i>	Orthoptera
Ld	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Coleoptera
Tm	<i>Tenebrio molitor</i>	Coleoptera
Om	<i>Ornithodoros moubata</i>	Acari
Aa	<i>Amblyomma americanum</i>	Acari
Cp	<i>Celuca pugilator</i>	Decapoda
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>	Diptera
Ae	<i>Aedes aegypti</i>	Diptera
Lc	<i>Lucilia cuprina</i>	Diptera
Cc	<i>Ceratitis capitata</i>	Diptera
Bm	<i>Bombyx mori</i>	Lepidoptera
Cs	<i>Chilo supressalis</i>	Lepidoptera
Cf	<i>Choristoneura fumiferana</i>	Lepidoptera
Hv	<i>Heliothis virescens</i>	Lepidoptera
Ct	<i>Chironomus tentans</i>	Diptera
Ms	<i>Manduca sexta</i>	Lepidoptera

## 6.2 A EXPRESSÃO DE *EcR*

### 6.2.1 PERFIL DE EXPRESSÃO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE OPERÁRIAS

#### DE *A. mellifera*

Através de RT-PCR semi-quantitativa foi determinado o perfil de expressão de *EcR* em operárias (Fig. 10) de *Apis mellifera* ao longo de todo o desenvolvimento, desde o estágio embrionário até o 10º dia após emergência. Nesta casta foram encontrados alguns picos de expressão sendo os de maior destaque aqueles em L3 (instar larval 3), em PP1 (pré-pupa 1), entre Pdp (Pupa de olho rosa escuro) e Pb (pupa de olho marrom), no final do estágio pupal – em RN (recém nascidas), e um pequeno pico que foi observado em F1 (5º instar larval, fase de alimentação 1). O pico localizado em PP1 e o centralizado entre Pdp e Pb (Fig. 10) são correspondentes aos maiores títulos de ecdisteróides encontrados em operárias e se correspondem aos picos pré-metamórfico (Fig. 12) e pupal. Aquele encontrado em L3 parece não ter relação com os ecdisteróides e o encontrado no final do estágio pupal, parece ter influência tanto dos níveis de ecdisteróides (Fig. 12) quanto dos títulos de hormônio juvenil (Fig. 13) encontrados durante essa fase nesta casta.

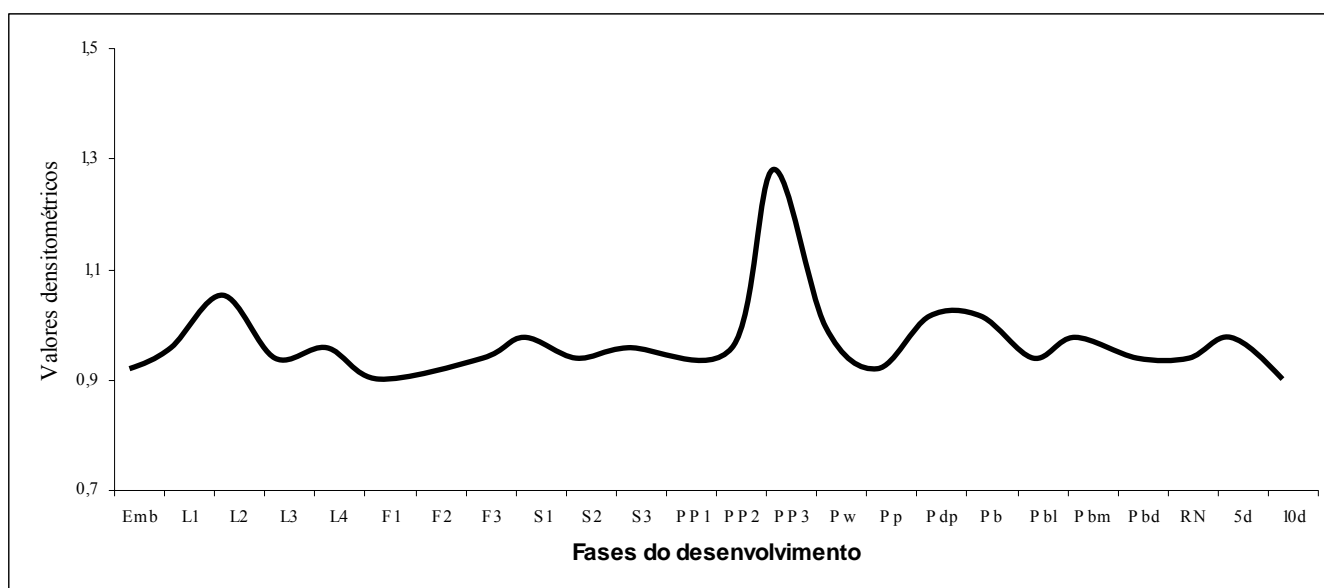


**FIGURA 10:** Perfil de expressão de *EcR* durante o desenvolvimento de operárias de *Apis mellifera*, determinado por análise densitométrica das bandas obtidas em gel de agarose após PCR. Ver tabela 2 para abreviaturas das fases do desenvolvimento.

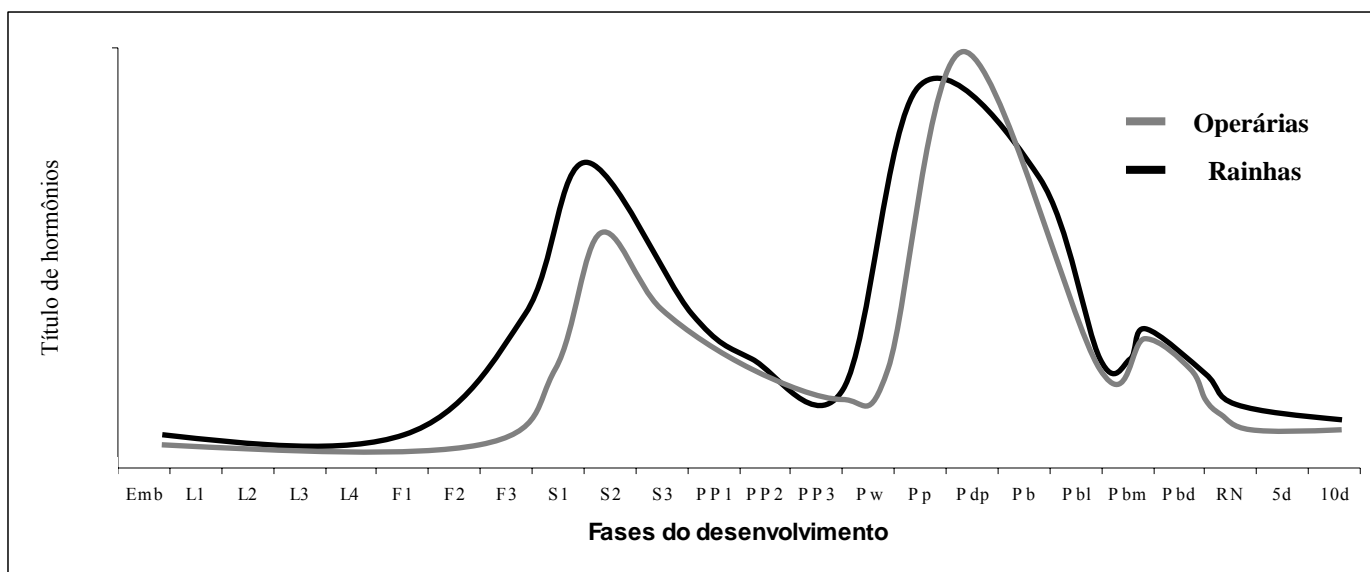
## 6.2.2 PERFIL DE EXPRESSÃO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE RAINHAS DE

### *A. mellifera*

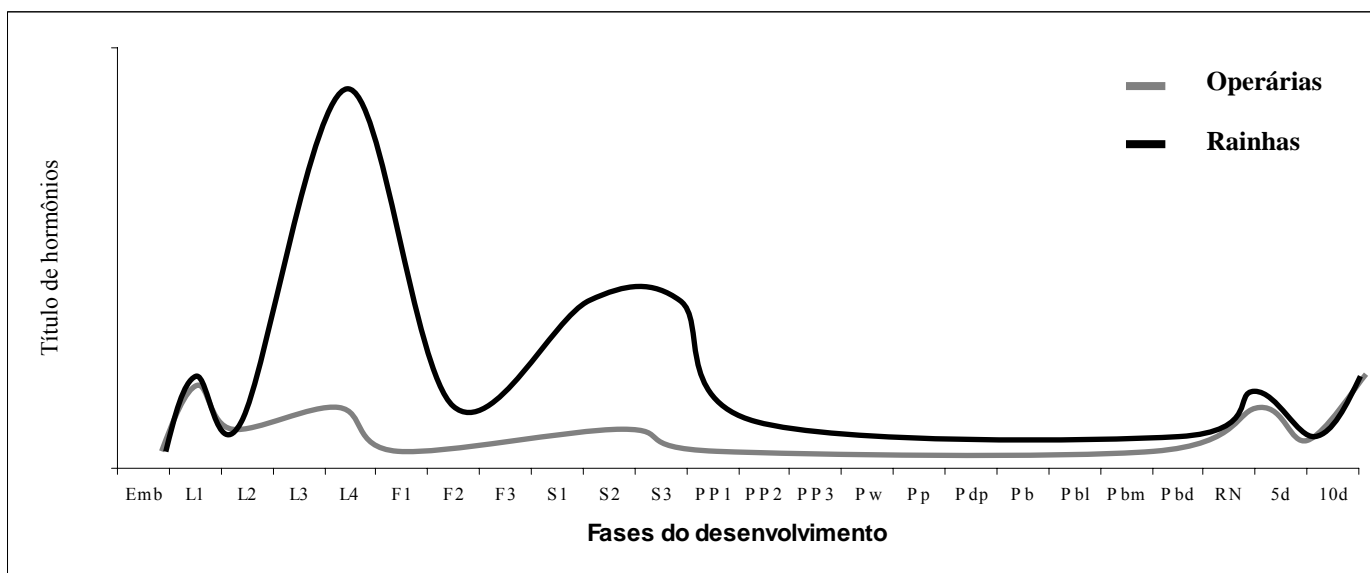
O perfil determinado ao longo de todo o desenvolvimento, para rainhas de *Apis mellifera*, também através de RT-PCR semi-quantitativa (Fig. 11) mostra importantes picos de expressão, sendo os de maior destaque aqueles encontrados em L2, em PP3 e em Pb (Fig. 10). Os picos encontrados são equivalentes, embora mais pronunciados, àqueles encontrados em operárias. Em PP3 e Pb eles são equivalentes aos títulos de ecdisteróides encontrados nesses períodos de desenvolvimento (Fig. 12). Em PP3 o nível de expressão de *EcR* é o mais elevado durante todo o desenvolvimento. Em L2, o pico de expressão observado pode ser comparado àquele encontrado em L3 em operárias, que em rainhas pode estar respondendo de forma mais lenta a um determinado fator, provavelmente os títulos de HJ (Fig. 13), relativamente altos durante esta fase. No final do estágio pupal em rainhas, os níveis de expressão praticamente se mantêm até RN, onde sofrem uma pequena queda, e em seguida aumentam novamente no 5º dia após a emergência, depois do que começam a cair outra vez.



**FIGURA 11:** Perfil de expressão de *EcR* durante o desenvolvimento de rainhas de *Apis mellifera*, determinado por análise densitométrica das bandas obtidas em gel de agarose após PCR. Ver tabela 2 para abreviaturas das fases do desenvolvimento.



**FIGURA 12:** Títulos de ecdisteróides durante o desenvolvimento de rainhas e operárias de *Apis mellifera* (modificado de Hartfelder and Engels, 1998). Ver tabela 2 para abreviatura das fases de desenvolvimento.



**FIGURA 13:** Títulos de Hormônio Juvenil durante o desenvolvimento de rainhas e operárias de *Apis mellifera* (modificado de Hartfelder & Engels, 1998). Ver tabela 2 para abreviatura das fases de desenvolvimento.

### 6.2.3 A AÇÃO HORMONAL NA EXPRESSÃO DE *AmEcR*

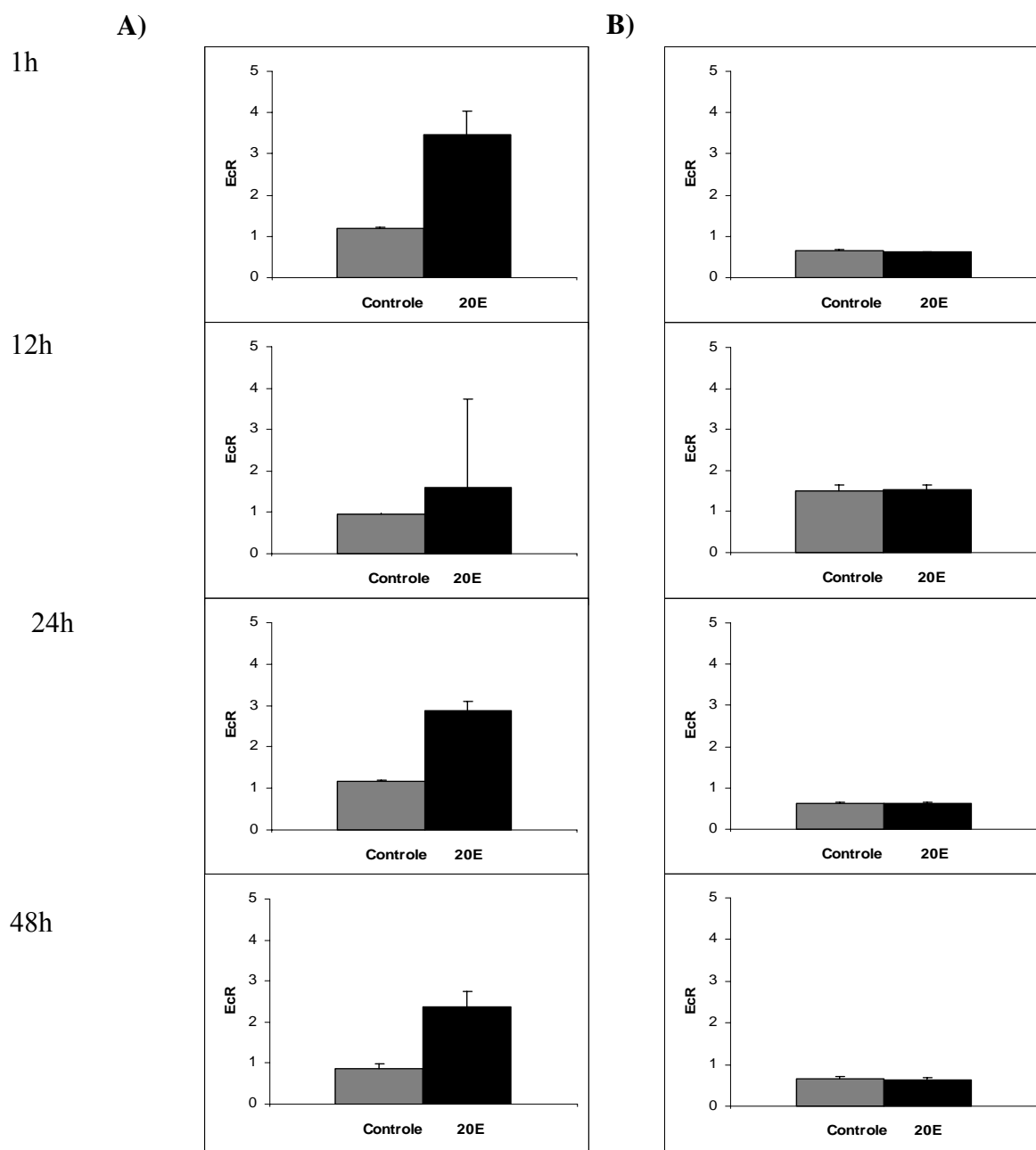
Nos experimentos realizados para avaliar a resposta de *EcR* a um aumento artificial nos níveis de hormônios, foram utilizados hormônio juvenil III, a forma encontrada em himenópteros, e ecdisona, 20E, a forma ativa deste hormônio também na maioria dos insetos. Estes hormônios foram aplicados separadamente em rainhas e em operárias, *in vivo*, foi testada a expressão de *EcR* por RT-PCR semi-quantitativa. Para examinar a velocidade da resposta aos hormônios, Pb de ambas as castas eram mantidas 1h, 12h, 24h e 48h sob tratamento com solução de hormônios ou o respectivo solvente após as quais o corpo gorduroso (CG) era retirado para extração do RNA e posterior análise. Esses experimentos foram feitos independentemente, já que não era nosso objetivo avaliar a duração da resposta. Os resultados mostrados correspondem a três repetições.

Os resultados obtidos para operárias, tanto para tratamento com 20E (Fig. 14A) como para HJ-III (Fig. 15A) mostraram uma grande semelhança entre si, com ambos os hormônios modulando positivamente os níveis de expressão de *EcR* no CG da fase estudada. Para ambos, os níveis de expressão mostraram um aumento rápido após aproximadamente 1h de tratamento. Aproximadamente 12h após o tratamento, o nível de expressão diminuiu, continuando baixo até 48h, mostrando que *EcR* responde rapidamente ao aumento artificial nos níveis hormonais, mas após certo tempo de aplicação, algum fator age para que a expressão gênica volte a seus níveis normais, provavelmente, o hormônio é metabolizado, como nas condições normais. Apesar da semelhança, a resposta ao tratamento com 20E mostrou-se mais clara e mais intensa (Fig. 13A) que a resposta ao tratamento com HJ (Fig. 14A) em operárias.

Em rainhas os resultados obtidos para cada um dos hormônios não mostraram semelhança entre si. 20E não ativou a expressão de *EcR*, pelo menos não com a quantidade utilizada para o tratamento (5µg) em nenhum dos intervalos de tempo após aplicação do hormônio (Fig. 14B). Já com HJ, houve uma resposta ao tratamento após 12h que se manteve após 24h. Com o tempo de incubação de 1h não houve aumento significativo na expressão de *EcR*, assim como após 48h de tratamento (Fig. 15B).

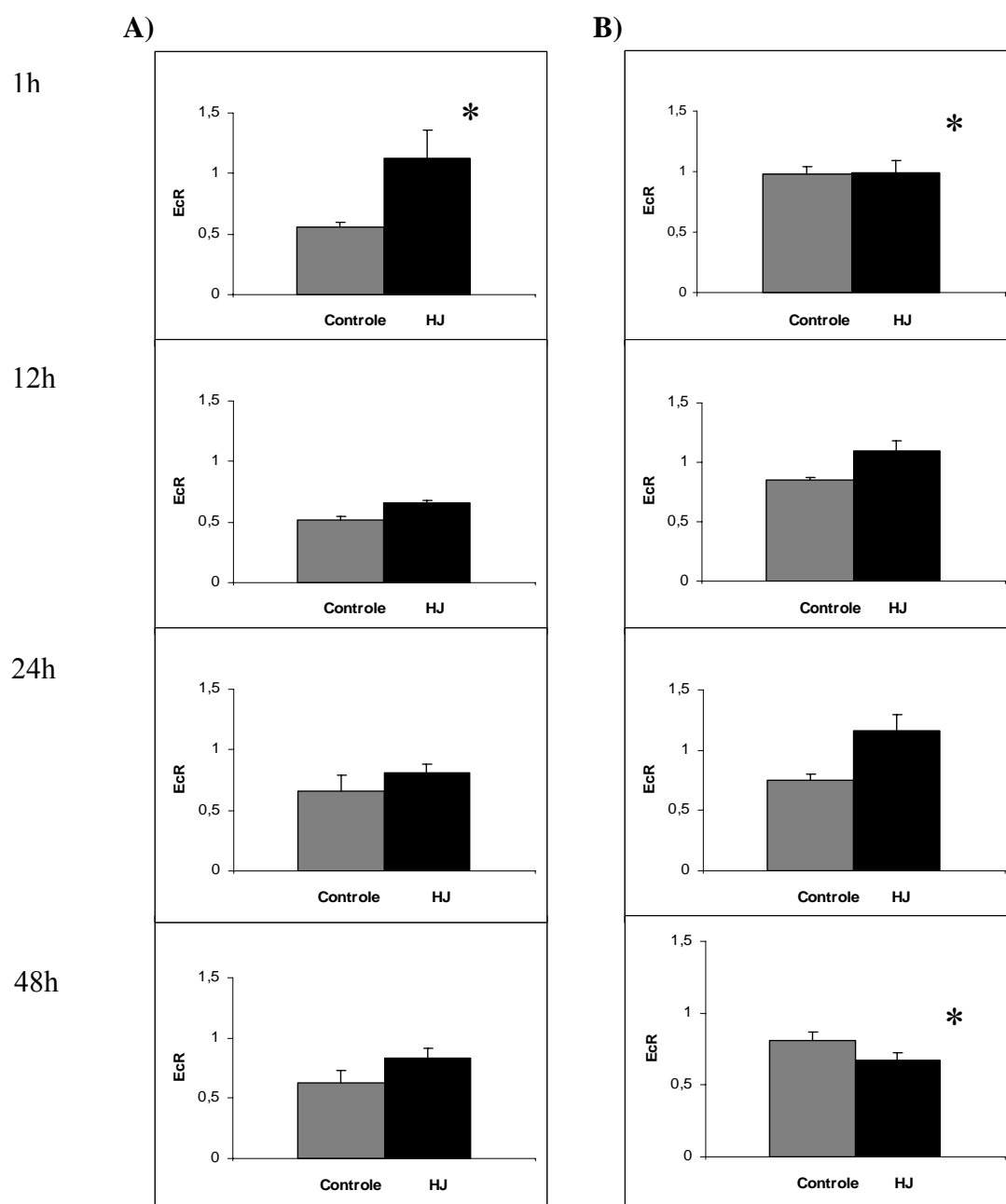
Através das análises estatísticas, utilizando teste-t, foi observado que, em operárias, a aplicação de 20E, foi significativamente diferente ( $\alpha = 0,005$ ) entre controle (solvente) e tratamento

(solvente+hormônio), para os quatro intervalos de tempo após aplicação (1h, 12h, 24h, 48h), sendo a expressão de *EcR* nas amostras tratadas com o hormônio, significativamente maior que a observada para as amostras controle. Ainda em operárias, em relação ao HJ, apenas nas amostras analisadas 1h após o tratamento não foi observada diferença estatística significativa entre controle e tratamento. As demais amostras controle e tratamento são significativamente diferentes com 95% de confiança ( $\alpha = 0,005$ ). Diferentemente em rainhas, para tratamento com 20E não houve diferença significativa com 95% de confiança ( $\alpha = 0,005$ ) entre tratamento e controle para nenhum dos quatro intervalos de tempo (1h, 12h, 24h, 48h), no entanto, as amostras tratadas com HJ, e analisadas 12h e 24h após o tratamento apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas às controles.



**FIGURA 14:** Resumo dos experimentos de aplicação intra-abdominal de 20E, mostrando os níveis de expressão de *EcR* após 1, 12, 24 e 48 horas de tratamento (indicadas à esquerda dos gráficos) com o hormônio ou solvente em Pb **A)** Operárias; **B)** Rainhas de *Apis mellifera*. Os níveis de expressão foram estimados por análise densitométrica das bandas obtidas por PCR, visualizadas em gel de agarose e normalizadas com  $\beta$ -actina. Barras pretas: expressão de *EcR* no CG de pupas tratadas com a 5 $\mu$ g de 20E (em 2 $\mu$ l de etanol). Barras cinza: expressão de *EcR* no CG de pupas controle, tratadas apenas com 2  $\mu$ l de etanol+ringer (solvente). Em operárias, todas as comparações (tratamento/controle) mostraram diferença estatística significativa, ao contrário do que foi encontrado em rainhas em que nenhuma das amostras mostrou diferença estatística significativa entre controle e tratamento ( $\alpha = 0,05$ ). As linhas nas barras representam o desvio padrão.





**FIGURA 15:** Resumo dos experimentos de aplicação tópica de HJ-III, mostrando os níveis de expressão de *EcR* após 1, 12, 24 e 48 horas de tratamento (indicadas à esquerda dos gráficos) com o hormônio ou solvente em Pb **A)** Operárias; **B)** Rainhas de *Apis mellifera*. Os níveis de expressão foram estimados por análise densitométrica das bandas obtidas por PCR, visualizadas em gel de agarose e normalizadas com  $\beta$ -actina. Barras pretas: expressão de *EcR* no CG de pupas tratadas com 10 $\mu$ g de Hormônio Juvenil - III (em 2 $\mu$ l de acetona), barras cinza: expressão de *EcR* no CG de pupas controle, tratadas apenas com 2 $\mu$ l de acetona (solvente). \* Comparação sem diferença estatística significativa ( $\alpha = 0,05$ ). As linhas nas barras representam o desvio padrão.

**DISCUSSÃO**

---

## 7.1 SOBRE *AmEcR* E SEU TRANSCRITO

Um fragmento de cDNA de *EcR* de *Apis mellifera* contendo 825 nucleotídeos foi amplificado, clonado e seqüenciado. Através deste fragmento que foi analisado e indicado como parte da seqüência de *EcR* e com ajuda de anotação manual tendo como ferramenta o genoma de *Apis mellifera*, foi possível obter a seqüência completa de nucleotídeos e de aminoácidos de *EcR*. O gene está organizado em quatro éxons, diferentemente de outras espécies, como *Bombyx mori* e *Drosophila melanogaster*, cujos *EcRs* estão organizados em 6 éxons (Koelle et al., 1991; Swevers et al., 1995). Com a seqüência aminoacídica foi possível realizar análises *in silico* que mostraram que a pauta de leitura (ORF) de *EcR* possui os 5 domínios característicos dos receptores nucleares (A/B, C, D, E e F) (Green & Chambon, 1988; Siaussat et al., 2004). Eles estão distribuídos pelos quatro éxons, sendo que o primeiro deles contém os domínios A/B e DBD em suas totalidades, e a parte inicial do domínio D (22 aminoácidos), o segundo éxon contém a parte final do domínio D (71 aminoácidos) e a inicial do LBD (16 aminoácidos). O terceiro éxon contém uma região mediana do LBD (125 aminoácidos), sendo o restante deste domínio (78 aminoácidos) localizado no quarto éxon, juntamente com o domínio F. A ORF possui 462 aminoácidos, característica que é bastante variável entre as espécies, pois o número de aminoácidos que a pauta de leitura de *EcR* contém pode variar até 878 em *Drosophila melanogaster* (Koelle et al, 1991). O número de aminoácidos encontrados na pauta de leitura destes receptores parece ser uma característica espécie-específica e pode se relacionar ao fato de que alguns domínios, como o A/B e o F, não são conservados nem em seqüência nem em número de aminoácidos (Fujiwara et al., 1995; Swevers et al., 1995; Mouillet et al., 1997). Em relação à seqüência, pode-se dizer que a ORF possui identidades relativamente altas com as seqüências de *EcRs* homólogas de espécies utilizadas para comparação neste trabalho, apresentando uma variação de 79% a 48%. As maiores identidades encontradas foram entre *EcR* de *A. mellifera* e de outros insetos não dípteros/lepidópteros, crustáceos e aracnídeos, pois como foi observado, dípteros e lepidópteros formam um grupo que se separa dos demais insetos e dos outros artrópodes (ver Bonneton et al., 2003; Palli et al., 2005). Já, os domínios C (DBD) e E (LBD), apresentam alto grau de conservação entre todas as espécies comparadas (ver Mouillet et al. 1997). O DBD mostrou o maior grau de identidade

entre elas, tanto em seqüência quanto em número de aminoácidos que o compõe. Ele é formado por 66 resíduos em todas as espécies em questão, provavelmente por ser um homeodomínio (que são seqüências conservadas que identificam genes relacionados ao desenvolvimento; em Lewin, 2000). Além disso, possui identidades que variam de 100 a 88% entre os outros artrópodes comparados, o que também foi observado em estudos com *EcR* de outras espécies (Cho et al., 1995; Fujiwara et al., 1995; Wang et al., 2000) e também com estudos que utilizaram seu parceiro no receptor, USP (Aleixo Silva et al., 2007). Dentro desse domínio se localizam dois *zinc fingers* do tipo C4, *Znf 1* e *Znf 2*, característicos dos membros da SRN (Superfamília dos Receptores Nucleares) (Umesono & Evans, 1989; Freedman, 1992) e que apresentam identidades significativas entre *A. mellifera* e as espécies aqui relacionadas. Esses *Znfs* contêm dois motivos conservados, P-box e D-box que são importantes para o reconhecimento específico de elementos de resposta a hormônios em determinados genes (Verras et al., 1999). O P-box é 100% idêntico nas espécies analisadas, o que foi confirmado também em outros estudos, mesmo com outros receptores (Cho et al, 1995; Mouillet et al., 1997; Verras et al., 1999, Aleixo Silva et al., 2007), enquanto as identidades do D-box apresentam valores um pouco menores, devido a algumas substituições de aminoácidos (Cho et al, 1995; Mouillet et al., 1997). O LBD, que, juntamente com o DBD, apresenta maior conservação entre os domínios, mostra identidades que variam entre 85 e 57% e comprimento que varia de 224 a 219 aminoácidos. Em *A. mellifera* este domínio contém 224 aminoácidos o que foi também observado em *C. suppressalis*, em *C. fumiferana* e em *M. sexta*, que são lepidópteros. De acordo com Bonneton et al. (2003) o LBD passou por um aumento significativo na taxa de substituição em dípteros e lepidópteros, enquanto sua estrutura parece não ter mudado. Uma possível explicação para isto se deve ao fato de que LBD de *EcR* em todos os insetos e, presumivelmente todos os artrópodes, se liga a 20-hidroxiecdisona (20E) (Riddiford et al., 2000).

Diferentemente dos domínios C (DBD) e E (LBD) que são altamente conservados em seqüência e número de aminoácidos, e que possuem identidades altas com os domínios de *EcR* de outras espécies analisadas, os demais domínios (A/B, D e F) não compartilham tais semelhanças quando comparados com os mesmos domínios de *EcR* de outras espécies. Eles são consideravelmente variáveis entre diferentes espécies (Fujiwara et al.,1995; Martinez et al., 1999).Apesar disso, no

domínio A/B, considerado pouco conservado, foi observada uma região de baixa complexidade rica em glicinas (G), que também foi encontrada em outros insetos. Em *Pheidole megacephala* (GenBank AB194765) esta região apresenta-se em quatro blocos contendo quatro ou cinco glicinas separadas por um ou dois aminoácidos diferentes deste, e em *Lucilia cuprina* (GB AAB81130) também está presente em blocos, sendo eles três que contêm de cinco a oito glicinas. No entanto, em *A. mellifera* essa região é contínua e maior, contém 37 glicinas, sendo sua função desconhecida. O F domínio, como pôde ser observado, apresenta a maior variabilidade em tamanho, desde 3 aminoácidos como apresentado por *A. mellifera* até 223 como encontrado em *Drosophila* (ver tabela 4). Conseqüentemente, ele não é conservado em seqüência e ainda não foi identificada nenhuma função clara desempenhada por ele. Em *Drosophila* ele é composto por seqüências simples e altamente repetitivas. O tamanho deste domínio pode sugerir que nas ondas de duplicação gênica, pelas quais os receptores passaram ao longo da evolução (Escriva et al., 2000) ele foi um importante alvo da duplicação. Foram feitos experimentos em que a porção C-terminal (o domínio F) foi expressa como uma fusão com uma seqüência ligante (GAL4) no DBD e outros em que ele foi deletado. Nos experimentos em que ele foi retirado da porção C-terminal e unido ao DBD na região N-terminal, observou-se que houve apenas uma modesta ativação da transcrição, mas parece improvável que ele desempenhe o papel de transativador no receptor. Similarmente, nos experimento de deleção, observou-se que houve uma pequena redução na indução da transcrição pelo receptor, embora o EcR-B1 sem o domínio F, tenha sido capaz de desempenhar a mesma função de EcR-B1 que possuía o domínio F. Então foi concluído que o domínio F de EcR de *Drosophila* não é muito importante para a ativação gênica, embora ele possa dar uma pequena contribuição à função de ativação presente no LBD (AF2). Por ser muito variável em tamanho, parece improvável que esse domínio C-terminal tenha um papel essencial no EcR de *Drosophila* (Hu et al., 2003), bem como no EcR das demais espécies. Apesar de diferentes graus de identidades encontrados entre os domínios de EcR de *A. mellifera* e das outras espécies estudadas, pudemos observar que com EcR de *P. megacephala* as identidades entre todos os domínios foram relativamente altas, o que pode sugerir que dentro de uma mesma ordem, a seqüência de aminoácidos entre os domínios se assemelhe mais quando comparadas a ordens diferentes, talvez pelo fato de serem mais relacionados evolutivamente.

Essas características pertinentes aos domínios podem ser verificadas também nos dendrogramas feitos utilizando-se as seqüências completa de EcR e os domínios conservados DBD e LBD, pelo método de *Neighbor-joining*. Ressaltamos que o propósito desta análise não foi reconstruir uma filogenia, mas sim caracterizar a similaridade entre esses receptores nas espécies analisadas usando a filogenia como ferramenta. Além disso, as análises individuais dos domínios podem nos dar informação sobre a evolução das diferentes funções relacionadas a esses domínios, particularmente em relação à capacidade de união a ligante e funções associadas aos eventuais domínios F, pouco conhecidos até o momento.

Os dendrogramas obtidos, apesar de apresentarem diferenças, o que é condizente com as diferenças em seqüências apresentadas pelos domínios, e também pelas características de cada grupo, apresentaram uma característica comum. Neles pôde-se observar uma clara separação entre díptero-lepidópteros e as demais espécies. Tal resultado, encontrado também por outros autores, com as seqüências de dípteros e lepidópteros formando um grupo monofilético separado de todos os outros insetos (Mouillet et al., 1997; Verras et al., 1999; Bonneton et al., 2003), pode ser explicado pela divergência existente entre a seqüência de *EcR* desse grupo e a dos demais insetos e outros artrópodes comparados (Mouillet et al., 1997; Bonneton et al., 2003) e também sugere que *EcR*, assim como *usp-rxr*, passou por uma evolução acelerada na linhagem Diptera/Lepidoptera em relação aos outros insetos, o que pode ser explicado pela adaptação ao seu parceiro extremamente divergente (*usp-rxr*) e eventual aquisição de novos parceiros, sugerindo que eles coevoluíram (Bonneton et al., 2003). Estes dendrogramas também refletem os resultados encontrados para receptores nucleares, que sugerem que receptores nucleares com habilidade de união a ligante, como EcR, adquiriram esta capacidade independentemente ao longo da evolução, sendo a diversidade destes receptores produto de duas ondas de duplicação gênica (Escriva et al., 1997). Isto pode ser corroborado pela observação de que as não há correlação entre as relações evolutivas dos receptores nucleares e a natureza de seus ligantes. Por exemplo, a subfamília formada por receptores de hormônios tireóideos (TR), de ácido retinóico (RAR), de vitamina D (VDR) e aqueles ativados pela proliferação de peroxissomos (PPAR), que são evolutivamente relacionados, se unem a ligantes originados por vias biossintéticas totalmente diferentes. Em contraste, receptores de ácido retinóico (RAR) e de retinóide X (RXR), que não são

evolutiveamente relacionados, se unem a ligantes semelhantes (*all-trans* e *9-cis* ácido retinóico, respectivamente) (Escriva et al., 2000).

O LBD, principal alvo dessa rápida evolução, mostra ter evoluído a uma taxa significativamente diferente entre as espécies, apesar disso esse domínio é considerado bem conservado, não apresentando divergência em estrutura entre as espécies, contrastando com o que ocorre com USP-RXR, possivelmente por se ligar a ecdisona em presumivelmente todos os artrópodes. Tais diferenças podem ser responsáveis por mudanças em propriedades funcionais do heterodímero EcR/USP-RXR durante a evolução, como transativação ligante-dependente e heterodimerização. Diferentemente, uma rápida evolução não é observada no DBD, para o qual as taxas não são expressivamente diferentes (Bonneton et al., 2003).

O resultado obtido através dessas construções filogenéticas, apesar de não terem como intuito uma análise filogenética, não coincide com a filogenia aceita para artrópodes, construída com base em caracteres morfológicos (Fig. 9A; Wheeler et al., 1993). Nela, Hexapoda (insetos) e Decapoda (crustáceos) são agrupados em um ramo e separados de Arachnida (ácaros). A filogenia aceita para insetos, construída com base em caracteres morfológicos e moleculares (Fig. 9B; Wheeler et al., 2001) também não condiz com o que foi observado para EcR neste trabalho, nela dípteros e lepidópteros se agrupam em um ramo que possui Hymenoptera como grupo irmão em um segundo ramo. Esse segundo ramo se agrupa com Coleoptera e esses têm como grupo irmão Orthoptera (filogenia feita com base em caracteres morfológicos e moleculares; Wheeler et al., 2001). Apesar disto se assemelha ao que foi encontrado para seu parceiro heterodimérico USP em *A. mellifera* e em duas abelhas nativas *Scaptotrigona depilis* e *Melipona scutellaris* (Aleixo Silva et al, 2006).

Estes resultados podem ser explicados pelas diferenças observadas entre a espécie estudada e as demais utilizadas para comparação, em relação à seqüência do domínio de união a ligante (LBD) de EcR. Essas diferenças podem ser observadas também em *gaps* que foram encontrados dentro deste domínio, como o que é compartilhado por todas as espécies exceto em Lepidoptera, aquele compartilhado por Hymenoptera, Coleoptera e Orthoptera, aquele *gap* compartilhado apenas pelas espécies não Diptera/Lepidoptera, e *gaps* menores como o que foi observado em duas espécies de Lepidoptera (*B. mori* e *H. virescens*), outro compartilhado por três Diptera (*D. melanogaster*, *L.*

*cuprina* e *C. capitata*), além de outro que foi encontrado somente em *C. pugillator* (Decapoda). Estes *gaps* podem ter um significado evolutivo, refletindo diferentes taxas de evolução da proteína nos diferentes grupos, e mesmo do domínio em que foram encontrados, pelo fato de que ele está envolvido na união a ligante e esta capacidade ter surgido várias vezes independentemente ao longo da evolução dos receptores (Escriva et al., 2000; Bonneton et al., 2003). Algo semelhante ao resultado obtido, com Díptera e Lepidoptera se separando dos demais insetos e artrópodes, foi observado para USP, um receptor nuclear membro da SRN, parceiro heterodimérico de EcR, no receptor de ecdisona. Em *A. mellifera* e em duas abelhas nativas, *Scaptotrigona depilis* e *Melipona scutellaris*, análises comparativas mostraram também uma divergência entre LBD de dípteros/lepidópteros e as demais espécies comparadas que incluía insetos não dípteros/lepidópteros, crustáceos e vertebrados (que possuem RXR - ortólogo de USP). Através de construções filogenéticas observou-se, assim como visto neste trabalho, um agrupamento entre dípteros e lepidópteros e separação deste grupo daqueles formados pelas demais espécies (Aleixo Silva et al., 2007). Pode-se então sugerir que este domínio, mesmo em diferentes receptores, evoluiu de forma distinta entre as espécies, possivelmente pela grande diversidade de ligantes existentes e utilizados por cada uma delas ou também pelo fato de que a característica de união a ligante tenha surgido diversas vezes, de maneira independente, ao longo da evolução (Escriva et al., 1997; Escriva et al., 2000).

Através de Northern Blot foi observado que *EcR* de *Apis mellifera*, um gene de cópia única, parece não dar origem a isoformas. Este resultado não se assemelha ao que foi encontrado em outras espécies, para as quais *EcR* também está presente como cópia única, mas dá origem mais de um transcrito, como em *Tenebrio molitor* em que *EcR* possui duas isoformas (Mouillet et al., 1997) e em *Drosophila melanogaster* a qual possui três diferentes isoformas (Yao et al., 1993; Talbot, 1993). Essa característica torna-se também surpreendente, pois o parceiro heterodimérico de *EcR* na proteína que dá origem ao receptor funcional de ecdisona, *usp*, em *A. mellifera* foi caracterizado como gene de cópia única que dá origem, através de *splicing* alternativo, a dois diferentes transcritos que são capazes de se dimerizar com *EcR* e desempenhar sua função no receptor (Barchuk et al., 2004). A busca no genoma de *Nasonia vitripennis* (<http://zulu.fmrp.usp.br/beelab>), outro himenóptero, cujo genoma disponibilizado recentemente, ainda não foi totalmente anotado, também forneceu o mesmo resultado.



Análises comparativas com o genoma desta vespa indicou similaridade com a seqüência de *EcR* da abelha. No entanto, percebeu-se que neste inseto também não há indícios da presença de isoformas, pois nestas comparações foi obtido apenas um resultado em que há similaridade alta com a seqüência de *A. mellifera*, mesmo quando a seqüência utilizada para a comparação era aquela que foi depositada no GenBank (por Paul et al. – não publicado; AB 267886) determinada como sendo isoforma A desta espécie. Esta seqüência determinada não possui 100% de identidade com a seqüência descrita neste trabalho e comparações com a base de dados *Official Set* (<http://zulu.fmrp.usp.br/beelab>) mostraram que ela também não indica a existência de isoformas. Resultado semelhante foi observado quando a seqüência de *A. mellifera* foi comparada com a isoforma A de *EcR* de *Pheidole megacephala* (GenBank AB194765), que também é um himenóptero. Embora haja outra seqüência disponível no banco de dados para *EcR* desta espécie, que é determinada como isoforma B (GenBank AB194766), ela está apenas parcialmente seqüenciada e não possui homologia com a isoforma A deste inseto, nem com a seqüência de *A. mellifera*. Tais evidências nos permitem sugerir que o gene estudado neste trabalho não dá origem a diferentes transcritos.

## 7.2 SOBRE O PERFIL DE EXPRESSÃO DE *EcR* DURANTE O DESENVOLVIMENTO

Os perfis de expressão de *EcR* durante o desenvolvimento de fêmeas *Apis mellifera* apresentam importantes picos de expressão que mostram uma correspondência geral com os títulos de ecdisteróides apresentados pelas castas de *Apis mellifera* (Hartfelder and Engels, 1998) e concordando com o que foi proposto por alguns autores que os ecdisteróides são capazes de induzir a expressão dos seus receptores em várias espécies (Karim & Thummel, 1992; Imhof et al., 1993; Jindra et al., 1996; Vafopoulou et al., 2005). Em operárias, o pico encontrado em PP1 (pré-pupa 1) e aquele encontrado em PP3 em rainhas, podem sugerir uma resposta tardia a títulos hormonais elevados, talvez até uma sinergia entre os dois hormônios morfogenéticos (20E e HJ) que em uma fase anterior se encontram em níveis elevados. Algo semelhante foi observado em *D. melanogaster* (Talbot et al., 1993) *M. sexta* (Fujiwara et al., 1995) e *C. capitata* (Verras et al., 1999), nos quais os níveis de expressão de *EcR*

aumentam gradativamente desde o final do estágio larval, alcançando um nível máximo em PP2, estágio após o qual esses níveis decrescem.

Em pupas, tanto de rainhas como de operárias, a expressão de *EcR* apresenta flutuações, aumentando também gradativamente até Pb, onde atinge novamente níveis de expressão significativamente altos. Nesta fase, os picos de expressão de *EcR* observados em ambas as castas coincidem com o maior pico de ecdisteróides encontrado em ambas, localizado na metade do período pupal, no estágio de pupa de olho marrom (Pb). Em operárias, no final do período pupal foi encontrado um quarto pico, com seu nível máximo em recém nascidas. Porém, os níveis de expressão relativos de *EcR* são bem maiores que os encontrados em pupas, apesar de os títulos de ecdisteróides para operárias nessa fase estarem relativamente baixos. Tais dados sugerem que pode estar havendo sinergia entre 20E e HJ, pois nesta fase os níveis de ambos se encontram em ascensão. Neste sentido, experimentos realizados *in vitro* com aplicação concomitante de 20E e HJ em células Sf9 (linhagem celular de *Spodoptera frugiperda*) transfectadas com um promotor repórter (DR1JHE-*CoreLuciferase*), comparando-se com aplicação independente de ambos, mostraram que apesar de os níveis de expressão aumentarem após aplicação independente, após aplicação simultânea dos hormônios houve um aumento nos níveis de expressão significativamente maior, sugerindo sinergismo entre eles (Fang et al., 2005). Recentemente um gene alvo específico para o sinergismo entre 20E e HJ foi encontrado em *Drosophila*, o E75A (Dubrovsky et al., 2004). Em rainhas também há um pequeno pico de expressão no final do estágio pupal entre Pbl e Pbm, mas claramente bem menos pronunciado e anterior ao observado em operárias. Esta diferença pode refletir indiretamente os distintos papéis que cada uma das castas irá desempenhar após a emergência, relacionados ao seu comportamento. As rainhas irão desempenhar unicamente a função reprodutiva enquanto que as operárias irão desempenhar diferentes funções para manutenção da colônia ao longo de sua vida. Operárias adultas são consideradas mais complexas morfológica e comportamentalmente que rainhas (Michener, 1974), o que as torna capaz de desempenhar inúmeras atividades dentro e fora da colônia e mesmo se envolver em tarefas reprodutivas quando elas são requeridas (na ausência da rainha uma operária jovem ativa seus ovários a põe ovos) (Barchuk et al., 2007). Os diferentes picos de expressão encontrados nas castas podem também ter uma relação com a síntese de vitelogenina que em rainhas

pode ser detectada antes, em Pbm, do que se detecta em operárias, em Pbd ou mais tarde, e que é inibida por altos níveis de ecdisteróides (Barchuk et al., 2002). Esta é a proteína reprodutiva na maioria das fêmeas de insetos (Spieth et al., 1991) e seus níveis hemolinfáticos estão correlacionados com o tamanho (número de ovariolos) e ativação do ovário em operárias (Amdam et al., 2006a), além de influenciar a ontogenia social (Guidugli et al., 2005; Amdam et al., 2006a) e a longevidade das abelhas (Amdam et al., 2006b). Em relação ao sinergismo encontrado em operárias e não em rainhas, nelas *EcR* não respondeu ao tratamento com 20E, podemos dizer que diferentes co-fatores que podem estar influenciando uma casta e não a outra. Um dos fatores que podem estar influenciando tais resultados é o *usp*. Após tratamento em rainhas e operárias em pupas (Pbm e Pbd), com 20E, este gene também não apresenta resposta a este hormônio, mas diferentemente de *EcR*, nas duas castas foi observado este mesmo resultado. Mas, quando o tratamento foi com HJ, ambas as castas responderam de maneira semelhante ao tratamento. Analisando o perfil de *usp* durante o estágio pupal nas diferentes castas, observa-se que em operárias os níveis de expressão são relativamente mais altos que em operárias (Guidugli et al., 2005), o que também pode ter alguma relação, mesmo que indireta com os resultados encontrados para aplicação de hormônios em rainhas e operárias.

Os picos de expressão de *EcR* descritos acima, nos quais ocorre expressão máxima de *EcR*, em rainhas e operárias, que estão localizados em fases pré-metamórficas, quando podem ser necessários para as mudanças condizentes com a metamorfose, também foram observados em *D. melanogaster* e *M. sexta* (Koelle et al., 1991; Talbot et al., 1993; Fujiwara et al., 1995). O pico de expressão encontrado em operárias na fase F1 (5º instar larval, fase de alimentação 1). Nenhum correspondente deste pico foi encontrado no perfil de *EcR* em rainhas pois após o pico encontrado em L2, os níveis de expressão permanecem praticamente constantes até atingir um novo pico em PP3.

Além destes, foram observados um pico de expressão de *EcR* em L3 de operárias e outro em L2 de rainhas. Estes picos parecem não ter correspondência com os títulos de ecdisteróides apresentados por *A. mellifera*, pois tais hormônios encontram-se em níveis praticamente indetectáveis durante a fase larval em que foram observados, L2 e L3. Ao contrário, eles sugerem uma relação com os títulos de HJ, presente em concentrações

relativamente altas durante estas duas fases do desenvolvimento (Hartfelder & Engels, 1998), embora em níveis muito maiores em rainhas, o que não parece influenciar no nível de expressão de *EcR* durante este pico. Apesar de ocorrerem em fases distintas, ainda que próximas, nas duas castas, estes picos de expressão do gene podem ser equivalentes, eles podem estar influenciando tardiamente os níveis de HJ encontrados entre L4 e L5 (fases de F1 a S3), embora mais pronunciado em rainhas, que coincidem com o período sensível a HJ necessário para a indução de caracteres de rainha (Nijhout & Wheeler, 1982).

### 7.3 INFLUÊNCIA HORMONAL NA EXPRESSÃO DE *EcR*

#### 7.3.1 TRATAMENTO COM 20E (20-HIDROXIECDISONA)

Foram feitos experimentos independentes, *in vivo*, de injeção ou aplicação tópica dos hormônios ecdisona e hormônio juvenil, respectivamente, em Pupas de olho marrom (Pb). Estes experimentos foram realizados para testar a possível alteração na expressão de *EcR*, em corpo gorduroso, por estes hormônios e, se houvesse, qual seria o tempo necessário para que ela ocorresse. Além disso, para obter informação sobre a biologia do gene, como o controle de sua expressão por fatores regulatórios mediados por elementos de resposta a hormônios e também para compreender o significado do seu perfil de expressão normal e eventuais relações com eventos importantes no desenvolvimento das abelhas e processos de diferenciação de castas.

Em operárias foi observado um aumento nos níveis de expressão do gene nas amostras tratadas com 20E, e esse aumento foi mais expressivo nas amostras mantidas 1h após aplicação do hormônio, sendo que há uma posterior queda nestes níveis apresentados pelas amostras mantidas por mais tempo (12h, 24h, 48h) após tratamento com hormônio. Estes resultados sugerem que a resposta ao aumento na concentração de 20E é rápida e que entre este tempo e os demais, em que os níveis de expressão de *EcR* caem, há algum fator agindo, para que esta queda ocorra, como por exemplo enzimas que degradam este hormônio ou co-reguladores. Em *Manduca sexta*, foi também observado um aumento na expressão de *EcR* após injeção de 20E (Riddiford & Truman, 1994). Experimentos *in vitro* com

glândulas da seda e *in vivo* em larvas de *Bombyx mori* incubadas com 20E, também demonstraram que tal hormônio exerce regulação positiva na expressão de *EcR* nesta espécie (Sekimoto et al., 2006; Hossain et al., 2006), sendo que nos experimentos *in vitro* também foi observada uma subsequente queda nos níveis de expressão. A partir desses resultados podemos sugerir que a expressão de *EcR* tenha uma correlação com 20E, de acordo com a concentração do hormônio (Verras et al., 1999; Beckstead et al., 2005; Vafopoulou, et al., 2005), e possivelmente com o tempo no qual ele age. Experimentos de indução no aumento dos títulos de 20E, *in vitro* em células de *D. melanogaster* e *S. frugiperda*, demonstraram que uma super-expressão de *EcR* causa acréscimo na heterodimerização de *EcR/USP* e também é responsável por um aumento significativo na união do heterodímero a DNA, aumentando assim a resposta transcricional ao tratamento com este hormônio (Wang et al., 2000; Fang et al., 2005), o que pode explicar a elevação inicial nos níveis de expressão de *EcR*. Os resultados obtidos demonstram também que *EcR* é um gene inicial (*early gene*) na cascata de expressão gênica desencadeada por ecdisona. Sua expressão é estimulada diretamente pelo hormônio, e as proteínas resultantes reprimem a expressão do gene e ativam a expressão de genes tardios (*late genes*) (Ashburner et al., 1974; Thummel et al., 1990).

Em rainhas os resultados obtidos para o tratamento com 20E foram completamente diferentes do que foi observado em operárias. Em nenhum dos intervalos de tempo, nos quais as pupas foram submetidas ao tratamento, houve aumento estatisticamente significativo, com 95% de confiança, nos níveis de expressão de *EcR*. Este fato pode ser devido à quantidade, em  $\mu\text{g}$ , de 20E injetada, isto é, porque os títulos de ecdisteróides em rainhas sejam evidentemente mais elevados que em operárias durante todo o desenvolvimento, poder-se sugerir que a quantidade de 20E utilizada no tratamento (5  $\mu\text{g}$ ) não foi suficiente para estimular um aumento significativo nos níveis de expressão de *EcR* em rainhas, semelhante ao que houve em operárias, embora os níveis deste hormônio sejam relativamente altos nesta fase. Os intervalos de tempo aos quais os indivíduos foram expostos ao tratamento possivelmente não foi um fator determinante para esses resultados em que não houve aumento na expressão do receptor do hormônio. Pois, pelo menos os maiores intervalos seriam, supostamente, suficientes para que ocorra uma mudança na expressão gênica se este fosse o caso. Uma outra possível explicação pela não indução da expressão de *EcR* em rainhas se deve ao fato de que foi analisada a

expressão apenas em corpo gorduroso. Neste órgão ocorre a síntese de vitelogenina (vg), cuja expressão é estimulada por HJ, mas é reprimida por altos níveis de ecdisteróides (Barchuk et al., 2002). Em experimentos de *Knock-down* de vg, em operárias, foi observado que os indivíduos tratados possuíam níveis aumentados de HJ e também na expressão de *usp* (Guidugli et al., 2005). Tais resultados sugerem uma indireta participação de vg e USP na regulação da expressão de *EcR* em corpo gorduroso. Sendo que os níveis de expressão de vg podem influenciar os títulos de HJ, que aumentados irão estimular a expressão de *usp*, considerado um gene inicial na cascata regulatória ativada por este hormônio e conseqüentemente, após certo tempo, estimular a expressão de genes tardios nesta cascata, que são estimulados por proteínas produzidas pelos genes iniciais (Guidugli et al., 2005; Zhu et al., 2003). Entre estes genes tardios, *EcR* pode ser considerado e pode-se sugerir que *usp*, enquanto seu parceiro no receptor e um gene inicial, pode estar influenciando um aumento em sua expressão. Sabe-se que diferentes tecidos respondem de maneira distinta aos níveis endógenos de hormônios, podendo manter a expressão gênica durante um intervalo de tempo e depois cessá-la em resposta a outros fatores (Vafopoulou et al., 2005). Além disto, as diferenças entre as duas castas estabelecidas na fase larval através da expressão diferencial de genes, possivelmente prevalecem na vida adulta, o que leva rainhas e operárias a responderem, a um mesmo estímulo, usando as cascatas gênicas ativadas no passado.

### 7.3.2 TRATAMENTO COM HJ (HORMÔNIO JUVENIL)

Em operárias tratadas com HJ, observou-se que não houve diferença significativa entre controle e tratamento após 1h de aplicação do hormônio. Tal resultado pode ser explicado pelos baixos níveis desse hormônio durante a fase que foi utilizada para os experimentos (Pb) (Hartfelder & Engels, 1998). É provável que devido a esses baixos níveis, há uma demora na resposta, pois as amostras controle e tratada, após 12h, 24h e 48h de aplicação, mostraram significativa diferença. Nota-se que há um aumento gradativo nos níveis de expressão gênica entre 12h e 24h e uma ligeira queda após 48h de tratamento. Esse efeito sugere que *EcR* tem uma resposta mais lenta e evidentemente menos clara e pronunciada a HJ, quando comparada à resposta obtida com aplicação de 20E nesta casta.

Possivelmente isto se deve ao fato de que 20E se liga diretamente ao dímero EcR/USP, induzindo assim a expressão de EcR. O HJ, por outro lado, exerceria sua ação de maneira indireta, atrasando assim o aparecimento de seus efeitos na expressão de *EcR*. Os resultados obtidos através dos tratamentos hormonais, que mostram aumentos nos níveis de expressão de *EcR* após 12h, 24h e 48h, podem ser comparados aos resultados obtidos por um experimento de aplicação de HJ em *Apis mellifera* para determinar alteração na expressão de *usp*, o parceiro de *EcR* no receptor de ecdisona. Nele foi observado que um aumento artificial na concentração endógena de HJ, causa aumento na expressão de *usp* após 1,5h a 4,5h, sendo que depois de aproximadamente 5h de tratamento, uma diminuição é observada (Barchuk et al., 2004), sugerindo que a expressão de *usp*, sendo modulada por HJ, pode estar influenciando a expressão de *EcR* após 12h de tratamento. Como o HJ se liga a homodímeros de USP, um aumento artificial em sua concentração endógena, pode causar inicialmente elevação nos níveis de expressão de *usp* (Jones et al., 2001; Fang et al., 2005). Então, é provável que 1h de aplicação não seja suficiente para promover um aumento significativo na expressão de *EcR*. Porém, após 12h, os níveis aumentados de USP poderiam estar influenciando uma modulação positiva de *EcR*, pois já foi demonstrado, em experimentos *in vitro* com células Sf9 transfectadas com dUSP (USP de *D. melanogaster*), que a transdução de sinal por HJ através de USP, é aumentada pela super-expressão do gene (Fang et al., 2005). Além disso, enquanto *EcR* é um gene inicial na hierarquia regulatória de 20E (Ashburner, 1974), ele pode ser considerado um gene tardio na cascata regulada por HJ (Zhu et al., 2003). Em *A. aegypti*, a capacidade dos genes de responder a 20E na cascata regulatória se correlaciona com o pulso pré-vitelogênico de HJ. Além disso, todos os genes desta cascata alcançam sua responsividade máxima após exposição a títulos máximos de HJ (Zhu et al., 2003). Como pode ser observado, genes iniciais e tardios são diferencialmente regulados pelos dois hormônios morfogenéticos. Além disso, experimentos de aplicação de HJ em larvas de operárias de *A. mellifera* e posterior experimento de *microarray* mostraram que 52 genes (dos mais de 6.000 testados) fazem parte do caminho de ação do HJ, especificamente durante o período crítico do desenvolvimento de castas. Sete dos quais responderam ao tratamento após 1h de aplicação de HJ e 45 responderam após 24h (Barchuk et al. 2007). Através destes resultados, pode-se inferir que a hierarquia regulatório do HJ, também ocorre, pois os genes que respondem 1h após o tratamento podem ser considerados

iniciais e os que respondem somente após 24h, podem ser considerados tardios. *EcR* pode ser um destes genes que respondem tardiamente estimulado pela cascata de regulação por HJ. Em rainhas o que foi observado foi semelhante. Após 1h de tratamento com HJ, não foi observada diferença estatística significativa entre controle e tratamento, podendo também ser explicada pelos baixos níveis deste hormônio encontrados na fase utilizada no tratamento ou pelo fato de *EcR* ser considerado um gene tardio regulado por este hormônio (Zhu et al., 2003). Após 12h e 24h, os níveis de expressão de *EcR* aumentaram e apresentaram diferenças significativas entre controle e tratamento. Sugerindo que em rainhas, assim como em operárias, a expressão deste gene pode estar sofrendo influência pela expressão de seu parceiro heterodimérico que se liga a HJ, sendo modulado pelos níveis deste hormônio. E finalmente, após 48h de tratamento, apesar de apresentar queda nos níveis de expressão, semelhante ao que ocorre em operárias, não há diferença estatisticamente significativa entre controle e tratado após esse intervalo de exposição ao tratamento. Através dessa diferença entre rainhas e operárias, pode-se sugerir que em rainhas a forma pela qual o hormônio é degradado para que haja uma diminuição em seus níveis e conseqüentemente decréscimo na expressão dos receptores é mais rápida e, portanto mais eficiente, fazendo com que após 48h os níveis endógenos do hormônio, artificialmente alcançados, voltem ao normal.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aleixo Silva, A.C.; Mello, T.R.P., Barchuk, A.R.; Simões, Z.L.P.** (2007) *ultraspiracle* of the stingless bees *Melipona scutellaris* and *Scaptotrigona depilis*: cDNA sequence and expression profiles during pupal development. *Apidologie*, submetido.
- Amdam, G.V.; Csondes, A.; Fondrk, M.K; Page, R.E.** (2006a) Complex social behavior derived from maternal reproductive traits. *Nature*, 439:76-78.
- Amdam, G.V.; Norberg, K.; Page, R.E.; Erber, J.; Scheiner, R.** (2006b) Downregulation of vitellogenin gene activity increases de gustatory esponsiveness of honeybee workers (*Apis mellifera*). *Behav. Brain Res.*, 169:201-205.
- Ashburner, M.; Chihara, C.; Meltzer, P; Richards,G.** (1974) Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Qnat. Biol.*, 38:655-662.
- Barchuk, A. R.; Bitondi, M. M.G.; Simões, Z. L. P.** (2002). Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, 2: 1-8.
- Barchuk, A. R.; Maleszka, R.; Simões, Z. L.P.** (2004). *Apis mellifera ultraspiracle*: cDNA sequence and rapid up-regulation by juvenile hormone. *Insect Mol Biol.* 13:459-467.
- Barchuk, A.R.; Cristino, A.S.; Kucharski, R.; Simões, Z.L.P.; Maleszka, R.** (2007) Molecular determinants of alternative polyphenism in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev. Biol.*, submetido.
- Beato, M.** (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56:335-344.
- Beckstead, R.B.; Lam, G.; Thummel, C.S.** (2005). The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Genome Biology* 6:R99.
- Billas, I.M.L.; Iwema, T.; Garnier, J.-M.; Mitschler, A.; Rochel, N.; Moras, D.** (2003). Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor. *Nature* 426, 91–96.
- Bitondi, M. M.G. and Simões, Z. L. P.** (1996). The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers. *Journal of Apicultural Research* 35:27-36.
- Bitondi, M. M.G; Mora, I.M.; Simoes, Z.L.P.; Frigueiredo, V.L.C.** (1998) The *Apis mellifera* pupal melanization program is affected by treatment with juvenile hormone analog. *J. Insect Physiol.*, 44:499-507.

- Bonneton, F.; Zelus, D.; Iwema, T.; Robinson-Rechavi, M.; Laudet, V.** (2003). Rapid divergence of the ecdysone receptor in Diptera and Lepidoptera suggests coevolution between ECR and USP-RXR. *Mol Biol Evol.* 20(4):541-53.
- Bownes, M.** (1994). The regulation of the yolk protein genes, a family of sex differentiation genes in *Drosophila melanogaster*. *Bio Assays* 16:745-752.
- Chawla, A.; Repa, J.J.; Evans, R.M.; Mangelsdorf, D.J.** (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening X-files. *Science*, 294:1866-1870.
- Cherbas, P.** (1993) The Ivth Karlson Lecture: Ecdysone-responsive genes. *Biochem. Mol. Biol.*, 23:3-12.
- Cho, W.L.; Kapitskaya, M.Z.; Raikhel, A.S.** (1995) Mosquito ecdysteroid receptor: analysis of the cDNA and expression during vitellogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25:19-27.
- Davis, R. E.; Kelly, T. J.; Masler, E.P.; Fescemyer, H. W.; Thyagaraja, B. S. and Borkovec, A. B.** (1990). Hormonal control of vitellogenesis in the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.): Suppression of haemolymph vitellogenin by the juvenile hormone analogue, methoprene. *Journal of Insect Physiology* 36:231-238.
- Doesburg, P.; Kuil, C.W.; Berrevoets, C.A.; Steketee, K.; Faber, P.W.; Mulder, E.; Brinkmann, A.O.; Trapman, J.** (1997). Functional in vivo interaction between the amino-terminal, transactivation domain and the ligand binding domain of the androgen receptor. *Biochemistry* 36, 1052–1064
- Dubrovsky, E.B.; Dubrovskaya, V. A.; Berger, E.M.** (2004) Hormonal regulation and function role of *Drosophila* E75A orphan nuclear receptor in the juvenile hormone signaling pathway. *Dev Biol* 268: 258-270.
- Escriva, H.; Safi, R.; Hänni, C.; Langlois, M-C.; Saumitou-Laprade, P.; Stehelin, D.; Capron, A.; Pierce, R.; Laudet, V.** (1997) Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 94:6803-6808.
- Escriva, H.; Delaunay, F.; Laudet, V.** (2000) Ligand binding and nuclear receptor evolution. *BioEssays*, 22:717-727.
- Evans, R. M.** (1988). The steroid and Thyroid hormone receptor Superfamily. *Science* 240: 889-895.
- Fang, F.; Xu, Y.; Jones, D.; Jones, G.** (2005) Interactions of ultraspiracle with ecdysone receptor in the transduction of ecdysone- and juvenile hormone-signaling. *FEBS J* 272: 1577-1589.

- Freedman, L.P.** (1992). Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev.* 13(2):129-45.
- Fujiwara, H.; Jindra, M.; Newitt, R.; Palli, S.R.; Hiruma, K.; Riddiford, L.M.** (1995). Isolation and development expression of the ecdysone receptor gene in wings of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25:845-856.
- Giguère, V.** (1999). Orphan Nuclear receptors: from gene to function. *Endocrine Reviews*, 20(5):689-725.
- Gilbert, S. F.** (1994). *Developmental Biology*. 4ª edição. Sinauer, USA
- Grad, I.; Kochman, M.; Ozyhar, A.** (2002). Functionality versus strength - has functional selection taken place in the case of the ecdysteroid receptor response element? *Acta Biochem Pol.* 49(3):747-56.
- Grebe, M.; Przibilla, S.; Henrich, V.C.; Spindler-Barth, M.** (2003). Characterization of the ligand binding domain of the ecdysteroid receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biol. Chem.* 384,105–116
- Green, S. and Chambon, P.** (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.*, 4: 309-314.
- Guidugli, K.R.; Nascimento, A.M.; Amdam, G.V.; Barchuk, A.R.; Omholt, S.; Simões, Z.L.P.; Hartfelder, K.H.** (2005) Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters*, 579: 4961–4965
- Guo, X.; Harmon, M.A.; Laudet, V.; Mangelsdorf, D.J.; Palmer, M.J.** (1997) Isolation of a functional ecdysteroid receptor homologue from the ixodid tick *Amblyomma americanum* (L.) *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27(11): 945-962.
- Hartfelder, K.; Engels, W.** (1998). Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Current Topics in Developmental Biology* 40:45-77.
- Henrich, V .C.; Brown, N. E.** (1995) Insect Nuclear Receptors: A developmental and comparative perspective. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25: 881-897.
- Hiremath, S.; Jones, D.** (1992). Juvenile hormone regulation of vitellogenin in the gypsy moth, *Lymantria dispar*: suppression of vitellogenin mRNA in the fat body. *Journal of Insect Physiology* 38:461-474.

- Horn, D. H. S.; Middleton, E. J.; Wunderlich, J. A. and Hampshire, E.** (1966). Identity of the molting hormones of insects and crustaceans. *Chem. Commun.* 339-340.
- Hossain, M.; Shimizu, S.; Fujiwara, H.; Sakurai, S.; Iwami, M.** (2006) EcR expression in the prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells of the *Bombyx mori* brain. *FEBS Journal* 273:3861-3868.
- Hu, X.; Cherbas, L.; Cherbas, P.** (2003) Transcription activation by the ecdysone receptor (EcR/USP): identification of activation functions. *Mol Endocrinol* 17(4):716-731.
- Imhof, M.O.; Rusconi, S. and Lezzi, M.** (1993). Cloning of a *Chironomus tentans* cDNA encoding a protein (cEcRH) homologous to the *Drosophila melanogaster* ecdysteroid receptor (dEcR). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23:15-124.
- Jiang, C.; Baehrecke, E.H.; Thummel, C.S.** (1997) Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development*, 124:4673-4683.
- Jindra, M.; Malone, F.; Hiruma, K.; Riddiford, L.M.** (1996). Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol* 180:258-72.
- Jones, G.; Wozniak, M.; Chu, Y.; Dhar, S.; Jones, D.** (2001) Juvenile hormone III-dependent conformational changes of the nuclear receptor ultraspiracle. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 33-49.
- Karim, F. D.; Thummel, C.S.** (1992) Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. *EMBO J.* 11, 4083-4093.
- Koelle, M. R.; Talbot, W. S.; Segraves, W. A.; Bender, M. T.; Cherbas, P.; Hogness, D. S.** (1991). The *Drosophila EcR* gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 67: 59-77.
- Koslova, T.; Thummel, C. S.** (2002). Spatial patterns of ecdysteroid receptor activation during the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Development* 129:1739-1750.
- Kothapalli, R.; Palli, S. R.; Ladd, T. R.; Sohi, S. S.; Cress, D.; Dhadialla, T. S.; Tzertzinis, G.; Retnakaran, A.** (1995). Cloning and developmental expression of the ecdysone receptor gene from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Developmental Genetics* 17:319-330.

- Kraus, L.W., McInerney, E.M. & Katzenellenbogen, B.S.** (1995) Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxy-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92:12314–12318.
- Kumar, R.; Baskakov, I.V.; Srinivasan, G.; Bolen, D.W.; Lee, J.C.; Thompson, E.B.** (1999) Interdomain signaling in a two-domain fragment of the human glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 24737–24741.
- Kumar, R.; Thompson, E.B.** (2004). Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator. *Mol. Endocrinol.* 17:1–10.
- Lan, Q.; Hiruma, K.; Hu, X.; Jindra, M. and Riddiford, L. M.** (1999). Activation of a delayed-early gene encoding MHR3 by the ecdysone receptor heterodimer EcR-B1 – USP-1 but not by EcR-B1 – USP-2. *Molec. Cell. Biol.* 19:4897-4906.
- Lewin, B.** (2000). Genes VII. Oxford University Press Inc., New York.
- Lezzi, M.; Bergman, T.; Henrich, V.C.; Vogtli, M.; Fromel, C.; Grebe, M.; Przibilla, S.; Spindler-Barth, M.** (2002). Ligand induced heterodimerization between the ligand binding domains of the Drosophila ecdysteroid receptor and ultraspiracle. *Eur. J. Biochem.* 269, 3237–3245.
- Lourenço, A.P.; Zufelato, M.S.; Bitondi, M.M.G.; Simões, Z.L.P.** (2004) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the prophenoloxidase from *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(6):541-552.
- Malun, D.; Moseleit, A.; Grünewald, B.** (2003) 20-Hydroxyecdysone inhibits the mitotic activity of neuronal precursors in the developing mushroom bodies of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Neurobiol.*, 57(1):1-14.
- Mangelsdorf, D.J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herlich, P.; Schütz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P. and Evans, R.M.** (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83:835-839.
- Martinez, A.; Scanlon, D.; Gross, B.; Perera, S.C.; Palli, S.R.; Greenland, A.J.; Windass, J.; Pongs, O.; Broad, P.; Jepson, I.** (1999). Transcriptional activation of cloned *Heliothis virescens* (Lepidoptera) ecdysone receptor (HvEcR) by Muristerone A. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29:915-930.

- Michener, C.D.** (1974) The social behavior of the bees. A comparative study. *Harvard Press*, Massachusetts.
- Mouillet, J.F.; Delbecque, J.P.; Quenedey, B.; Delachambre, J.** (1997). Cloning of two putative ecdysteroid receptor isoforms from *Tenebrio molitor* and their developmental expression in the epidermis during metamorphosis. *Eur J Biochem.* 248:856-863.
- Nijhout, H.F.; Wheeler, D.E.** (1982) Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. *Quart Rev Biol* 57:109-133.
- Nijhout, H. F.** (1994). *Insects hormones*. Princeton University Press, New Jersey.
- Ohnishi, E.** (1987). Growth and maturation of ovaries in isolated abdomens of *Bombyx mori*: Response to ecdysteroids and other steroids. *Zoological Science* 4:315-321.
- Onate, S.A.; Boonyaratanakornkitt, V.; Spencer, T.E.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.-J.; Edwards, D.P.; O'Malley, B.W.** (1998). The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF-1) and AF-2 domains of steroid receptors. *J. Biol. Chem.* 273:12101–12108.
- Palli, S.R.; Hormann, R.E.; Schlattner, U.; Lezzi, M.** (2005). Ecdysteroid receptors and their applications in agriculture and medicine. *Vitam Horms* 73:59-100.
- Patrick, C.W. Jr; Zheng, B.; Wu, X.; Gurtner, G.; Barlow, M.; Koutz, C.; Chang, D.; Schmidt, M.; Evans, G.R.** (2001) Muristerone a-induced nerve growth factor release from genetically engineered human dermal fibroblasts for peripheral nerve tissue engineering. *Tissue Eng.* 7:303-311.
- Perlmann, T.; Rangarajan, P. N.; Umesono, K.; Evans, R. M.** (1993). Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev.* 7:1411–1422.
- Rembold, H.** (1976) Caste differentiation of the honeybee-Fourteen years of biochemical research at Martinsried. In Eder J and Rembold H (Eds). *Chemistry and Biology of social insects*. Verlag J. Peperny, Munchen, pp3-13.
- Riddiford, L. M.** (1976). Hormonal control of insect epidermal cell commitment in vitro. *Nature* 259: 115-117.
- Riddiford, L. M.** (1985). Hormone action at the cellular level. In Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (eds) *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Vol 8. Pergamon Press, Oxford, pp 37-83.

- Riddiford, L. M.** (1994). Cellular and molecular actions of Juvenile Hormone I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect Physiol* 24:213-274.
- Riddiford, L.M.; Truman, J.W.** (1994) Hormone receptor and orchestration of development during insect metamorphosis. *In Perspectives in Comparative endocrinology* (Editado por Davey, K.G.; Peter, R.E.; Tobe, S.S.) pp. 389-394. National Research Council of Canada
- Riddiford, L. M.** (1996). Molecular aspects of juvenile hormone action in insect metamorphosis, p.223-251. *In* L. I. Gilbert, J. R. Tata and B. G. Atkinson (cd.), *Metamorphosis: postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells*. *Academy Press, San Diego, Calif.*
- Riddiford, L.M.; Cherbas P.; Truman, J.W.** (2000). Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam Horm.* 60:1-73.
- Robinow, S.; Talbot, W. S.; Hogness, D. S.; Truman, J. W.** (1993). Programmed cell death in the *Drosophila* CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform. *Development* 119:1251-1259.
- Robinson, G.E.; Vargo, E.L.** (1997) Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: Gonadotropin and behavioral pacemaker. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 35: 559-583.
- Sakagami, S.F.** (1982) Stingless bees. *In Social Insects*. Vol.3 Ed. Hermann, H.R., Academic Press, New York, USA, 362-376.
- Sanger, F., Nicklen, S.; Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:54-63
- Schmidt Capella, I.C.; Hartfelder, K.** (1998) Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J. Insect Physiol.*, 44:385-391.
- Schmidt Capella, I.C.; Hartfelder, K.** (2002) Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of larval honey bee ovary. *Cell. Tissue Res.*, 307:265-272.
- Schwartz, L.M.; Truman, J.W.** (1983) Hormonal control of rates of metamorphic development in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev. Biol.*, 99(1):103-14.
- Segraves, W.A., Hogness, D.** (1990) The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of steroid superfamily. *Genes Dev.*, 4:204-219.



- Sekimoto, T.; Iwami, M.; Sakurai, S.** (2006) Coordinate responses of transcription factors to ecdysone during programmed cell death in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol* 15:281-292.
- Shu, S.; Park, Y. I.; Ramaswamy, S. B. and Srinivasan, A.** (1997). Hemolymph juvenile hormone titers in pupal and adult stages of southwestern corn borer [*Diatraea grandiosella* (Pyralidae)] and relationship with egg development. *Journal of Insect Physiology*, 43:719-726.
- Siussat, D.; Bozzolan, F.; Queguiner, I.; Porcheron, P.; Debernard, S.** (2004). Effects of juvenile hormone on 20-hydroxyecdysone-inducible EcR, HR3, E75 gene expression in imaginal wing cells of *Ploidia interpunctella* lepidoptera. *Eur. J. Biochem*, 271: 3017-3027.
- Spieth, J.; Nettleton, M.; Zuckeraprisson, E.; Lea, K.; Blumenthal, T.** (1991) Vitellogenin motifs conserved in nematodes and vertebrates. *J. Mol. Evol.*, 32:429-438.
- Swevers, L.; Drevet, J.R.; Lunke, M.D.; Iatrou, K.** (1995). The silkworm homolog of the *Drosophila* ecdysone receptor (B1 Isoform): Cloning and analysis of expression during follicular cell differentiation. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25:857- 866.
- Talbot, W. S.; Swyryd, E. A.; Hogness, D. S.** (1993). *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* 73:1323-1337.
- Thummel, C.S.; Burtis, K.C.; Hogness, D.S.** (1990) Spatial and Temporal Patterns of E74 transcription during *Drosophila* Development. *Cell*, 61:101-111
- Truman, J.W.; Talbot, W.S.; Fahrbach, S.E.; Hogness, D.S.** (1994). Ecdysone receptor expression in the CNS correlates with stage-specific responses to ecdysteroids during *Drosophila* and *Manduca* development. *Development* 120:219-234.
- Truss, M.; Beato, M.** (1993) Steroid hormone receptors: interaction with desoxyribonucleic acid and transcription factors. *End. Rev.*, 14:459-479.
- Tsai, M.J; O'Malley, B.W.** (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:451-486.
- Umesono, K. and Evans, R.M.** (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57: 1139-1146.
- Vafopoulou, X.; Steel, C.G.H.; Terry, K.** (2005) Ecdysteroid receptor (*EcR*) shows marked differences in temporal patterns between tissues during larval-adult development in *Rhodnius prolixus*: correlations with haemolymph ecdysteroid titers. *J Insect Physiol* 51: 27-38.

- Verras M, Mavroidis M, Kokolakis G, Gourzi P, Zacharopoulou A, Mintzas AC.** (1999). Cloning and characterization of CcEcR. an ecdysone receptor homolog from the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Eur J Biochem* 265:798-808.
- Wang, S.F.; Ayer, S.; Se Graves, W.A.; Williams, D.R.; Raikhel, A.S.** (2000). Molecular determinants of differential ligand sensitivities of insect ecdysteroid receptors. *Mol Cell Biol.* 20:3870-9.
- Wheeler, W. C.; Cartwright, P.; Hayashi, C. Y.** (1993) Arthropod phylogeny: a combined approach. *Cladistics* 9:1-39.
- Wheeler, W. C.; Whiting, M.; Wheeler, Q. D.; Carpenter, J. M.** (2001) The phylogeny of the extant hexapod orders. *Cladistics* 17: 113-169.
- Yao, T.P.; Sagraves, W. A.; McKeown, M.; Evans, R.M.** (1992). *Drosophila ultraspiracle* modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* 71:63-72.
- Yao, T.P.; Forman, B.M.; Jiang, Z.; Cherbas, L.; Chen, J.D.; McKeon, M.; Cherbas, P. & Evans, R. M.** (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and *Ultraspiracle* genes. *Nature* 366:476-479.
- Zechel, C.; Shen, X.-Q.; Chen, J.-Y.; Chen, Z.-P.; Chambon, P.; Gronemeyer, H .** (1994) The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J* 13:1425–1433.
- Zhu, J.; Miura, K.; Chen, L.; Raikel, A.S.** (2003) Cyclicality of mosquito vitellogenic ecdysteroid-mediated signaling is modulated by alternative dimerization of the RXR homologue *Ultraspiracle*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:544-549.
- Zufelato, M.S.; Bitondi, M.M.G.; Simões, Z.L.P; Hartfelder, K.** (2000) The juvenile hormone analog pyriproxyfen affects ecdysteroid-dependent cuticle melanization and shifts the pupal ecdysteroid peak in the honey bee (*Apis mellifera*). *Arthropod Structure Dev.*, 29:111-119.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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