UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RNAs de fita dupla oferecidos na dieta de larvas causam alterações fisiológicas no desenvolvimento das castas de *Apis mellifera*

FRANCIS DE MORAIS FRANCO NUNES

RIBEIRÃO PRETO, SP
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

FRANCIS DE MORAIS FRANCO NUNES

RNAs de fita dupla oferecidos na dieta de larvas causam alterações fisiológicas no desenvolvimento das castas de *Apis mellifera*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: GENÉTICA
Orientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

RIBEIRÃO PRETO, SP
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Nunes, Francis de Morais Franco

RNAs de fita dupla oferecidos na dieta de larvas causam alterações fisiológicas no desenvolvimento das castas de *Apis mellifera*, 2007.

117 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Simões, Zilá Luz Paulino

1. *Apis mellifera*. 2. Vitelogenina. 3. RNA de fita dupla. 4. Fisiologia. 5. Expressão gênica.

PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 2007.

DEDICATÓRIA

À Profa. Dra. Zilá Simões, pela paciência e conforto, pelos “causos mineiros” que me fizeram sentir sempre em casa, pela integridade e exemplo como pessoa e pesquisadora, por me fez reconhecer limites e tantas vezes superá-los, por me aconselhar com a sutiliza e enigmatismo de suas palavras, por me mostrar o valor da experiência e que o encanto do ser humano reside em suas diferenças, o que me fez perseverante.

Ao Daniel de Siqueira Maziero, pela compreensão e apoio irrestritos, pelo exemplo moral e simplicidade, por me fazer acreditar que tudo pode ser diferente quando estamos dispostos a crescer espiritualmente.

Aos extraordinários Dra. Idalina Souza, Profa. Dra. Maria Cristina Ramos Costa, MSc. Kátia Bernardeli, MSc. Simone Soares, Dra. Ana Paula de Oliveira Ribeiro, Dra. Bárbara Amélia Aparecida Santana, Dr. Fernando Henrique Biase, MSc. Fernando Lourenço Pereira, Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli e Profa. Dra. Ana Maria Bonetti, que excederam o sentido de nossas amizades e me estenderam suas mãos nas horas mais difíceis, abrindo mão de seus compromissos.

Ao papai José Antônio Franco Nunes, à mamãe Rosa Maria de Morais Franco Nunes, aos meus irmãos Francielle de Morais Franco Nunes Ferreira e Fernando de Morais Franco Nunes, aos meus cunhados Ricardo Carvalho Ferreira e Daniela Vaneli de Oliveira Franco Nunes, aos meus sobrinhos Natália Franco Ferreira e os que estão sob encomenda, às vovós Maria Abadia Carvalho Nunes e Tereza Terezinha de Moraes Souza, pela comunhão de nossas missões, tão diferentes, que nos uniu para cumpri-las, à luz do amor, nesta trajetória que nos ensina que a felicidade é uma decisão diária...

... dedico.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi e ao Prof. Dr. Klaus Hartfelder, pelas contribuições científicas e frutos ao longo do doutorado.

Ao Prof. Dr.Ademilson Espencer Egea Soares, ao Prof. Dr. David De Jong, à Profa. Dra. Marisa Ramos Barbieri e à Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi pelos estímulos recebidos nesses anos e presteza em que me atenderam em momentos de urgência.

Ao Prof. Dr. Fábio de Melo Sene, à Profa. Dra. Maura Helena Manfrin, à Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi, à Profa. Dra. Maria Helena Goldman, e seus respectivos alunos e funcionários, por abrirem as portas de seus laboratórios e fornecerem auxílio técnico-científico.

Ao Dr. Alexandre dos Santos Cristino, pela convivência madura e profissional, e seus ensinamentos que fizeram diferença na minha formação.

À equipe e amigos do laboratório, por terem proporcionado momentos de alegria e sabedoria. Em especial, Adelino Penatti, Adriana Mendes, Aline Aleixo, Aline Mackert, Amanda Assis, Ana Bomtorin, Ana Farnesi, Anete Lourenço, Angel Barchuk, Carlos Lobo, David Santos, Érica Tanaka, Fernanda Andrade, Flávia Freitas, Gesline Almeida, Geusa Freitas, Gustavo Mackert, Inês Capella, Jairo Souza, João Santos, José Esequiel Silva, Juliana Martins, Karina Lazzarini, Liliane Macedo, Luiz Aguiar, Marcela Laure, Michelle Morais, Michelle Soares, Mônica Florecki, Moysés Neto, Nínive Colonello, Roberta Tóvolli, Rodrigo Dallaqua, Rogério Pereira, Sérgio Azevedo, Tathyana Mello, Tiago Francoy, Vera Figueiredo, Weyder Santana.

À tia Divina Moraes, em nome de todos meus familiares, ao Aziz Mussa Neto e à Tatyana Almeida Silva, em nome de todos os meus amigos de Ituiutaba-MG e Uberlândia-MG, respectivamente, pelos créditos depositados, e pelas manifestações de carinho e respeito.

Ao Curso de Pós-graduação em Genética – FMRP/USP pela oportunidade, aos seus alunos e docentes pela convivência sadia e crescimento cooperativo e, em especial, às funcionários Maria Aparecida Oliveira Silva Elias e Susie Adriana Penha Nalon, as molas mestras desse conjunto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

Aos que não citei, as razões do esquecimento são tantas outras e, certamente, alheias ao meu profundo agradecimento às suas contribuições.

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade”.

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

RNAs de fita dupla oferecidos na dieta de larvas causam alterações fisiológicas no desenvolvimento das castas de *Apis mellifera*

Abelhas adultas produzem vitelogenina, a principal proteína da hemolinfa. Ela está envolvida na reprodução, comportamento, imunidade, longevidade e regulação da organização social. A interferência por RNA interference é a mais promissora ferramenta para estudos de função gênica, baseada na introdução de duplex de RNA (dsRNA) que induz a degradação de transcritos alvo-específicos. Injeção de dsRNA altera a transcrição de vitelogenina, mas evidências apontam que a ativação do sistema imune em abelhas seja um efeito colateral destaa manipulação. Desenvolvemos um método para o silenciamento do gene codificador de vitelogenina no desenvolvimento pós-embrionário, que minimiza os efeitos da manipulação, onde 0,5 μg de dsRNA de vitelogenina (dsVg) ou de GFP (controle exógeno, dsGFP) foi oferecido na dieta natural de larvas de segundo estágio, as quais foram mantidas na colônia. Nosso enfoque principal foi a compreensão dos efeitos do silenciamento pós-transcricional de rainhas e operárias de *A. mellifera*, em especial na fase larval. Operárias adultas reconhecem larvas tratadas e as remove. Mantemos certa distância entre as células de cria que recebiam o tratamento e a remoção de larvas tratadas diminuiu consideravelmente. A expressão de transcritos de vitelogenina em indivíduos sem tratamento e tratados foi analisada no quinto estágio larval de ambas as castas, bem como em operárias adultas de 7 dias e rainhas recém-nascidas, utilizando-se PCR em tempo real e a expressão do gene codificador de actina como controle endógeno. Em adultos, controles sem tratamento e dsGFP expressaram quantidades similares de transcritos de vitelogenina. Os grupos alimentados com dsVg tiveram expressão reduzida de vitelogenina, a saber: quinto estágio larval de operárias (91%) e de rainhas (71%), operárias de 7 dias (88%) e rainhas recém-nascidas (70%). O silenciamento da vitelogenina não afetou a morfologia dos adultos, mas sim a fisiologia de larvas de ambas as castas, como nos títulos de hormônio juvenil e concentração de proteínas circulantes na hemolinfa. Concluímos que a ingestão de dsRNA é um método não-invasivo que induz silenciamento gênico e, assim, uma ferramenta eficiente para estudos funcionais pós-genoma. Os mecanismos regulatórios do gene codificador de vitelogenina e seu papel na diferenciação de castas estão em discussão.

Palavras-chave: ingestão de RNAi, *Apis mellifera*, vitelogenina, expressão gênica.

ABSTRACT

Double-stranded RNA ingested by *Apis mellifera* larvae promotes phisiological disturbs in caste development

Adult bees produce vitellogenin (Vg), the main protein in hemolymph; it is involved in honey bee (*Apis mellifera*) reproduction, behavior, immunity, longevity and regulation of social organization. Genetic interference mediated by injection of double-stranded RNA (dsRNA) is a powerful tool for the analysis of gene function in *Apis mellifera*. Injection of dsRNA effectively alters vitellogenin transcription; however, evidence has been found of immune system activation in treated bees, which could be a collateral effect of treatment. Consequently, we developed a non-invasive protocol for disruption of the *A. mellifera* genes exemplified by vitellogenin mRNA silencing, to understand it, mainly, in the female larval context. Second instar larvae were treated as follows: the treatment group received 0,5 µg of double-stranded vitellogenin RNA (dsVg) mixed with larval food deposited in the worker brood cells; control group 1 was left to develop without treatment, while control group 2 received dsGFP (Green Fluorescent Protein), as an exogenous control. Treated and control larvae were maintained in the colony until adult emergence. Workers recognized dsRNA-treated larvae and frequently removed them. To circumvent this problem we increased the distance between the treatment groups. Vg gene expression were determined for fifth instar larvae of both castes and for 7 day-old workers and newly-emerged queens, evaluated by quantitative real time PCR, using actin as an endogenous control. For adults, we found that controls, dsGFP- and non-treated bees expressed similar amounts of Vg transcripts. The dsVg-fed groups had significantly reduced Vg gene expression in fifth instar larvae of workers (91%) and queens (71%) and, also, in 7 day-old workers (88%) and newly-emerged queens (70%). Disruption of the Vg gene did not affect adults morphology but physiological larval traits of both castes, as juvenile hormone titre and protein concentration. We conclude that dsRNA ingestion is an effective non-invasive method for inducing knockdown and an efficient approach for post-genome functional studies. The regulatory mechanisms of vitellogenin gene and its rules during caste differentiation are discussed.

Keywords: RNAi feeding, *Apis mellifera*, vitellogenin, gene expression.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO 12
1.1 – *Apis mellifera*: considerações gerais 12
1.2 – Mecanismos moleculares e respostas do sistema endócrino 15
1.2.1 – Determinação de castas 15
1.2.2 – Ação do hormônio juvenil 19
1.3 – Vitelogenina: características do gene, expressão e funções 22
1.4 – O genoma de *A. mellifera* e perspectivas sobre caracterização de funções gênicas.. 27
1.5 – Vitelogenina em larvas: um novo paradigma 29

2 – OBJETIVOS 31
2.1 – Geral 31
2.2 – Específicos 31

3 – MATERIAL E MÉTODOS 33
3.1 – Análises *in silico* 33
3.1.1 – Anotação do gene codificador de vitelogenina 33
3.1.2 – Busca por sítios de ligação de microRNAs 33
3.2 – Material biológico e obtenção de amostras com idade controlada 34
3.3 – Extração de RNA 36
3.4 – Síntese de cDNA de fita simples 38
3.5 – Síntese de RNA de fita dupla 39
3.5.1 – Oligonucleotídeos iniciadores 39
3.5.2 – Moldes 39
3.5.3 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e eletroforese 42
3.5.4 – Produção de RNA de fita dupla em larga escala 42
3.6 – Padronização do silenciamento do gene codificador de vitelogenina 43
3.7 – Registro da viabilidade dos tratamentos 44
3.8 – Definição das doses de RNA de fita dupla 46
3.9 – Expressão relativa do gene codificador de vitelogenina 46
3.9.1 – PCR quantitativa em tempo real 46

3.9.2 – Análise dos dados 48
3.10 – Coleta de hemolinfa e quantificação total de proteínas 49
3.11 – Eletroforese das amostras de hemolinfa 50
3.11.1 – Preparação de géis e tampões 50
3.11.2 – Preparação das amostras de hemolinfa e eletroforese 50
3.12 – Radioimunoensaio para quantificação de Hormônio Juvenil (HJ) 51
3.13 – Morfologia dos ovários e estruturas imaginais 53
3.14 – Análise estatística 53

4 – RESULTADOS 54
4.1 – Análises *in silico* 54
4.1.1 - Estrutura do gene codificador de vitelogenina 54
4.1.2 – Potenciais alvos regulatórios para microRNAs 55
4.2 – Obtenção de moléculas de RNA de fita dupla 56
4.3 – Delineamento experimental: alimentação de larvas L2 com dsVg 57
4.4 – Distribuição dos grupos tratados e controle, nos favos de cria 58
4.5 – Viabilidade dos grupos tratados e controles 58
4.6 – Produção de rainhas em estufa 60
4.7 – Desenvolvimento pós-embrionário de operárias sem tratamento e tratadas com RNA de fita dupla 64
4.8 – Desenvolvimento pós-embrionário de rainhas sem tratamento e tratadas com RNA de fita dupla 66
4.9 – Expressão do gene codificador de vitelogenina durante o desenvolvimento pós-embrionário de rainhas e operárias 66
4.10 – Expressão do gene codificador de vitelogenina em larvas de rainhas e operárias que se alimentaram de 0,5 μg de dsVg e seus controles 68
4.11 –Expressão gênica e proteica de vitelogenina em rainhas e operárias adultas que ingeriram 0,5 μg de dsVg e seus controles 70
4.12 – Perfil das proteínas da hemolinfa de rainhas e operárias que ingeriram 0,5 μg de dsVg e seus controles 72
4.13 – Peso de rainhas e operárias que ingeriram 0,5 μg de dsVg e seus controles 74
4.14 – Quantificação do hormônio juvenil em L5S2 de rainhas e operárias que ingeriram 0,5 μg de dsVg ou de dsGFP 75

4.15 – Morfologia dos apêndices de Op7d que ingeriram 0,5 µg de dsVg na fase larval e seus controles 76
4.16 – Morfologia dos ovários de OpRN que ingeriram 0,5 µg de dsVg na fase larval e seus controles 77

5 – DISCUSSÃO 78

6 – CONCLUSÕES 98

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 100

APÊNDICE

1 – INTRODUÇÃO

Insetos de um modo geral estão envolvidos em muitos aspectos da vida humana e apresentam importância ecológica e econômica inquestionável, como é o caso da ordem Hymenoptera. Segundo Danforth (2007) é quase impossível imaginar o mundo sem abelhas. *Apis mellifera* é um caso raro de um inseto que foi domesticado com sucesso; são excelentes polinizadores de ecossistemas naturais e agrícolas e exímios produtores de mel e outros produtos apícolas. Essa abelha, assim como outros insetos, apresenta questões fascinantes no que diz respeito à determinação de sexo (sistema haplodiplóide), ao polimorfismo facultativo das castas, ao polietismo etário e à divisão reprodutiva de trabalho, governados pelo sistema endócrino (revisões de Hartfelder e Engels (1998) Page e Peng, 2001). Apresenta também características únicas e intrigantes relativas à dinâmica social e comportamental, que incluem sua complexa comunicação por meio de dança (von Frisch, 1967) e a capacidade, altamente especializada, de aprendizagem e memória (revisão de Menzel, 2001).

1.1 – *Apis mellifera*: considerações gerais

Abelhas da espécie *Apis mellifera* Linneaus, 1758 (Hymenoptera, Apidae, Apinae, Apini) são insetos holometábolos, por apresentarem metamorfose completa, ou seja, padrões de desenvolvimento corporais distintos (embrião, larva, pupa e adulto). Após as 72 horas do período embrionário, as larvas eclodem do ovo e passam por vários estágios de desenvolvimento, caracterizados por intensa alimentação e crescimento, com quatro mudas (que designam os subestágios de **Larva 1 a 5**). A ontogênese prossegue com uma muda metamórfica que marca a transição larva-pupa. Durante o desenvolvimento pupal ocorre substituição dos tecidos larvais por tecidos que comporão o indivíduo adulto como, por

exemplo, a diferenciação de estruturas do adulto a partir dos discos imaginais: asas, pernas, antenas, entre outros. Após emergência, os adultos desempenham funções específicas dentro da colônia, esta uma sociedade altamente organizada, caracterizada por sobreposição de gerações, divisão reprodutiva de trabalho e cuidado com a prole.

Nesses insetos sociais, a determinação de sexo é haplodiplóide, onde fêmeas (rainhas e operárias) originam-se de ovócitos fertilizados, portanto diplóides (2n=32), e os machos, denominados zangões, se originam de ovócitos não-fertilizados, haplóides (n=16). Assim, nas colônias existem dois fenótipos femininos, chamados de **castas**, morfologicamente distintos: uma única rainha e milhares de operárias, ambas derivadas de ovos bipotentes, um caso de polimorfismo facultativo.

Após a eclosão do ovo, o destino fenotípico das larvas diplóides é dependente da qualidade e quantidade de alimento que recebem a partir do terceiro estágio. A dieta de larvas que originarão rainhas é constituída pelo produto de secreções das glândulas hipofaríngeas (geléia real) produzido pelas operárias nutridoras, enquanto as larvas que originarão operárias são alimentadas com geléia real até o segundo estágio e, a partir de então, com uma mistura de geléia real, mel e pólen. A **determinação de casta** é iniciada pelo **estímulo trofogênico** que dispara respostas diferenciais do **sistema endócrino** que secreta os principais **hormônios morfogenéticos** (Hormônio Juvenil e Ecdisteróides).

Uma larva de rainha desenvolve-se mais rapidamente que a de operária a partir do quinto estágio larval, apresentando também maior taxa de crescimento e peso. Conseqüentemente, o período de desenvolvimento pupal na rainha é mais curto e a sua forma adulta emerge com 15 dias, enquanto uma operária adulta emerge com 20 dias. A rainha adulta é maior que a operária adulta e possui maior longevidade, em clima tropical sobrevive em média, 1 ano e meio, enquanto a operária não passa de 40 dias.

A rainha possui anatomia especializada para reprodução e, geralmente, é a única fêmea fértil da colônia. A rainha é **poliândrica**, realizando a partir do quinto dia após a emergência três vôos para acasalamento (em africanizadas), nos quais copula com até 15 ou mais zangões. O *status* reprodutivo da rainha permite estocar grandes quantidades de espermatozóides que são utilizados durante toda a vida, sendo e capaz de ovipositar até 2000 ovos por dia, dependendo das condições sazonais, demográficas e recursos alimentares. Possui um par de ovários bem desenvolvidos, com cerca de 180 ovaríolos cada. O número de acasalamentos de uma rainha confere ampla **variação genética** dentro de uma única colônia, com conseqüente plasticidade no desenvolvimento e comportamento entre as operárias provenientes de ovócitos fecundados por espermatozóides de **linhagens paternas distintas**.

As operárias adultas são facultativamente estéreis e possuem em cada um de seus ovários entre 2-10 ovaríolos funcionais. A condição de esterilidade das operárias pode ser revertida em função da orfandade, ou seja, **na ausência da rainha ocorre ativação dos ovários** e postura de ovos não-fertilizados, que produzirão exclusivamente zangões. Na colônia, a presença da rainha suprime o desenvolvimento dos folículos ovarianos das operárias por meio da liberação de feromônios produzidos por glândulas mandibulares, o que impede a postura de ovos. São os feromônios liberados pela rainha que governam, também, a divisão de trabalho para a manutenção e proliferação de uma colônia.

As operárias desempenham uma diversidade de tarefas em ordem cronológica (polietismo etário), acompanhadas por mudanças anatômicas, fisiológicas e comportamentais. Dentre estas tarefas estão: limpeza das células de cria, alimentação da cria e da rainha, processamento de néctar e pólen com posterior estocagem, construção dos favos, remoção de abelhas mortas, ventilação e manutenção de temperatura da colméia, produção de cera, proteção da colméia (guarda) e atividades de forrageamento, com coleta de pólen, resinas, néctar e água. A função dos machos se restringe à cópula.

Toda a ontogenia dos indivíduos de uma colônia é acompanhada por **flutuações nos títulos hormonais**, que sinalizam o desenvolvimento normal de suas estruturas, crescimento, metamorfose e, ainda, parecem estar intimamente relacionados à regulação das funções nas formas adultas, sobremaneira no comportamento social (divisão de trabalho) e reprodutivo (vôo para acasalamento).

As características biológicas aqui descritas foram obtidas a partir de uma coletânea de diversos autores, desde a teoria social baseada nas "monarquias femininas em abelhas", de Charles Butler, publicada em 1609, passando pela descrição da espécie Linnaeus, em 1758, pela hipótese do sistema de determinação de sexo haplodiplóide de Dzierzon, em 1845, até o presente. A literatura é cada vez mais ampla e, algumas vezes, contraditória. A fim de evitar discrepâncias e exceções, os dados acima são baseados em algumas de tantas revisões sobre essas abelhas, como Winston (1987), Rembold (1987a), Laidlaw (1992), Hartfelder e Engels (1998) Page e Peng, 2001, Page et al. (2002), Page e Erber (2002).

1.2 - Mecanismos moleculares e respostas do sistema endócrino

1.2.1 - Determinação de castas

O extraordinário sucesso reprodutivo de *A. mellifera* e a divisão de trabalho integram-se como mecanismos de homeostase social que garantem a sobrevivência das colônias. Todo esse conjunto bem sucedido deve-se, primeiramente, à decisão altruísta das operárias de cuidar de suas próprias irmãs, alimentando as larvas em desenvolvimento.

Desconsiderando-se o "conflito de interesses" entre a rainha e operárias, proposto por alguns autores (para revisão Moritz e Southwick, 1992; Ratnieks e Wenseleers, 2005), o

processo de alimentação da cria requer mudanças fisiológicas marcantes nas operárias nutridoras, como o desenvolvimento de glândulas hipofaríngeas para produção de geléia real (citações em Fluri et al., 1982; Fluri e Bogdanov, 1987; Hrassnigg e Crailsheim, 1998). Tais mudanças morfo-fisiológicas são respostas endócrinas, tanto quanto as que ocorrem nas larvas que recebem alimentação diferencial, sejam por quantidade ou qualidade (Huber, 1821; Rembold, 1965; Haydak, 1970), para tornarem-se rainhas ou operárias.

Postula-se que o sistema nervoso estomatogástrico, responsável pelo transporte intestinal, seja estimulado pela ingestão de dieta diferencial, após o segundo estágio larval, transferindo informações ao complexo neuroendócrino (cérebro-*corpora cardiaca*-*corpora allata*) por meio do gânglio hipocerebral ou do nervo conectivo. A detecção de imunorreatividade à serotonina por células ao redor dos *corpora allata*, nessas larvas, evidenciou a ativação desse par de glândulas (Penzlin, 1985; Boleli et al., 1995, 1998). Os ***corpora allata*** estão localizados no complexo retrocerebral e são responsáveis pela **produção de hormônio juvenil**, um composto lipofílico do grupo dos sesquiterpenóides. Dessa forma, sinais nutricionais podem desencadear a liberação de aminas biogênicas que estimulam respostas diferenciais nos *corpora allata* para a produção desse hormônio, que modulam os processos de diferenciação das castas (Rachinsky, 1994). As diferenças no tamanho dos *corpora allata* e nos títulos de hormônio juvenil circulante na hemolinfa (Figura 1) entre as castas são marcantes a partir de larvas de segundo estágio, sempre maiores para rainhas (Dogra et al., 1977; Rembold, 1987b, 1992; Rachinsky et al., 1990).

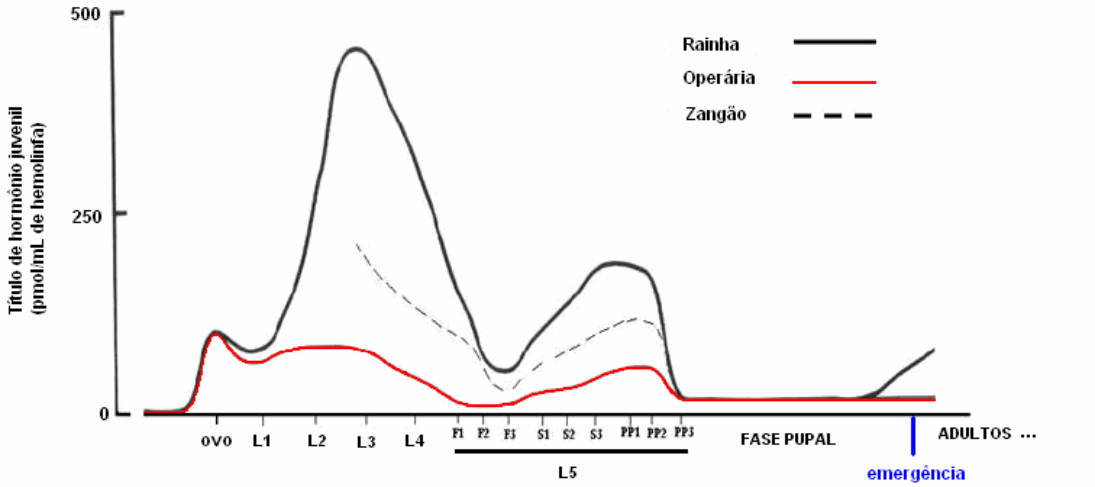

Figura 1 – Títulos de hormônio juvenil ao longo do desenvolvimento de operárias, rainhas e zangões de *Apis mellifera* (Rembold, 1987a, 1987b; Rembold et al., 1992; Rachinsky *et al.*, 1990). Os dados apresentados na revisão de Hartfelder e Engels (1998) foram compilados a partir de metodologias diferentes para quantificação hormonal e se referem a valores relativos. Estágios do desenvolvimento: ovo, L1-4 (larvas de primeiro, segundo, terceiro e quarto estágios), L5 (larvas de quinto estágio) em fase de alimentação (F = *feeding phase*, subdivisões: F1, F2 e F3), seguida por fase de tecelagem do casulo (S = *spinning phase*, subdivisões: S1, S2 e S3) e PP (pré-pupa, subdivisões: PP1, PP2 e PP3).

Com relação ao desenvolvimento ovariano, são encontrados cerca de 150 primórdios de ovaríolos no início do quinto estágio larval, independente da casta. Após 24 horas nesse estágio, os ovários de rainhas apresentam cistócitos (grupo de células germinativas com mitoses incompletas) que caracterizam o desenvolvimento normal dos ovários meroísticos (Büning, 1994; Hartfelder e Steinbrück, 1997). Em operárias, observa-se formação de cistócitos em poucos ovaríolos e a indução de autofagia de estruturas e morte celular programada na maioria deles (Hartfelder e Steinbrück, 1997). A aplicação tópica de análogos sintéticos de hormônio juvenil sobre larvas de *A. mellifera* que receberam dieta para se tornarem operárias provocou o surgimento de características de rainhas (Wirtz e Beetsma, 1972; Wirtz, 1973; Rembold et al., 1974; Asencot e Lensky, 1976; Copijn et al., 1979; Dietz et al., 1979; Rachinsky e Engels, 1995). Nas larvas de operárias tratadas topicamente com hormônio juvenil e nas larvas naturais de rainhas, ambas no início do quinto estágio larval, **os altos títulos hormonais impedem a degradação de DNA e do citoesqueleto de actina,**

protegem contra a morte celular e mantêm o desenvolvimento dos ovários. Em larvas de operárias naturais observou-se apoptose dos ovaríolos, dado o menor título de hormônio juvenil circulante (Schmidt-Capella e Hartfelder, 1998, 2002).

Do ponto de vista funcional, estudos em larga-escala demonstraram que o perfil global de expressão gênica em larvas de rainhas e operárias de *A. mellifera* é bastante distinto e, em particular, apresenta genes diferencialmente expressos ligados a processos metabólicos, nutricionais, de sinalização e hormônio-dependentes durante o desenvolvimento (Severson et al., 1989; Hartfelder et al. 1995; Corona et al., 1999; Evans e Wheeler, 1999, 2000; Hepperle e Hartfelder, 2001), evidenciando forte pressão seletiva direcional (Evans e Wheeler, 2000). Genes que codificam para enzimas metabólicas e para atividade respiratória são mais expressos em larvas de rainhas, enquanto larvas de operárias super-expressam transcritos para proteínas de estocagem, proteínas ligantes de lipídios e, também, enzimas metabólicas (Eder et al., 1983; Corona et al., 1999; Evans e Wheeler, 1999, 2000). A detecção de enzimas super-expressas diferencialmente nas castas sinaliza vias de processamento alternativas para geléia real e para geléia de operárias, com oxidoredutases mais representadas em rainhas e hidrolases em operárias (Cristino et al., 2006). Não há dúvidas de que os sinais moleculares envolvidos na determinação e diferenciação de castas são resultados da interação entre o *status* nutricional e o sistema endócrino, via produção de hormônio juvenil. A via de sinalização de insulina, um mecanismo altamente conservado na evolução dos eucariotos, regula processos biológicos envolvidos no crescimento celular, na longevidade e no tamanho dos organismos em resposta à alimentação (Ikeya et al., 2002; Oldham et al., 2002; Nijhout, 2003; Colombani et al., 2003). Como esperado, genes dessa via não só ocorrem, mas, também, são diferencialmente expressos entre as larvas durante fases críticas da diferenciação de castas (Wheeler et al., 2006).

Em suma, a determinação de castas é dependente da alimentação diferencial de larvas, que dispara programações genéticas distintas, que resultam em rainhas ou operárias. Esse viés na programação transcricional para o desenvolvimento de cada casta está intimamente associado aos níveis diferenciais de hormônio juvenil circulante que, por sua vez, controlam etapas, sobretudo as mais tardias, da diferenciação morfo-fisiológica das larvas de rainhas e operárias, caracterizando um clássico exemplo de polifenismo (Hartfelder e Engels, 1998; Hartfelder, 2000; Evans e Wheeler, 2001; Page e Peng, 2001).

1.2.2 – Ação do hormônio juvenil

O hormônio juvenil é transportado através da hemolinfa por uma proteína de ligação (de vários tipos existentes nos insetos), formando um complexo que protege contra a hidrólise por esterases e seqüestro do hormônio por membranas lipofílicas, além de facilitar sua circulação uniforme pelos tecidos dos insetos (revisado por Prestwich et al., 1996). Alguns autores propõem que esse complexo acione cascatas de sinalização via receptores específicos nas membranas celulares dos tecidos alvos (Vermunt et al., 2001; revisões de Nijhout, 1994, Raikhel et al., 2005). Nos últimos anos, tem sido sugerido que o dímero formado pelo complexo protéico EcR/USP (EcR - receptor de ecdisona; USP – ultraspiracle, um ortólogo ao Receptor X Retinóideo, RXR, de vertebrados) seja forte candidato como receptor de hormônio juvenil (revisado por Raikhel et al., 2005). Em *A. mellifera*, o gene USP possui uma única cópia, com duas isoformas alternativas que são diferencialmente expressas em alguns tecidos e estágios de desenvolvimento de rainha e de operária. Aplicação tópica de hormônio juvenil induziu rapidamente a expressão de um desses transcritos, de forma transiente, o que sugere seu potencial papel como receptor nessas abelhas (Barchuk et al., 2004). Em *Locusta migratoria* foi descrito um elemento de resposta presente na região promotora de genes que,

por sua vez, teriam sua expressão induzida pela presença de hormônio juvenil, via fatores de transcrição (Zhang et al., 1996; Zhou et al., 2002).

O hormônio juvenil possui duas importantes funções na história de vida e fisiologia da maioria dos insetos: impedir a metamorfose e regular a reprodução. Nas abelhas, seus efeitos pleiotrópicos estão profundamente correlacionados com aspectos da vida social durante o ciclo de vida dessas abelhas, como no desenvolvimento diferencial de fêmeas e zangões e na plasticidade comportamental dos adultos (Figura 2). Porém, a existência de um papel na fisiologia reprodutiva de adultos de *A. mellifera* é questionável. Apesar das funções distintas que o hormônio juvenil exerce na vida pré e pós-adulta, em ambas atua sobre o eixo neuroendócrino (revisado por Hartfelder, 2000).

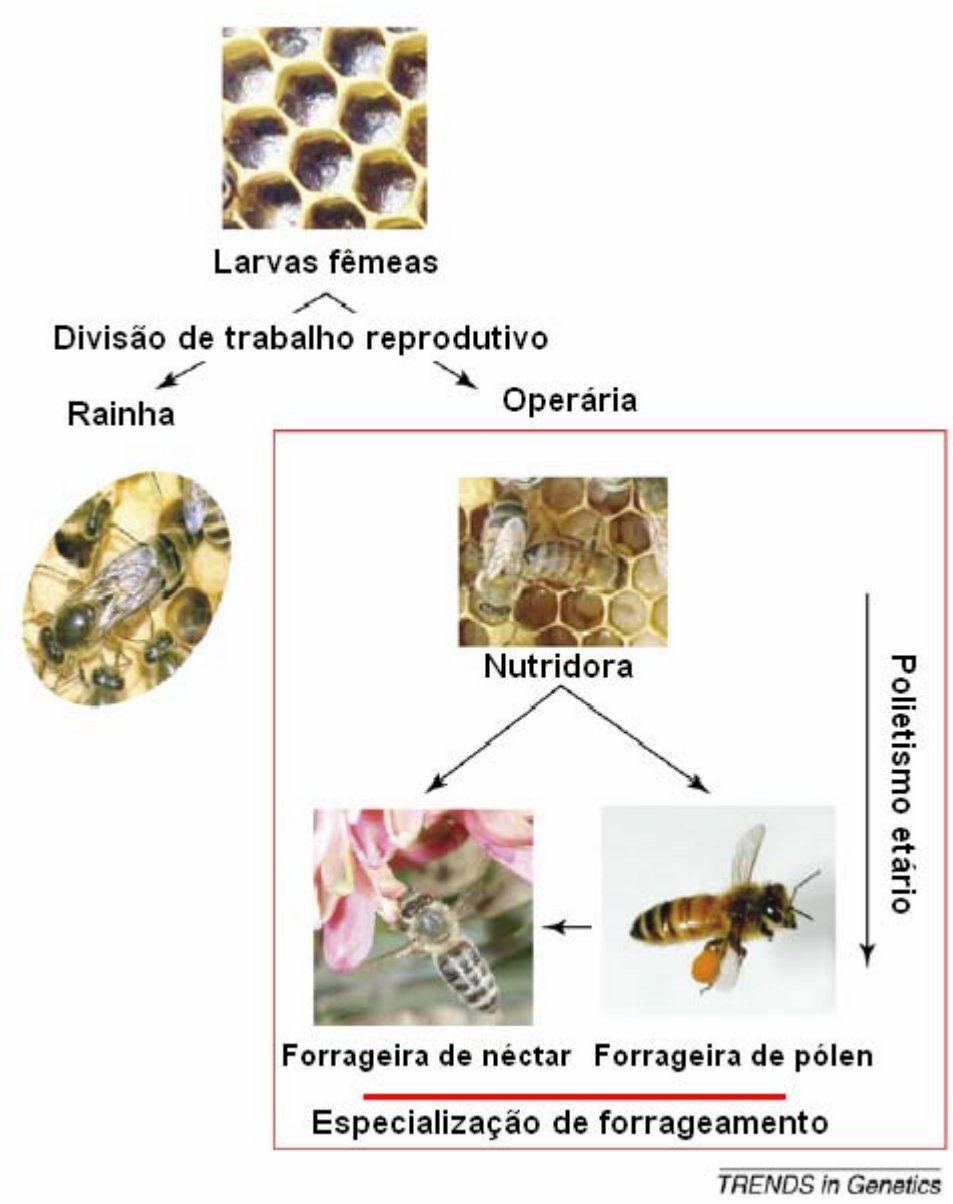

Figura 2 – Determinação de castas e divisão de trabalho reprodutivo em *A. mellifera*. Modificado de Toth e Robinson (2007).

1.3 – Vitelogenina: características do gene, expressão e funções

Para muitas ordens de insetos, os principais eventos ligados à reprodução são governados pela ação de neuropeptídeos inibitórios (alatostatinas) e estimulatórios (alatotropinas) que controlam a produção de hormônio juvenil, ecdisteróides ou ambos (revisado por Gilbert *et al.*, 2000). Inúmeros estudos baseados em alatectomia (retirada cirúrgica dos *corpora allata*), tratamento com drogas inibidoras da síntese de hormônio juvenil e/ou reposição desse hormônio em animais alatectomizados, sugerem seu papel central na ovogênese, em especial no início da vitelogênese, para a maioria dos insetos (revisado por Raikhel et al., 2005).

A capacidade de desenvolver os ovários garante o sucesso reprodutivo da rainha e a fertilidade ocasional de operárias de *A. mellifera*, processo intrinsecamente dependente das taxas de síntese de proteínas vitelogênicas transportadoras de lipídios, seus títulos na hemolinfa e sua incorporação pelo sistema reprodutor (Engels et al., 1990; Hartfelder e Engels, 1998; Pinto et al., 2000; Barchuk et al., 2002).

Ao contrário de insetos mais primitivos, nos quais os ovos são capazes de produzir as proteínas vitelogênicas necessárias, vertebrados e invertebrados mais derivados, como *A. mellifera*, utilizam-se de um mecanismo heterossintéico. A síntese e secreção de grande quantidade de proteínas vitelogênicas, em especial a vitelogenina e a lipoforina, e seu transporte até os ovócitos, via hemolinfa, são condições primárias para que a ovogênese ocorra normalmente. A vitelogenina é incorporada nos ovócitos por endocitose mediada por receptores e armazenada em vesículas citoplasmáticas (revisões de Postlethwait e Giorgi, 1985; Kanost et al., 1990; Raikhel e Dhadialla, 1992; Ziegler e Van-Antwerpen, 2006).

Na maioria dos insetos, a vitelogenina, que pertence à família das proteínas ligantes de lipídios, é uma importante reserva energética dos ovos. Seus resíduos de aminoácidos e

estrutura são conservados entre insetos e outros ovíparos, o que indica uma ancestralidade comum (Sappington et al., 2002; Ziegler e Van-Antwerpen, 2006).

Em *A. mellifera*, o gene codificador da vitelogenina é transcrito em 5.440 nucleotídeos (nt) e a proteína corresponde a 1.770 aminoácidos (aa), com massa molecular predita igual a 201 kDa, com peptídeo sinal para clivagem dos 16 primeiros resíduos (Piulachs et al., 2003). A proteína havia sido caracterizada com peso molecular de 180 kDa (coerente com as informações de Piulachs et al., 2003), covalentemente ligada a carboidratos (principalmente manose), fosfolipídios e diacilglicerol (Engels et al., 1990; Wheeler e Kawooya, 1990), sendo, portanto, uma glicolipoproteína.

Perfis de transcrição (Piulachs et al., 2003) e tradução (Barchuk et al, 2002) do gene codificador de vitelogenina foram caracterizados em pupas e adultos de rainhas e operárias de *A. mellifera*. Em rainhas, o início de transcrição (observada no abdômen) e tradução (observada na hemolinfa) ocorre simultaneamente em pupas de olho marrom com corpo medianamente pigmentado (**Pbm**). Em operárias, traços de transcrição (observada no abdômen) foram detectados na fase pupal seguinte, em pupa de olho marrom com corpo fortemente pigmentado (**Pbd**), mas a tradução (observada na hemolinfa) ocorre horas mais tarde em pupa farata, fase anterior à emergência do indivíduo adulto. Os dados indicam que pelo menos o início da síntese de vitelogenina nas castas de *A. mellifera* é estimulado pelo aumento dos títulos de hormônio juvenil em presença de baixos níveis de ecdisteróides (Barchuk et al, 2002, Piulachs et al., 2003).

Em rainhas, a quantidade de transcritos de vitelogenina aumenta em Pbd e continua presente nas formas adultas. Em operárias, a transcrição de vitelogenina aumenta, progressivamente, com picos entre 5 e 10 dias, quando diminui, gradativamente, permanecendo por até 30 dias (Piulachs et al., 2003).

Em rainhas adultas, a vitelogenina mostra um rápido aumento dos títulos na hemolinfa nos quatro primeiros dias após a emergência, podendo atingir até 70% do total de proteínas da hemolinfa, mantendo-se sempre altos na fase adulta (cerca de 50% do total de proteínas da hemolinfa), independente de haver acasalamento e postura de ovos (Engels, 1972, 1974). Para operárias, os títulos de vitelogenina na hemolinfa não são contínuos como nas rainhas. Nos primeiros dias após a emergência do adulto e em operárias com mais de 15 dias (função de forrageiras) os títulos são baixos; porém, entre 5 e 10 dias a vitelogenina corresponde a 30-40% do total de proteínas circulantes na hemolinfa, quando essas exercem função de nutridoras (Fluri et al., 1982; Engels, 1974; Engels et al., 1990). Em condições de orfandade, as operárias nutridoras ativam seus ovários e, quando começam a ovipositar, a concentração de vitelogenina na hemolinfa atinge níveis comparáveis ao de uma rainha em postura (Engels, 1974).

Rainhas virgens e operárias nutridoras, ambas não-poedeiras, produzem vitelogenina em abundância, porém, sem relação com sua captação pelos ovócitos (Engels, 1972, 1973; Fluri et al. 1981, 1982, revisados por Hartfelder e Engels, 1998).

A síntese de vitelogenina em rainhas adultas não é dependente de hormônio juvenil (Engels e Ramamurty, 1976; Ramamurty e Engels, 1977; Engels et al., 1990; revisados por Hartfelder e Engels, 1998), tendo sido sugerido que a presença de neuro-hormônios gonadotrópicos, neuropeptídeos e/ou ecdisteróides regulem sua produção, nessa fase (Hermann, 1969; Feldlaufer et al., 1986; Kaatz, 1988; Kaatz e Dittrich, 1989; Engels et al., 1990; Robinson et al., 1991).

Em operárias adultas, a taxa de síntese de vitelogenina pelo corpo gorduroso está negativamente correlacionada com seus níveis na hemolinfa (Engels, 1974; Engels et al., 1990). Diferentemente do observado em pupas, onde o hormônio juvenil regula a síntese de vitelogenina (Barchuk et al, 2002), operárias nutridoras apresentam alta produção de

vitelogenina, sob baixos títulos de hormônio juvenil (Rutz et al., 1976). Aplicação de altas doses de hormônio juvenil inibe a síntese de vitelogenina nessas operárias (Rutz et al., 1976, Pinto et al., 2000). A produção de vitelogenina em operárias nutridoras apresenta forte correlação com dieta rica proteínas (pólen) (Bitondi et al., 1994; Bitondi e Simões, 1996).

A vitelogenina é encontrada em operárias não-reprodutoras (Engels, 1974; Fluri et al., 1982; Engels et al., 1990) e em zangões adultos (Trenczek e Engels, 1986; Trenczek *et al*., 1989; Piulachs et al., 2003), sugerindo a aquisição de funções secundárias, não-ovogênicas, como transporte de fosfato, vitaminas e hormônios (Chen *et al*., 1997; Sappington e Raikhel, 1998).

Trabalhos recentes mostram que a vitelogenina desempenha diversas funções no controle de características associadas à organização social por meio de efeitos pleiotrópicos na divisão de trabalho e longevidade, principalmente em operárias (Amdam e Omholt, 2002; Amdam e Omholt, 2003a; Amdam e Page, 2005a; Nelson et al., 2007). A injeção de RNA de fita dupla inibe a síntese de vitelogenina (Amdam et al., 2003b; Guidugli et al., 2005a; Amdam et al., 2006a) e as abelhas “mutantes” forrageiam mais cedo e tem o ciclo de vida mais curto (Nelson et al., 2007). Juntos, a vitelogenina e o hormônio juvenil constituem parte de um sistema regulatório de retro-alimentação (*feedback*), no qual um suprime o outro (Figura 3), segundo a hipótese duplo repressor (Amdam e Omholt, 2003a). Esse *feedback* é incomum em insetos (Guidugli et al., 2005a), sugerindo uma co-opção evolutiva e remodelagem das funções da vitelogenina e do hormônio juvenil (Amdam et al., 2003c; Brandt et al., 2005; Seehuus et al., 2006; Amdam et al., 2006a) como passos importantes para a origem da sociabilidade nessas abelhas.

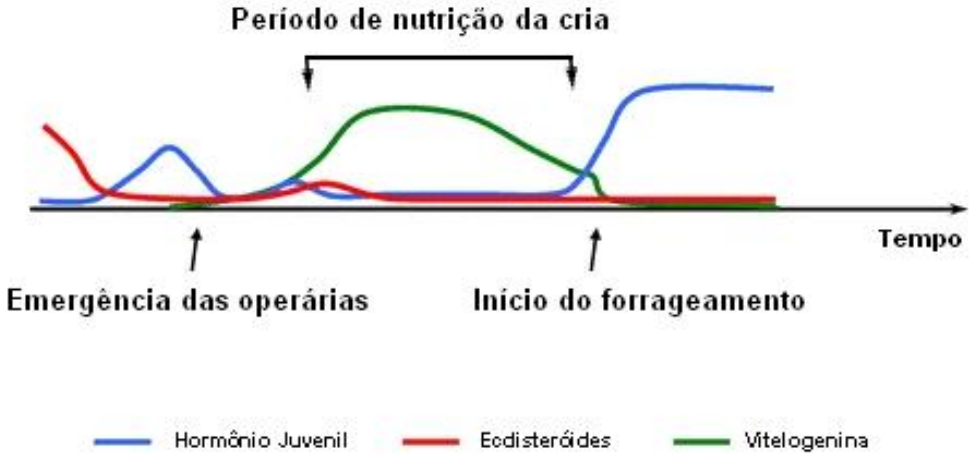

Figura 3 – Sistema de retro-alimentação entre os títulos de hormônio juvenil e de vitelogenina circulantes na hemolinfa de operárias, regulando a divisão de trabalho. Adaptado de Page e Amdam (2007).

O efeito pleiotrópico da vitelogenina coordena inúmeras características ligadas ao polietismo etário, em especial a transição de tarefas intra-colônia para atividades de forrageamento de pólen e, depois, de néctar (Amdam e Omholt, 2003a; Guidugli et al., 2005a; Nelson et al., 2007). Tal fato apóia a hipótese de que o comportamento social evoluiu a partir de características reprodutivas ancestrais (Amdam et al., 2004a; Amdam et al., 2006b), onde fêmeas reprodutivas de abelhas solitárias coletam e consomem, preferencialmente, pólen enquanto as não-reprodutivas coletam e consomem néctar.

A vitelogenina é, também, transportadora de zinco (Falchuk, 1998) o que protege contra estresse oxidativo e apoptose, garantindo a integridade do sistema imune e prolongando o ciclo de vida (Amdam e Omholt, 2002; Amdam e Omholt, 2003a; Amdam et al., 2004b; Amdam et al., 2005; Seehuus et al., 2006).

1.4 – O genoma de *A. mellifera* e perspectivas sobre caracterização de funções gênicas

O valor científico dos estudos da genética de *A. mellifera* foi reconhecido em 22 de maio de 2002, quando *A. mellifera* foi incorporada à lista de prioridades do *The National Human Genome Research Institute* (NHGRI) para ter seu genoma completamente seqüenciado, devido ao seu potencial para estudos de neurobiologia e relevância para a agricultura e saúde humana (modelo para pesquisas sobre resistência a antibióticos, imunidade, reações alérgicas, desenvolvimento e longevidade). Seu genoma foi recentemente publicado na revista *Nature* (*Honey Bee Genome Consortium*, 2006) e representa o holometábolo mais basal com o DNA seqüenciado até o momento, o que permite investigar as bases genéticas e moleculares das características supramencionadas.

Além disso, análises de genômica comparativa junto aos mais de 50 projetos genoma já seqüenciados (fonte - NHGRI), que incluem insetos com dados finalizados (*Drosophila melanogaster*, *Drosophila pseudobscura*, *Anopheles* gambiae, *Bombyx mori*, *Aedes aegypti*) em andamento (*Tribolium castaneum*, Coleoptera; *Nasonia vitripennis*, Hymenoptera; *Nasonia giraulti*, Hymenoptera; *Nasonia longicornis*, Hymenoptera; *Acyrthosiphon pisum*, Hemiptera; *Bicyclus anynana*, Lepidoptera; *Culex pipiens*, Diptera; *Daphnia pulex*, Siphonaptera; *Glossina morsitans*, Diptera; *Ixodes scapularis*, Acarina; *Pediculus humanus*, Phthiraptera e *Rhodnius prolixus*, Hemiptera), permitem compreender processos celulares e de desenvolvimento, à luz da evolução (Rubin et al., 2000; Kaufman et al., 2002; Robinson et al., 2006, *Honey Bee Genome Consortium*, 2006).

Aspectos da biologia reprodutiva de *A. mellifera* impedem a aplicação de técnicas para produção de linhagens mutantes (***knockout***) ou transgênicas (Page et al., 2002). No entanto, a aplicação de técnicas que alinham genômica funcional e genética reversa, que manipulem a expressão de genes em abelhas, foi incentivada antes mesmo da publicação do genoma

(Robinson e Bem-Shahar, 2002; Evans e Weaver, 2003; Evans e Gundersen-Ridal, 2003; Robinson et al., 2005).

A interferência por RNA (*RNA interference*, a partir daqui designado de **RNAi**) é a mais promissora ferramenta para estudos de função gênica, baseada na introdução de duplex de RNA (*double-stranded RNA*, a partir daqui designado de **dsRNA**) que induz a degradação (***knockdown***) de transcritos alvo-específicos (Fire et al., 1998). Tem sido amplamente utilizada para as mais diversas espécies, particularmente em organismos "não-modelos" onde os métodos de investigação funcional são muito limitados (Araújo et al., 2006).

A degradação do RNA mensageiro (mRNA) alvo mediada por dsRNA específicos ocorre em uma série de reações. Primeiro o dsRNA é reconhecido por uma enzima chamada de Dicer, pertencente à família RNase III (Ketting et al., 2001), e clivado em pequenos RNAs silenciadores (siRNAs, Elbashir et al., 2001). Os siRNAs são agregados ao Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC, *RNA-induced silencing complex*, Hammond et al., 2000; Bernstein et al., 2001). Enfim, o mRNA alvo é reconhecido pelo RISC e clivado na região de complementaridade dos siRNAs e rapidamente degradado.

Em *A. mellifera*, trabalhos com microinjeção de dsRNA gene-específicos em embriões pré-blastodérmicos (Beye et al., 2002, Amdam et al., 2003b, Beye et al., 2003) deram início à utilização da técnica nos Hymenoptera. A aplicação de dsRNA em abelhas silencia os genes de interesse não apenas na região da injeção, mas também em tecidos distantes, o que sugere uma resposta sistêmica (Aronstein e Saldivar, 2005), de efeitos a longo prazo (Amdam et al., 2003b). No entanto, discute-se a probabilidade de danos teciduais no sítio da injeção (Aronstein et al., 2006). Em experimentos de silenciamento da região gênica E30 homeobox (*motif* ortólogo ao gene *engrailed* de *D. melanogaster*) e do gene cuticular CSP5 em *A. mellifera*, a mortalidade dos embriões manipulados foi de 57% (de 585 embriões injetados com dsRNA ou tampão) e 79% (de 1.960 embriões injetados com água ou com dsRNA),

respectivamente (Beye et al., 2002; Maleszka et al., 2007), mostrando que o método invasivo diminui a viabilidade dos indivíduos. O silenciamento gênico pode ser induzido por ingestão de dsRNA (Timmons e Fire, 1998; Soares et al., 2005) e, por ser menos traumático, tem sido usado com sucesso em diversos organismos, incluindo *A. mellifera* (Aronstein et al., 2006).

1.5 – Vitelogenina em larvas: um novo paradigma

A presença de mRNA do gene codificador de vitelogenina foi detectado em larvas de *A. mellifera* (Figura 4). A expressão é mais acentuada do segundo até o quinto estágios larvais, para ambos os sexos e castas, com uma diminuição acentuada que antecede a metamorfose (Guidugli et al., 2005b). Esse evento é atípico em insetos, sugerindo novas funções desse gene.

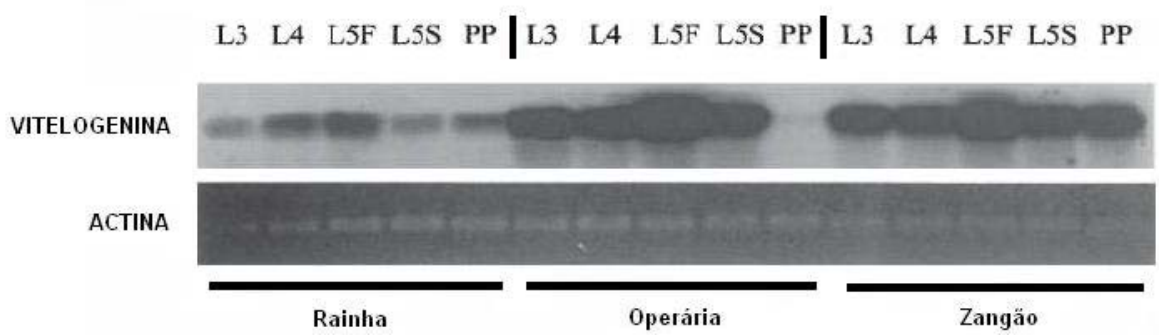

Figura 4 – Expressão de mRNA do gene codificador de vitelogenina em diferentes estágios do desenvolvimento larval. L3 – larva de terceiro estágio, L4 – larva de quarto estágio, L5F – larva de quinto estágio em fase de alimentação, L5F – larva de quinto estágio em fase de tecelagem de casulo, PP – pré-pupa. Modificado de Guidugli et al. (2005b).

Os dados de Guidugli et al. (2005b) sugerem que, nas fases críticas de alimentação diferencial das larvas fêmeas para determinação de castas, a expressão do gene codificador de vitelogenina é maior em operárias do que em rainhas, enquanto o título de hormônio juvenil é muito maior em rainhas do que em operárias (Figura 1). Associados, esses dados apontam o cenário “duplo repressor”, semelhante ao que ocorre na fase adulta de operárias, onde a

vitelogenina é expressa em abundância em nutridoras, que possuem baixo título de hormônio juvenil circulante e diminui, consideravelmente, em forrageiras, que apresentam altos títulos de hormônio juvenil (Figura 3). Por analogia, podemos dizer que larvas de rainhas assemelham-se às forrageiras que, por sua vez, resgatam características maternas de abelhas solitárias (Amdam et al., 2004a; Amdam et al., 2006b). Nesse mesmo raciocínio, operárias, ainda na fase larval, assumiriam seu destino não-reprodutivo e, na fase adulta, o papel no cuidado da prole. Uma vez que a expressão do gene codificador da vitelogenina ocorre desde larva de segundo estágio, momento que antecede a determinação de castas, poderia esse gene regular o polifenismo?

Recapitulando as premissas do "duplo repressor" para o contexto larval, **nossa hipótese** é que, silenciando o gene da vitelogenina antes do momento de determinação de castas, larvas de operárias terão aumento dos títulos de hormônio juvenil e desenvolverão características típicas de rainhas, como: aumento corporal desde larvas e, sobretudo, do abdômen nos adultos; desenvolvimento de ovários, pernas sem corbícula (estrutura para coletar pólen) e asas maiores. Para testar essa hipótese foi desenvolvido um método de silenciamento gênico não-invasivo, que descarta o efeito do estresse por manipulação, sobre a expressão do gene e dos títulos hormonais, bem como as dificuldades de injeção de RNA de fita dupla, em larvas. O teste da hipótese contribuiu para discussão sobre a viabilidade dos tratamentos, suas conseqüências na fisiologia, na morfologia e no desenvolvimento dos indivíduos tratados e, ainda, sobre o comportamento de operárias adultas, criando perspectivas para definição de funções e mecanismos regulatórios, em aberto, sobre a presença de vitelogenina na fase larval.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Geral

Compreender os efeitos do silenciamento pós-transcricional, mediado por dsRNA específico do gene codificador de vitelogenina, durante o desenvolvimento pós-embrionário de rainhas e operárias de *A. mellifera*.

2.2 – Específicos

- Anotação *in silico* do gene codificador de vitelogenina e busca por potenciais sítios de ligação de microRNAs na região 3´UTR deste gene;
- Desenvolver um método não-invasivo para tratamento de larvas com RNAs de fita dupla e avaliar sua viabilidade;
- Silenciar o gene codificador de vitelogenina em rainhas e operárias, por meio de RNAs de fita dupla oferecidos na dieta;
- Quantificar a expressão relativa do gene codificador de vitelogenina em diferentes fases do desenvolvimento de rainhas e operárias de *A. mellifera*, sem tratamento, e tratadas com RNAs de fita dupla;
- Quantificar o total de proteínas circulantes na hemolinfa em diferentes fases do desenvolvimento de rainhas e operárias de *A. mellifera*, sem tratamento, e tratadas com RNAs de fita dupla;
- Registrar o peso das amostras em diferentes fases do desenvolvimento de rainhas e operárias de *A. mellifera*, sem tratamento, e tratadas com RNAs de fita dupla;

- Analisar o perfil total de proteínas circulantes na hemolinfa de rainhas e operárias adultas de *A. mellifera*, sem tratamento, e tratadas com RNAs de fita dupla;
- Quantificar os títulos de hormônio juvenil de larvas de rainhas e operárias de *A. mellifera*, sem tratamento, e tratadas com RNAs de fita dupla;
- Comparar os ovários e estruturas imaginais (asa mesotorácica maior e a terceira perna) de rainhas adultas sem tratamento com as de operárias adultas sem tratamento e tratadas com RNAs de fita dupla.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – nálises *in silico*

3.1.1 - Anotação do gene codificador de vitelogenina

Para definição da organização estrutural do gene codificador de vitelogenina utilizou-se a seqüência completa de mRNA disponível no *GenBank* (número de acesso: AJ517411, Piulachs et al., 2003) como entrada para anotação manual na plataforma *Artemis 7.0* (Rutherford et al., 2000), utilizando-se a versão 4.0 do genoma de abelha *A. mellifera* (*Honey Bee Genome Consortium*, 2006) e algoritmos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul et al., 1990).

3.1.2 – Busca por sítios de ligação de microRNAs

Utilizou-se 56 nt correspondentes à extremidade 3´ não-traduzida (UTR) do gene codificador de vitelogenina para buscas por sítios de ligação de microRNAs. O valor de variação de energia livre (ΔG) de -17,0 kcal/mol foi utilizado como valor de corte (*cut-off*) para os programas *MicroInspector* (Rusinov et al., 2005) e *RNAHybrid* (Rehmsmeier et al., 2004). Para o programa *MicroInspector* foi utilizada a temperatura de hibridação de 20ºC, e a seqüência 3´UTR confrontada com os bancos de microRNA maduros de *Drosophila melanogaster* (78 seqüências disponíveis), *Anopheles gambiae* (38) e *A. mellifera* (25). Para entrada no programa *RNAHybrid* foram utilizadas as seqüências de microRNAs maduros de *D. melanogaster* (78), *A. gambiae* (38), *Bombyx mori* (21) e *A. mellifera* (54), disponíveis no banco de dados *miRbase release 9.2* (Griffiths-Jones et al., 2006).

3.2 – Material biológico e obtenção de amostras com idade controlada

Foram utilizadas operárias e rainhas de abelhas africanizadas *Apis mellifera*, em diferentes estágios do desenvolvimento pós-embrionário (Figura 5A), provenientes de posturas controladas. Para isso, foi utilizada uma tela que aprisiona a rainha sobre uma região do favo (Figura 5B) contendo células de cria vazias. Cada postura foi realizada em um período de 6 horas, o que corresponde ao limite máximo de variação temporal no desenvolvimento dos indivíduos analisados nesse estudo. Após esse período, a rainha foi retirada do confinamento. Manteve-se a tela sobre o favo, para impedir o retorno da rainha, evitando assim recorrência de postura nessa região. Para todos os experimentos foi usada exclusivamente a colônia nº. 118, do apiário do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A Tabela I resume as fases do desenvolvimento pós-embrionário em que foram coletadas as amostras.

Tabela I – Fases do desenvolvimento de abelhas *Apis mellifera* analisadas no presente trabalho.

Fase	Casta	Descrição do estágio	Sigla
Larval	Operária	Larva de segundo estágio	L2*
		Larva de terceiro estágio	OpL3
		Larva de quinto estágio, em fase inicial de tecelagem de casulo	OpL5S1
		Larva de quinto estágio, em fase intermediária de tecelagem de casulo	OpL5S2
	Rainha	Larva de quinto estágio, em fase intermediária de tecelagem de casulo	RL5S2
Adulta	Operária	Recém-nascida	OpRN
		7 dias	Op7d
	Rainha	Recém-nascida	RRN

* L2 - mesmo presentes nas células de cria de operárias, as larvas desse estágio podem ser transferidas manualmente para células de cria de rainha (também chamadas cúpulas de rainha ou realeiras). Nesse trabalho, L2 foram utilizadas para o desenvolvimento de ambas as castas.

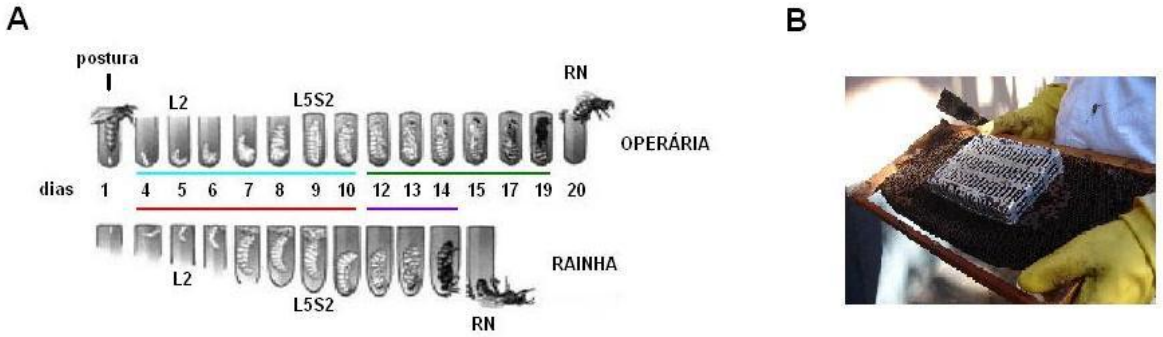

Figura 5 – Material biológico. **A** – Ciclo de vida de operárias e rainhas de *A. mellifera*. Para fases do desenvolvimento pós-embrionário com siglas, consultar Tabela I. Em azul (para operárias) e vermelho (para rainhas), duração do período larval. Em verde (para operárias) e roxo (para rainhas), duração do período pupal. **B** – Tela que aprisiona a rainha sobre uma região do favo, para procedimentos de postura controlada.

Para definição dos estágios larvais em operárias foram utilizados os parâmetros propostos por Michelette e Soares (1993): peso e horas de desenvolvimento após a eclosão das larvas a partir do ovo. O parâmetro medida do diâmetro da cabeça (cápsula cefálica), proposto pelos autores, não foi utilizado a fim de minimizar a manipulação dos indivíduos. Larvas L2 pesam entre 0,31-1,05 mg e seu desenvolvimento ocorre entre 20-35 h após a eclosão. Larvas OpL3 pesam entre 1,5-4,45 mg e seu desenvolvimento ocorre entre 35-55 h após a eclosão. Larvas OpL5S1 e OpL5S2 possuem peso médio igual a 124,21±7,48 mg e 117,88±4,65 mg, respectivamente. Nesta fase, as células de cria encontram-se completamente operculadas ("seladas") e o tempo de desenvolvimento após eclosão da larva varia entre 130-145 h. Definiu-se, para esse trabalho, o período de 120 h e 137 h após a eclosão da larva como limite para coleta de OpL5S1 e OpL5S2, respectivamente. Para obtenção de operárias adultas de idade conhecida, OpRN e Op7d, favos contendo pupas, 19 dias após postura (véspera da emergência), foram acondicionados em suportes telados e os mesmos mantidos em estufa (Retilínea, FANEM Ltda.) a 34ºC e 80% de umidade relativa (UR). As abelhas que emergiram em um intervalo de 24 h foram classificadas como OpRN. Exemplares de OpRN foram mantidas em estufa (34ºC e 80% UR) em caixas de confinamento medindo

8x11x13cm, com troca diária de água e dieta (mistura de 30g de pólen, 60g açúcar e 2mL de mel), oferecidos *ad libitum*. Em seguida, foram coletadas operárias com sete dias de idade (Op7d).

Para produção de rainhas, larvas L2 foram instrumentalmente transferidas para cúpulas artificiais, que mimetizam células de cria naturais (realeiras), em barras contendo de 10-14 cúpulas e inseridas em caixas (colônias) do tipo recria. O estágio RL5S2 foi definido segundo critérios de Nunes-Silva et al. (2006): peso médio 274,89±61,3 mg e nove dias após a postura. Para obtenção de rainhas adultas recém-nascidas (RRN), barras contendo realeiras 24 h antes da emergência (equivalente a 14 dias após postura) foram mantidas em estufa a 34ºC e 80% UR.

3.3 – Extração de RNA

O RNA total foi extraído de amostras de larvas e adultos listados na Tabela I. Os indivíduos coletados na fase larval foram colocados, separadamente, em microtubos de polipropileno (estéreis, livres de RNase e DNase, Eppendorf) contendo 500 µL de TRIzol® (solução de fenol e isotiocianato de guanidina, Invitrogen), e homogeneizados com o auxílio de ponteiras plásticas para micropipetador de 200 µL (estéreis e livres de RNase e DNase). Os microtubos foram incubados por 10 min à temperatura ambiente (TA) para lise de membranas e dissociação dos complexos nucleoproteicos e, em seguida, mantidos em freezer -80ºC *Ultra Low* (Sanyo) até a extração do RNA total. Para adultos, apenas o abdômen, depois de retirado o intestino, foi estocado, individualmente, em microtubos contendo 500 µL de TRIzol®, seguido dos passos descritos acima. A extração de RNA total foi conduzida de acordo com as instruções do fabricante para tecidos com alto teor de gordura. As amostras passaram por uma centrifugação inicial de 13.000 x *g*, a 4ºC, por 10 min para separação das carcaças. Em

seguida, os sobrenadantes de TRIzol® foram transferidos para tubos de 2 mL, adicionando-se 100 µL de clorofórmio (MERCK). Após agitação manual por 15 s e incubação à TA por 3 min, as soluções foram centrifugadas a 12.000 x *g* a 4ºC, por 15 min. Para as amostras de larvas (OpL5S1, OpL5S2 e RL5S2), devido ao excesso de gordura, repetiu-se a etapa de clorofórmio. Os sobrenadantes (fase transparente, aproximadamente 400 µL) foram transferidos para microtubos de 1,5 mL acrescidos de 250 µL de isopropanol (MERCK). Após 10 s em aparelho agitador de tubos tipo vortex, incubação das amostras por 10 min à TA e centrifugação a 12.000 x *g* a 4ºC, por 10 min, os sobrenadantes foram descartados. Os produtos precipitados (*pellets*) foram lavados com 500 µL de etanol 75% (v/v, MERCK) mediante agitação em vortex e novamente centrifugados a 7.500 x *g* a 4ºC, por 5 min. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e os microtubos colocados em termobloco *Digital Dry Bath Incubator* (Boekel) a 55ºC, por 5 min, para evaporação de etanol residual. Para evitar degradação por RNases, os *pellets* foram ressuspendidos em 10-50 µL de água ultra-pura (purificada por osmose reversa, em seguida pelo sistema *Milli-Q Plus*) tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, 0,1% (v/v), Sigma) e autoclavada a 1 atm de pressão a 120ºC, por 50 min. As variações entre 10-50 µL na quantidade de água DEPC 0,1% utilizada se devem ao volume necessário para dissolver todo o precipitado, que apresentam rendimentos diferentes nas fases estudadas. A pureza (estimada por meio da razão entre os valores da leitura a 260 e 280 nm) e concentração (dada em µg/µL) da solução final de cada amostra foram obtidas por absorbância óptica a 260/280 nm, em espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (NanoDrop Technologies).

3.4 – Síntese de cDNA de fita simples

Volumes de RNA total, correspondentes a 1-2,5 µg, foram completados com água DEPC 0,1% para 9 µL. Adicionou-se 0,2 unidade (U) da enzima *RQ1 RNase free DNase* (1 U/µL Promega) para remoção de possível contaminação por resíduos de DNA, incubando-se em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) a 37ºC, por 40 min e, posteriormente a 70ºC, por 15 min, para inativação da enzima. A eficiência do tratamento com DNase foi testada utilizando-se o RNA total (tratado com a enzima) como molde para reação em cadeia da polimerase (sem ser submetido à reação de transcrição reversa, controle negativo). O RNA total tratado com DNase foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA de fita simples, em volume final de 20 µL, utilizando-se, por amostra, o seguinte protocolo: 1 µL de oligo$(dT)_{12-18}$ (500 ng/µL), 1 µL de uma mistura de dNTPs (10 mM), com incubação em termociclador a 65ºC por 5 min; 4 µL de tampão *5x first strand* (Invitrogen), 2 µL de ditriotreitol 0,1 M (DDT, Invitrogen), 1 µL de inibidor de RNase (*RNase OUT™*, 40 U/µL, Invitrogen), com incubação a 42ºC por 2 min; 0,5 µL de água ultra-pura autoclavada (aqui designada de **água UPA**) e 0,5 µL da enzima *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (200 U/µL, Invitrogen), com incubação a 42ºC por 50 min, com posterior ciclo de inativação da enzima a 70ºC por 15 min. Como controle negativo, foram preparadas reações sem a enzima *SuperScript™ II*. Variações entre 1-2,5 µg na quantidade de RNA total utilizado foram proporcionais aos rendimentos das extrações, os quais são diferentes entre as fases estudadas.

3.5 – Síntese de RNA de fita dupla

3.5.1 – Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para síntese de RNA de fita dupla para o gene codificador de vitelogenina foram os mesmos desenhados por Amdam et al. (2003b) na região do último éxon, a saber: T7Vg-F (*primer sense*) – 5´TAATACGACTCACTATAGGGCGAACGACTCGACCAACGACTT e T7Vg-R (*primer anti-sense*) – 5´TAATACGACTCACTATAGGGCGAAACGAAAGGAACGGTCAATTCC. O gene que codifica para *green fluorescence protein* (GFP), sem homólogo no genoma de *A. mellifera*, foi utilizado como controle exógeno, sendo a seqüência de seus *primers* para produção de RNA de fita dupla: T7GFP-F (*primer sense*) – 5'TAATACGACTCACTATAGGGCGAAGTGGAGAGGGTGAAGGTGA e T7GFP-R (*primer anti-sense*) – 5'TAATACGACTCACTATAGGGCGAGGTAAAAGGACAGGGCCATC. Os sublinhados destacam a seqüência do promotor T7 adjacente à região de pareamento de cada *primer* ao seu gene alvo.

3.5.2 – Moldes

Uma linhagem de *Escherichia coli* DH5-α contendo plasmídeos de cDNA de fita dupla, contendo um inserto de 631 pares de base (pb) corresponde à extremidade 3´ do transcrito do gene codificador de vitelogenina (clone *AP4a5,* Piulachs et al., 2003), Foi inoculada em tubos cônicos estéreis (*Falcon*) de 15 mL contendo 5 mL de meio Luria Bertani (LB Broth 0,032 g/mL, USB) com 7,5 µL de ampicilina (200 mg/mL, USB), mantidos em estufa a 37°C, sob agitação de 150 rpm. Um tubo, com a mesma solução (meio LB e

ampicilina), que não recebeu inóculo, foi igualmente incubado e agitado, funcionando como controle negativo. Após 24 h de crescimento dos inóculos, todo o volume foi centrifugado a 5.000 x *g*, por 2 min e o excesso de meio sobrenadante foi descartado. Cerca de 500 µL restantes de meio contendo as bactérias precipitadas foram homogeneizados e utilizados para extração de plasmídeos (mini-preparação) utilizando-se o *kit FastPlasmid Mini* (Eppendorf). O produto da mini-preparação foi quantificado e submetido à digestão enzimática utilizando-se 8 µL de mini-preparação (200 ng/µL), 2 µL de tampão *10x REACT®3* (Invitrogen), 9 µL de água UPA, e 1 µL da enzima *Eco*RI (10 U/µL, Invitrogen). Os reagentes foram misturados e incubados em banho-maria digital *MultiTemp III* (Pharmacia Biotech) a 37º C, durante 1 h. Posteriormente, o produto de digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), em tampão TBE 1x (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0), contendo 10 µg de brometo de etídio/mL de gel. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 bp (*100 pb DNA Ladder*, Promega). Após eletroforese, o gel foi visualizado em transiluminador ultravioleta (*MacroVue UV-20*, Hoefer) e a imagem analisada e registrada com o auxílio do digitalizador *Kodak EDAS 290* e seu sistema *Kodak 1D 3.3.2 Image Analysis Software*.

Para confirmar a seqüência do fragmento clonado procederam-se reações de seqüenciamento independentes nas duas direções (*sense* e *anti-sense*) pelo método dideoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977). Foram utilizados 2 µL de mini-preparação plasmidial (200 ng/µL) contendo o inserto confirmado via digestão enzimática, 1 µL de *primer* (3,2 pmol/µL *primer*, T7Vg-F ou T7Vg-R), 2 µL de tampão *5x Sequencing Buffer* (Applied Biosystems), 3 µL de água UPA e 2 µL do reagente *BigDye terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction – ABI PRISM* (Applied Biosystems). O termociclador foi programado com as seguintes condições para ambas as amplificações: desnaturação das fitas a 94ºC (5 min), seguida por 25 ciclos a: 96ºC (10 s), 50ºC (5 s) e 60ºC (4 min). As amostras

foram purificadas por precipitação, adicionando-se 40 µL de isopropanol 75%, transferindo-se o conjunto para tubos de 1,5 mL. Após agitação em vortex por 10 s e incubação à TA por 15 min, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x *g*, por 20 min. Descartados os sobrenadantes, acrescentou-se 250 µL de isopropanol 75%, com posterior centrifugação a 10.000 x *g*, por 5 min. Os sobrenadantes foram novamente descartados e os *pellets* foram secos em termobloco a 60ºC, por 10 min. As amostras foram ressuspendidas em 12 µL de tampão TSR com EDTA (*Template Suppression Reagent*, Applied Biosystems), transferidos para tubos adequados para o seqüenciador automático, seguido de aquecimento a 94ºC, por 2 min, para desnaturação das fitas e, imediatamente, colocadas em gelo, após o que submetidas a eletroforese capilar em aparelho *ABI Prism*™ *310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Os cromatogramas gerados pelo seqüenciador foram interpretados pelo programa *Sequencing Analysis v3 4.1* (Applied Biosystems) e convertidos em seqüências de DNA (formato *FASTA*). Os mesmos cromatogramas serviram de entrada para alinhamento das seqüências com auxílio do programa *Sequencher*™ *version 4.7 for Windows* (Gene Codes Corporation). A seqüência consenso resultante foi confrontada com o banco público de dados *GenBank* (National Center for Biotechnology Information - NCBI) utilizando-se algoritmos BLAST (Altschul et al., 1990).

O plasmídeo pBIN-m-gfp5-ER (Siemering et al., 1996), uma construção sintética modificada do gene GFP de *Aequorea victoria* (Cnidaria, Hydrozoa), foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Maria Helena Goldman (Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo) também serviu de molde para PCR.

3.5.3 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e eletroforese

Foram preparadas reações de PCR para amplificar fragmentos dos genes codificadores de vitelogenina e GFP a partir das mini-preparações de seus clones, contendo 200 µL de *PCR Master Mix 2,5x* (Eppendorf), 20 µL de cada *primer* específico (10 pmol/µL, vide item 3.5.1 para seqüência dos *primers*), 240 µL de água UPA. Para cada reação utilizou-se 20 µL de produto de mini-preparação (200 ng/µL) do clone de cDNA de fita dupla *AP45a* (para vitelogenina) ou do clone pBIN-m-gfp5-ER (para GFP) como molde. Alíquotas de 25 µL sem adição de molde, das reações iniciais de PCR para cada par de *primers*, foram usadas como controle negativo. As reações foram divididas em microtubos contendo 50 µL cada. O termociclador foi programado com as seguintes condições para ambas as amplificações: desnaturação a 94ºC (5 min), seguida por 40 ciclos a: 94ºC (30 s), 64ºC (40 s) e 72ºC (40 s), e extensão final a 72ºC (10 min).

Os produtos amplificados (5 µL) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, acompanhados com marcador de peso molecular de 100 pb. Após eletroforese, os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta e as imagens analisadas e documentadas.

3.5.4 – Produção de RNA de fita dupla em larga escala

Os fragmentos amplificados foram diretamente purificados sob centrifugação em micro-colunas usando o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e suas recomendações. Os produtos purificados foram quantificados em espectrofotômetro. Para transformação de moléculas de cDNA de fita dupla em RNA de fita dupla, utilizou-se o *kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production System - T7* (Promega), misturando-se: 20 µL de tampão de transcrição T7, 30 µL mistura de de rNTPs (25 mM), 5 µg de produto de PCR

(vitelogenina ou GFP), completando-se com água ultra-pura livre de RNase (*Nuclease free water*, Promega), para volume final de 100 µL. As reações foram incubadas em termociclador a 37ºC, por 16 h. Os produtos das reações foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, onde se adicionou 750 µL de TRIzol® LS (Invitrogen) e 150 µL de água ultra-pura livre de RNase, que foram incubados à TA por 5 min. Para extração, foi acrescentado 200 µL de clorofórmio, agitou-se vigorosamente por 15 s, incubou-se à TA por 3 min, seguido de centrifugação a 12.000 x *g*, a 4ºC por 15 min. Os sobrenadantes (fase transparente, aproximadamente 600 µL) foram transferidos para novos tubos, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol. Após leve agitação manual por 10 s, incubaram-se as amostras à TA, por 10 min, seguido de centrifugação a 12.000 x *g*, a 4ºC, por 10 min e posterior descarte de sobrenadante. Os produtos precipitados (*pellets* grandes e transparentes) foram lavados em 1 mL de etanol 75%, agitando-se rapidamente em vortex e, novamente, centrifugando-se a 7.500 x *g*, a 4ºC por 5 min. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e os microtubos colocados em termobloco a 55ºC por 5 min para evaporação do resíduo de etanol. Os *pellets* foram ressuspendidos em 50 µL de água UPA. A concentração (dada em µg/µL) da solução final de cada amostra foi quantificada por absorbância óptica a 260/280 nm, em espectrofotômetro. Os fragmentos de RNA de fita dupla, provenientes dos produtos de cDNA, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% acompanhada com marcador de peso molecular de 100 pb. Após eletroforese, as imagens foram analisadas e documentadas.

3.6 – Padronização do silenciamento do gene codificador de vitelogenina

Com o objetivo de estabelecer um tratamento para o silenciamento do gene codificador de vitelogenina no desenvolvimento pós-embrionário, que minimizasse os efeitos da manipulação dos indivíduos, foram testadas quatro concentrações de RNA de fita dupla

específico para o gene alvo (designado de **dsVg**, *double-stranded RNA for vitellogenin*), a saber: 0,5 µg, 3,0 µg, 5,0 µg e 10,0 µg, oferecidas na dieta natural de larvas (geléia real), 92 h após o término da postura controlada (20 h após a eclosão da larva, equivalente a L2). Também foram realizados tratamentos com doses de 0,5 µg, 3,0 µg e 5,0 µg de RNA de fita dupla do gene exógeno GFP (designado de **dsGFP,** *double-stranded RNA for green fluorescence protein*), como controles. Larvas sem tratamento, de uma mesma postura, foram também usadas como controles. As concentrações mencionadas de RNA de fita dupla foram calculadas para um volume máximo de 1 µL. As soluções, à TA, foram cuidadosamente depositadas sobre a geléia real, com auxílio de micropipetador de 0,5-2 µL (Figura 6A). As células de cria tratadas foram mapeadas em folha plástica transparente colocada sobre o favo (Figura 6B), utilizando-se canetas de retroprojetor de diferentes cores para assinalar tratamentos distintos. Após tratamento, o favo foi embalado com pano úmido, para evitar ressecamento das larvas, e mantido em estufa a 34ºC e 80% UR, por 2 h. Após esse período, o favo retornava para a colônia nº. 118. Em cada coleta, a folha transparente, contendo o registro dos locais de tratamento, foi colocada sobre o favo para identificar os indivíduos de interesse. Larvas e adultos foram coletados ao longo do desenvolvimento pós-embrionário, como descrito no item 3.2. Os pesos de OpL5S2, RL5S2, OpRN e RRN foram anotados. Foi realizado um tratamento adicional, aplicando-se 1 µL de água UPA à TA, sobre a dieta de L2.

3.7 – Registro da viabilidade dos tratamentos

O favo foi retirado da colônia para contagem do número de larvas (mantidas e removidas), 24 h após cada tratamento. Contagens também foram realizadas 209 h após a postura (que corresponde a 117 h após o tratamento), quando as células de cria de rainhas e operárias já se encontravam operculadas (Figura 7).

Figura 6 – Tratamento de larvas diretamente no favo. **A** – Aplicação de RNA de fita dupla sobre a dieta natural das larvas. **B** – Folha plástica transparente, presa ao favo, para mapear as células de cria que receberam tratamento.

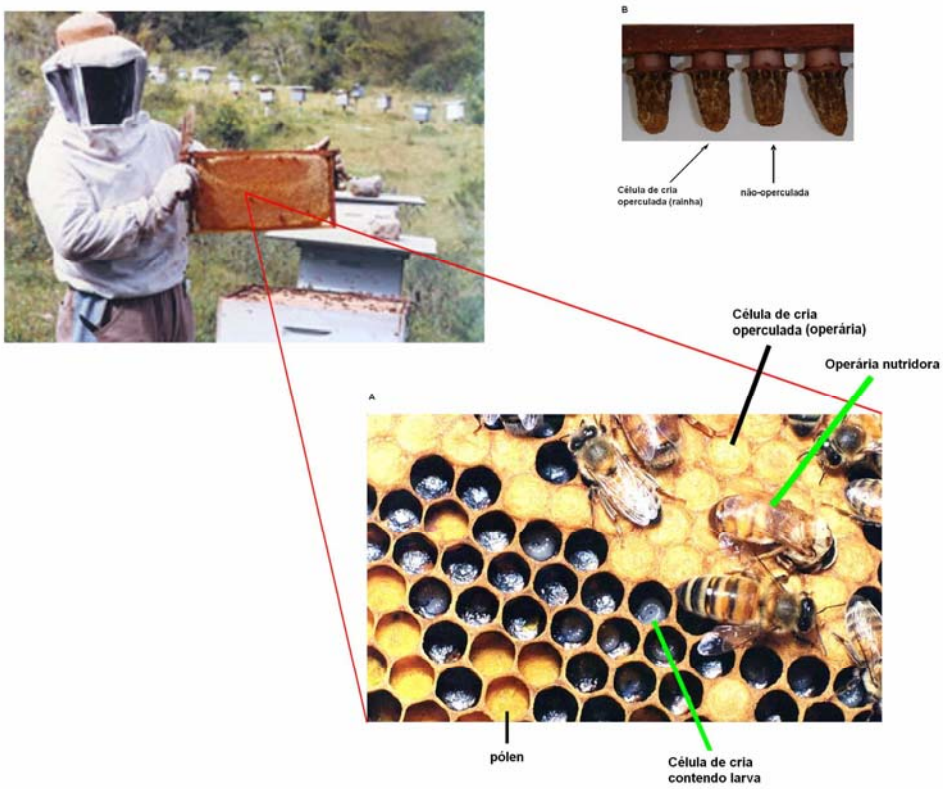

Figura 7 – Células de cria de operárias (naturais) e rainhas (artificiais) de *A. mellifera*. **A** – Detalhe de parte do favo, com células contendo pólen, larvas jovens (não-operculadas) e células de cria, para operárias, já operculadas. **B** – Cúpulas artificiais (que mimetizam realeiras naturais) operculadas e não-operculadas.

3.8 – Definição das doses de RNA de fita dupla

Os resultados obtidos mostraram 0,5 µg de dsVg e 0,5 µg de dsGFP como as doses mais indicadas para tratamento no período larval (L2) e, assim, utilizadas para dar prosseguimento à análise experimental.

3.9 – Expressão relativa do gene codificador de vitelogenina

3.9.1 – PCR quantitativa em tempo real

Para quantificar a expressão relativa do gene que codifica a vitelogenina utilizaram-se larvas inteiras e abdomens sem intestino de indivíduos adultos, previamente tratados com 0,5 µg de dsVg e seus controles (sem tratamento e tratados com 0,5 µg de dsGFP), e análise por PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Amostras de cDNA de fita simples sintetizadas a partir de quantidades conhecidas de RNA total foram diluídas em água UPA numa concentração de 0,2 µg/µL. Os *primers* utilizados para avaliar a expressão do gene codificador de vitelogenina, Vg-RT-F (*primer sense*) – 5´ GCAGAATACATGGACGGTGT e Vg-RT-R (*primer anti-sense*) – 5´ GAACAGTCTTCGGAAGCTTG, amplificam 146 pb do 3º éxon desse gene, distante da região de silenciamento (7º éxon). Para a normalização dos experimentos foram utilizados os *primers* Act-F (*primer sense*) – 5´ TGCCAACACTGTCCTTTCTG e Act-R (*primer anti-sense*) – 5´ AGAATTGACCCACCAATCCA, que flanqueiam um trecho de 156 pb do gene que codifica a actina de *A. mellifera* (número de acesso: AB023025), cuja expressão é constitutiva em todas as fases do desenvolvimento (Amdam et al., 2004a; Aronstein e Saldivar, 2005; Guidugli et al., 2005a; Bitondi et al., 2006).

A eficiência das reações utilizando ambos os pares de *primers* de vitelogenina (Vg-RT-F + Vg-RT-R) e de actina (Act-F + Act-R) foi previamente analisada pela Dra. Adriana Mendes do Nascimento (Pós-doutoranda do Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo) em reações de qPCR utilizando-se diluições em série 1:10 de cDNA e construção de curvas de regressão linear específicas para cada par. O valor Slope, fornecido pela curva, foi utilizado para avaliar a eficiência da reação (E) utilizando-se a fórmula E=10(-1/Slope) (User Bulletin#2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System). Indica-se que os valores de E estejam próximos a 2. Para os *primers* de vitelogenina (Vg-RT-F + Vg-RT-R) os valores Slope e E foram -3,289686 e 2,013633, respectivamente. E, para os *primers* de actina (Act-F + Act-R), os valores Slope e E foram -3,315632 e 2,002634, respectivamente.

R^2 é o fator de correlação linear entre as concentrações do produto amplificado e os valores de seus ciclos limítrofes (*treshold cycle*, $\mathbf{C_T}$); quanto mais próximo do valor 1, mais adequado. O fator R^2 para o par de *primers* de vitelogenina (Vg-RT-F + Vg-RT-R) foi igual a 0,9997 e, para o par de *primers* de actina (Act-F + Act-R), igual a 0,9995. $\mathbf{C_T}$ são pontos de cinética da reação que representam, em valores, a quantidade de ciclos de amplificação necessários para detecção da expressão de um gene. O $\mathbf{C_T}$ é inversamente proporcional à quantidade de molde e sua análise é indicada a partir de um ponto comum em que as amostras analisadas emitem fluorescência acima dos ruídos da reação (*background*).

Para as análises por PCR quantitativa em tempo real foi utilizado o protocolo do reagente *SYBR® Green* (Applied Biosystems). A reação final consistiu num volume final de 20 µL, contendo: 0,8 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 7,4 µL de água UPA, 10 µL de solução *SYBR Green 1x* (Applied Biosystems) e 1 µL de cDNA de fita simples (0,2 µg/µL). Para cada indivíduo foram montadas reações em triplicata para o gene alvo (vitelogenina) e endógeno (actina), processadas em aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied

Biosystems), nas seguintes condições para ambas as amplificações: 50ºC (2 min), 95ºC (10 min), seguidos por 40 ciclos de: 95ºC (15 s), 60ºC (1 min). O ciclo de dissociação para ambos os *primers* foi 95ºC a 61ºC (15 s em cada grau), 60ºC (1 min), 61ºC a 95ºC (15 s em cada grau). Reações sem adição de molde foram usadas como controle negativo e, posteriormente, submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, constatando-se ausência de bandas. A especificidade dos produtos de PCR foi verificada por análise da curva de dissociação para cada amostra. Foram observados picos únicos, que indicam reações específicas.

3.9.2 – Análise dos dados

Para análise dos dados foram extraídos os valores ciclo-a-ciclo da densidade relativa de fluorescência (DRn) emitida por cada triplicata de uma mesma amostra, organizados em planilhas individuais de *Excel for Windows* (Microsoft), para cada gene e fase do desenvolvimento estudados. Essa planilhas serviram de entrada no programa *LinRegPCR* (Liu e Saint, 2002; Ramakers et al., 2003), que permite assumir um valor de corte (*treshold*) dentro de uma faixa em que as amostras estão verdadeiramente com amplificação exponencial. Definido o *treshold*, os três valores de $\mathbf{C_T}$ para cada amostra e gene foram listados, excluindo-se sempre o mais discrepante e calculando a média (***m***) entre os outros dois ($\mathbf{C_{T}}\boldsymbol{m}$). A partir de então foi utilizado o método convencional $\mathbf{2^{-\Delta\Delta C_T}}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Resumidamente, procedeu-se cálculo da média ($\bar{x}$) entre o valor de $\mathbf{C_{T}}\boldsymbol{m}$ para amostras de um mesmo tratamento, controle e/ou fase do desenvolvimento ($\mathbf{C_{T}}\boldsymbol{m}\bar{x}$). Para normalização, as diferenças entre os valores $\mathbf{C_{T}}\boldsymbol{m}\bar{x}$ do gene alvo (vitelogenina) e controle endógeno (actina) correspondentes foram calculadas ($\mathbf{\Delta C_{T}}\boldsymbol{m}\bar{x}$). Cada valor $\mathbf{\Delta C_{T}}\boldsymbol{m}\bar{x}$ foi subtraído do maior valor $\mathbf{\Delta C_{T}}\boldsymbol{m}\bar{x}$ (correspondente à amostra, seja tratamento, controle e/ou fase do desenvolvimento, com menor expressão média do gene alvo), resultando num indicador da expressão gênica

relativa, chamado $\Delta\Delta C_{Tm}\bar{x}$. Assim, os $\Delta\Delta C_{Tm}\bar{x}$ nos tratamentos, controles e/ou fases do desenvolvimento foram expressas pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, sendo atribuído o valor igual a 1 ao grupo com menor expressão do gene codificador de vitelogenina e as demais tornadas proporcionais a essa.

3.10 – Coleta de hemolinfa e quantificação total de proteínas

A hemolinfa foi coletada de OpL5S2 e RL5S2 a partir de uma incisão no vaso dorsal, entre o 2º e 3º tergitos abdominais e com auxílio de pipeta 0,5-10 µL, sob estereomicroscópio. Indivíduos adultos (rainhas e operárias) foram anestesiados em gelo e imobilizados em placas de dissecção antes da coleta de hemolinfa. Exceto para a quantificação dos títulos de hormônio juvenil (ver item 10), amostras de hemolinfas foram armazenadas, individualmente, em microtubos de 200 µL e centrifugadas a 2.000 x *g*, por 3 min à TA, para precipitação de hemócitos e células de corpo gorduroso. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e estocados a -20ºC. Alíquotas de 2 µL de hemolinfa obtidas de cada indivíduo foram diluídas 1:5 em água UPA. As quantidades totais de proteínas circulantes foram estimadas pelo método de Bradford (1976), utilizando-se 1 µL dos volumes de hemolinfa diluídos, para cada indivíduo. As leituras foram realizadas a 595 nm, em aparelho *Ultrospec 2100 pro* (Pharmacia). As concentrações foram expressas em µg/µL, com base numa curva de regressão padrão dada pela quantificação seriada de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (UBS).

3.11 – Eletroforese das amostras de hemolinfa

3.11.1 – Preparação de géis e tampões

Para análise eletroforética de proteínas presentes na hemolinfa de abelhas Op7d e RRN, foram utilizados géis de poliacrilamida compostos de duas partes, empacotamento (4,26%) e separação (7,5%), com modificações a partir de Laemmli (1970), sem adição de dodecilsulfato de sódio (SDS). Para o gel de separação foram utilizados: 2,5 mL de solução acrilamida/bis-acrilamida (30 g de acrilamida, 0,8 g de bis-acrilamida, 100 mL de água UPA), 5 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 2,3 mL de água UPA, 40 µL de Tetrametil-etileno-diamina (TEMED) e 190 µL de persulfato de amônio (APS) 1% (m/v). Para o gel de empacotamento foram utilizados: 750 µL de solução acrilamida/bis-acrilamida, 2,76 mL de tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 1,65 mL de água UPA, 20 µL de TEMED e 102 µL de APS 5%. A polimerização das soluções foi realizada entre placas de vidro medindo 15x11x0,09cm. O tampão usado nas cubas dos eletrodos continha 1,515 g de Tris-base, 7,2 g de glicina, 0,5 g de SDS e água UPA q.s.p. 500 mL, pH 8,0.

3.11.2 – Preparação das amostras de hemolinfa e eletroforese

Diluiu-se 2 µL de cada amostra de hemolinfa de RRN em água UPA q.s.p. 10 µL (5x diluída). Desse total, 1 µL, por amostra, foi utilizado para eletroforese (aproximadamente 4 µg de proteínas). Para Op7d utilizou-se 1 µL de hemolinfa sem diluição (aproximadamente 30 µg de proteínas). Essas alíquotas foram homogeneizadas em 14 µL de tampão da amostra (1,25 mL Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, 0,5 mL de sacarose 70% (m/v), 0,1 g de SDS, 0,25 mL de β-mercaptoetanol, 10 µL de azul de bromofenol 1%, 3 mL de água UPA); em seguida

desnaturadas por ebulição por 3 min, resfriadas e centrifugadas a 7.000 x *g* por 30 s à TA e os volumes de 15µL aplicados em cada raia do gel. A eletroforese vertical das proteínas foi processada a uma corrente constante de 15 mA e a 4ºC, até que a migração do corante atingisse a extremidade inferior da placa de vidro. Foi utilizado um marcador de massa molecular (Sigma-Aldrich) constituído das seguintes proteínas: miosina (205 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosforilase-B (97 kDa), albumina sérica (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). O gel foi corado por 30 min com *Comassie Brillant Blue R-250* 1% (m/v, Sigma-Aldrich) dissolvido em solução de etanol, água UPA e ácido acético (Synth), na proporção de 5:5:1 (v/v), por 12 h. Posteriormente, o gel foi lavado em solução etanol, água UPA e ácido acético, na proporção de 3:6:1 (v/v), por 12 h.

3.12 – Radioimunoensaio para quantificação de Hormônio Juvenil (HJ)

Essa etapa do trabalho foi realizada pelo Prof. Dr. Klaus Hartfelder (Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo). Para extração de HJ a partir de hemolinfa de *A. mellifera* foi utilizado o protocolo de Huang et al. (1994). Volumes de 5 µL de hemolinfa de amostras de OpL5S2 e RL5S2 tratadas com 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP foram, individualmente, estocados em tubos de vidro de 1 mL contendo 500 µL de acetonitrila (MERCK). As soluções foram agitadas em vortex e centrifugadas a 7.000 x *g* a 4ºC, por 3 min. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de 5 mL, aos quais foram adicionados 1 mL de NaCl 0,9% (m/v) e 1 mL de hexano (MERCK), cuidadosamente agitados e mantidos em gelo por 10 min. As soluções foram centrifugadas a 7.000 x *g* a 4ºC, por 5 min, após o que os sobrenadantes (fase de hexano) foram transferidos para novos tubos. Os passos a partir da adição de 1 mL de hexano foram repetidos por mais duas vezes, garantindo um volume total

de extrato em hexano de 3 mL por amostra. Em seguida, o solvente foi evaporado em sistema de centrifugação a vácuo (*SpeedVac® Plus SC110 A*, SAVANT) e os resíduos secos foram redissolvidos em 50 µL de tolueno (MERCK). Os extratos em tolueno foram transferidos para tubos de radioimunoensaio (vidro, 1 mL) e os tubos de extração lavados com mais 50 µL de tolueno. Para construção da curva padrão foram pipetados 0,5, 1, 2, 5, 10, 50 e 100 µL de solução de HJ III (100 ng/mL, Fluka) em tubos de radioimunoensaio. Os tubos das amostras e os da curva padrão foram levados para centrifugação a vácuo, para remoção dos solventes. Foram acrescentados 50 µL de solução *tracer* (solução de [10-^{3}H(N)]-HJ III – atividade específica de 19,4 Ci/mmol, Life Science Products) diluída em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 e azida sódica 0,02% (MERCK), com sinal correspondente a 6500 cpm/50 µL por tubo. Exceto para o controle zero da curva padrão, foram acrescentados 200 µL de anticorpo (soro#5, anti-HJ III, produzido em coelhos, Goodman et al., 1990, 1995), diluído 1:1000 em solução *carrier* (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, suplementado com albumina de soro bovino (0,1%, Serva) e imunoglobulina G de coelho (0,1%, Sigma). Ao controle zero da curva padrão acrescentou-se 200 µL de solução *carrier,* sem anticorpo específico. Todos os tubos foram agitados vigorosamente em vortex e mantidos a 4ºC, por 16 h. Em seguida, foram adicionados 250 µL de solução saturada de sulfato de amônio, por tubo, para precipitação das proteínas, novamente submetidos a agitação, deixados a 4ºC por 30 min, e centrifugados a 7.500 x *g* à TA, por 15 min. Descartados os sobrenadantes, foram adicionados aos precipitados 500 µL de solução saturada de sulfato de amônio 50%. Os tubos foram agitados, e novamente incubados e centrifugados. Descartaram-se os sobrenadantes e os precipitados foram ressuspendidos em 40 µL de água UPA, agitados, e as soluções transferidas para frascos de cintilação líquida. Repetiu-se a lavagem dos frascos contendo produto precipitado, com 40 µL de água UPA, acrescentando esse volume a cada tubo de cintilação líquida. Acrescentou-se ainda 5 µL de líquido de cintilação (HiSafe Optiphase 3, Perkin Elmer) por tubo, que foram agitados e

acomodados em espectrômetro de cintilação líquida (*Multi-purpose Scintillation Counter/LS 6500*, Beckman) para quantificação de HJ III circulante nas hemolinfas. Os valores das leituras da curva padrão foram transformados em valores log/logit e, por regressão linear, os valores de leitura das amostras foram expressos em pg equivalentes de HJ III/µL de hemolinfa. As leituras dos títulos de HJ de OpL5S2 e RL5S2 sem tratamento e tratadas com 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP foram comparadas aos dados de Rachinsky et al. (1990).

3.13 – Morfologia dos ovários e estruturas imaginais

Foram analisados apêndices do lado direito da abelha: a asa mesotorácica (asa maior, W_2) e a terceira perna (mais posterior, L_3), coletadas de Op7d sem tratamento e tratadas com 0,5 µg de dsVg ou com 0,5 µg de dsGFP para comparação com as mesmas estruturas de RRN sem tratamento. Ovários de OpRN sem tratamento e tratadas com 0,5 µg de dsVg ou com 0,5 µg de dsGFP foram dissecados e comparados aos de RRN sem tratamento. Todos os indivíduos foram devidamente anestesiados antes da retirada das partes mencionadas. As abreviaturas W_2 e L_3 e o reconhecimento das estruturas foram baseados em Snodgrass (1984).

3.14 – Análise estatística

Para as análises estatísticas foram utilizados os testes: *Log-Rank* sem censura - método D. Collett, qui-quadrado para tabela de contingência: L x C (com Correção de Yates), ANOVA e teste de Bonferroni. Para construção das curvas de sobrevivência utilizou-se o procedimento *Kaplan-Meier*. Para essas análises foram utilizadas as ferramentas do pacote *βioεstat* 4.0 (Ayres et al. 2005). As diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 – Análises *in silico*

4.1.1 - Estrutura do gene codificador de vitelogenina

Com o genoma da abelha *A. mellifera* (*Honey Bee Genome Consortium*, 2006) disponível, foi possível anotar manualmente a seqüência de mRNA completa para o gene codificador de vitelogenina (número de acesso: AJ517411, Piulachs et al., 2003). O gene possui 6.177 pares de bases (pb), localiza-se no cromossomo 4 (*Group4.9 amel v. 4.0*), possui 7 éxons e 6 íntrons e codifica um transcrito de 5.440 nucleotídeos (nt). Sítios canônicos de processamento, 5´- GT-AG-3´, característicos dos genes transcritos pela RNA Polimerase II (Breathnach e Chambon, 1981) foram encontrados em todas as junções éxons-íntrón-éxon. Desses, 5.313 nt correspondem à fase de leitura (ORF) que codifica 1.770 aminoácidos (aa) mais um códon de parada (TTA). A região 5´UTR é composta por 24 nt e a 3´UTR por 56 nt. O domínio von Willebrand tipo D, requerido para multimerização, está em destaque (Figura 8). Parálogos não foram encontrados no genoma. O mRNA apresenta 47 nt correspondentes à cauda poliadenilada.

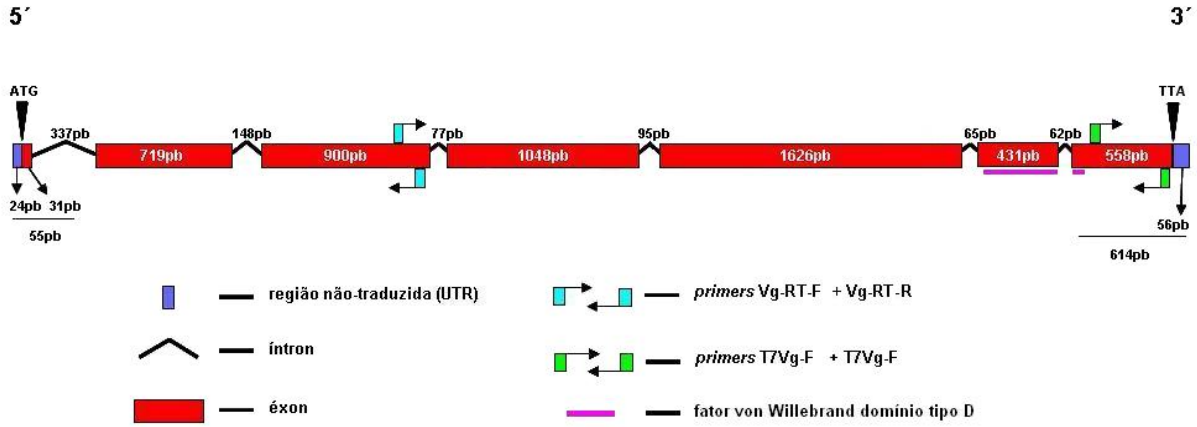

Figura 8 – Estrutura do gene codificador de vitelogenina. Os triângulos invertidos, em preto, correspondem aos códons de início (ATG) e parada (TTA) da tradução.

4.1.2 – Potenciais alvos regulatórios para microRNAs

Uma seqüência de 56 nt da extremidade 3´UTR foi analisada com o objetivo de se estimar potenciais sítios regulatórios, alvos de microRNAs. Dos 141 e 191 microRNAs maduros usados como base para análise pelos programas *MicroInspector* e *RNAHybrid*, respectivamente, 15 alinhamentos significativos foram encontrados, 6 deles redundantes (microRNAs idênticos derivados de mais de um dos insetos sob análise, ou encontrados por ambos os programas). Os resultados encontram-se resumidos na Figura 9.

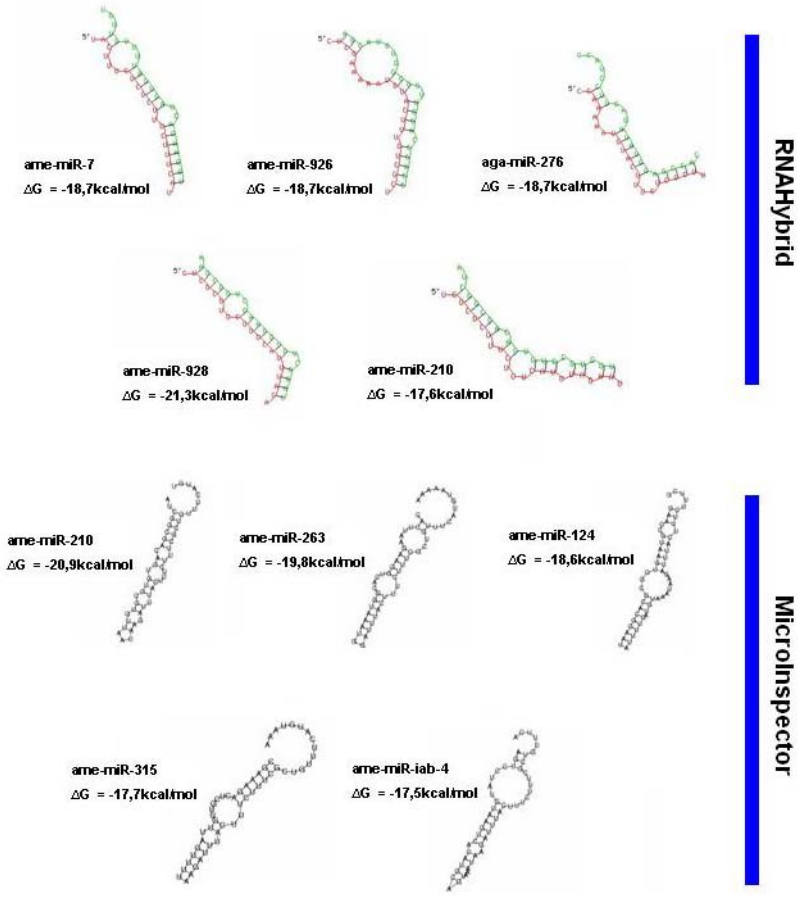

Figura 9 – Alinhamentos de microRNAs (miR) maduros com a região 3´UTR do gene codificador de vitelogenina. Para todos os alinhamentos, as fitas da esquerda correspondem à seqüência de microRNA. ΔG – variação de energia livre; ame – *Apis mellifera*; aga – *Anopheles gambiae*.

4.2 – Obtenção de moléculas de RNA de fita dupla

Os procedimentos adotados para produção de RNA de fita dupla foram bem sucedidos. O produto de digestão dos plasmídeos com a enzima *Eco*RI (Figura 10A) contendo insertos referentes ao gene que codifica a vitelogenina (clone *AP4a5*, 631 pb) no tamanho esperado foi confirmado pelo seqüenciamento automático, nas duas direções, com uso dos *primers* T7Vg. Os 494 nt seqüenciados, confrontados ao *GenBank*, resultou no alinhamento perfeito (BLAST N, e-value 0.0) com o mRNA para vitelogenina de *Apis mellifera* (nº. de acesso: AJ517411), confirmando sua origem. Esses plasmídeos serviram, em seguida, de molde para reações de PCR (Figura 10B).

Plasmídeos com inserto de GFP (pBIN-m-gfp5-ER) também foram submetidos à PCR com uso do par de *primers* T7GFP que amplificam 546 pb, incluídos os 46 pb relativos aos adaptadores do promotor T7 em suas extremidades (Figura 10B). A produção em larga escala de moléculas de RNA de fita dupla, para os genes em questão, teve rendimento (Figura 10C) variando entre 4,7-8,3 µg/µL em volumes finais de 50 µL (235-415 µg).

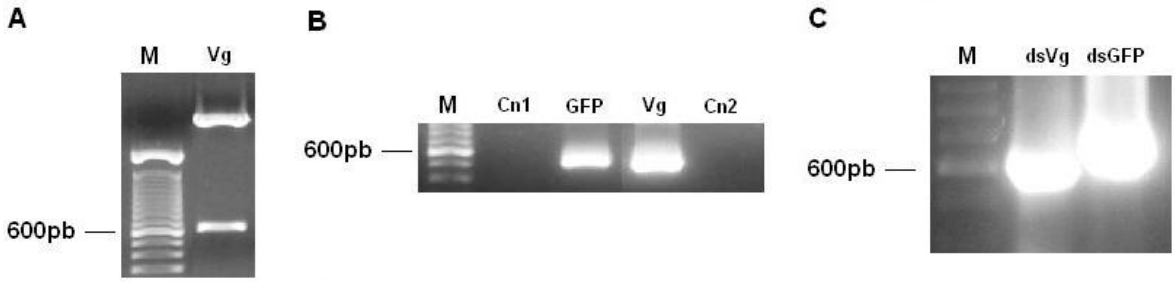

Figura 10 – Produção de RNA de fita dupla. **A –** digestão dos plasmídeos, contendo insertos de cDNA de fita dupla referentes ao gene que codifica a vitelogenina (Vg), com a enzima *Eco*RI, visualizados em gel de agarose. **B –** produtos de PCR a partir das mini-preparações dos clones *AP4a5* (Vg) e pBIN-m-gfp5-ER (GFP); Cn1 = controle negativo da reação de PCR utilizando o par de *primers* T7GFP e Cn2 = controle negativo da reação de PCR utilizando o par de *primers* T7Vg, visualizados em gel de agarose. **C –** RNAs de fita dupla para o genes que codificam vitelogenina (dsVg) e GFP (dsGFP) em gel de agarose. M = marcador de peso molecular de 100 pb.

4.3 – Delineamento experimental: alimentação de larvas L2 com dsVg

Com o objetivo de se estabelecer um tratamento eficiente para o silenciamento da expressão do gene que codifica a vitelogenina, e subseqüente análise do desenvolvimento pós-embrionário, foram testadas as concentrações de 0,5, 3,0, 5,0 e 10,0 µg de RNA de fita dupla, **dsVg**, específico para o gene alvo (Amdam et al., 2003b), oferecidos na dieta natural de L2 (postura controlada). As larvas foram coletadas 24 h após o tratamento, no estágio OpL3. Como observado na Figura 11, o tratamento com 5,0 µg de dsVg foi o mais eficiente, com redução média da expressão do gene que codifica vitelogenina em 95%, comparando-se ao controle. Nesse piloto, os tratamentos com 0,5, 3,0 e 10,0 µg de dsVg induziram o silenciamento de transcritos de vitelogenina, em média, 36%, 86% e 67%, respectivamente.

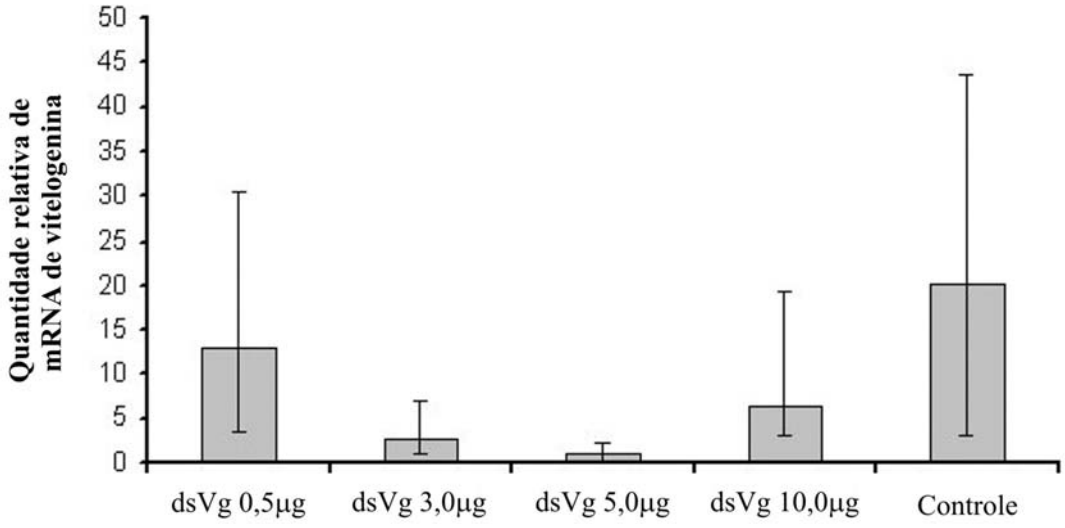

Figura 11 – Expressão relativa de mRNAs do gene codificador de vitelogenina em OpL3 coletadas 24 h após o tratamento com diferentes doses de dsVg (0,5, 3,0, 5,0 e 10,0 µg) oferecidas na dieta. Controles referem-se a indivíduos sem qualquer tratamento. A expressão do gene codificador de actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar a expressão do gene codificador de vitelogenina. A expressão média do gene alvo nas amostras dsVg 5,0 µg foi igualada a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Os dados de cada experimento correspondem à expressão relativa média (n=3) e as linhas representam o erro padrão.

4.4 – Distribuição dos grupos tratados e controle, nos favos de cria

Observações empíricas mostraram que, mantendo-se certa distância entre as células de cria que recebiam o tratamento com 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP (Figura 12), a taxa de remoção de larvas tratadas diminuiu consideravelmente.

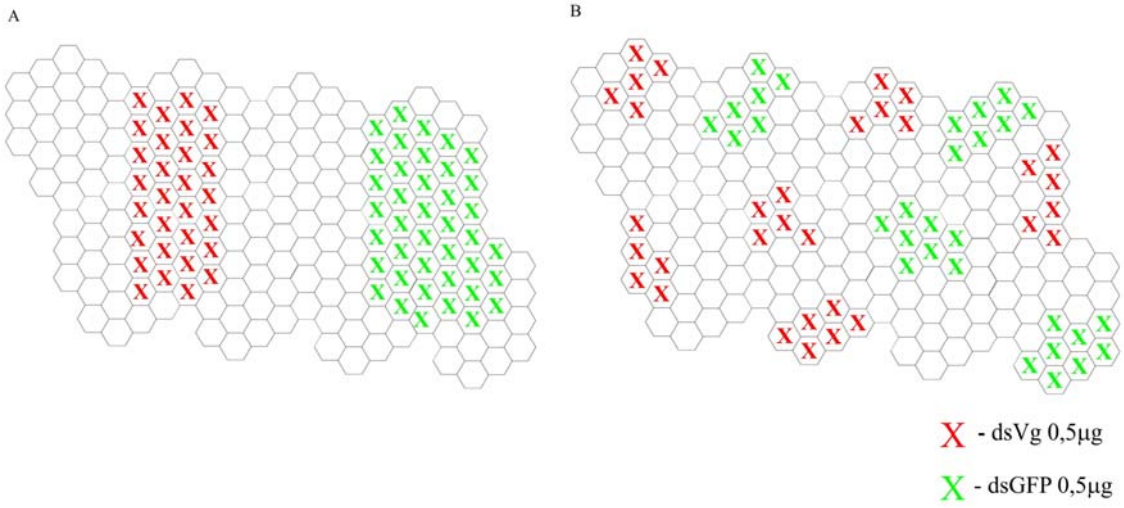

Figura 12 – Simulação de células de cria de *A. mellifera*, em favos com postura controlada, tratadas com 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP. Em **A**, tratamento em grandes blocos. Em **B**, tratamento disperso pela região da postura.

4.5 – Viabilidade dos grupos tratados e controles

Observou-se alta taxa de remoção de larvas que receberam na dieta as concentrações de 3,0 µg e 5,0 µg de dsVg, 24 h após tratamento. Os dados indicam uma menor percepção das operárias adultas (nutridoras) ao tratamento com 0,5 µg de dsVg, com conseqüente redução da remoção da cria, comparando-se às doses anteriores. A viabilidade das larvas que receberam 1µL de água UPA foi de 100%, pelo menos até 24 h após o tratamento (Tabela II).

Os resultados mostram que larvas tratadas e mantidas no favo por 24 h não são, necessariamente, mantidas até o momento da operculação das células de cria. Essa constatação está baseada no número de larvas sem tratamento e tratadas com doses de RNA de fita dupla ou água, mantidas no favo (operárias) por 117 h após tratamento (que corresponde a 209 h após a postura). Foi verificado que os controles sem tratamento também são removidos (Tabela II).

Tabela II – Viabilidade das larvas e índice de operculação das células de crias após tratamentos com dsVg, dsGFP ou água. Os dados correspondem à somatória de experimentos independentes.

Tratamento*	Indivíduos tratados	Indivíduos removidos após 24h	Viabilidade (%)	Células de cria operculadas**	Índice de operculação (%)
dsVg 0,5 µg	194	31	84,0	70/114	61,4
dsGFP 0,5 µg	152	35	77,0	66/107	61,7
dsVg 3,0 µg	113	42	62,8	-	-
dsGFP 3,0 µg	102	50	50,9	-	-
dsVg 5,0 µg	51	43	15,7	-	-
dsGFP 5,0 µg	44	41	6,8	-	-
controle água	109	00	100,0	92/109	84,4
sem tratamento	107	00	100,0	80/107	74,8

* - Tratamento com 10,0 µg de dsRNA foi realizado apenas para o ensaio preliminar (item 4.3).
** - Larvas coletadas antes da operculação para avaliar expressão do gene alvo em L3 ou transferidas para produção de rainhas em barras contendo cúpulas artificiais ou em estufa, não foram utilizadas para o cálculo do índice de operculação.

No caso das rainhas, 93 h após transferência instrumental de L2 para realeiras artificiais, quando se espera que todas as células de cria estejam operculadas, o índice de operculação foi baixo nos tratamentos comparando-se aos controles (sem tratamento), sendo inferior àquele verificado em operárias (Tabela III). Três larvas que receberam tratamento

com 5,0 µg de dsRNA e chegaram até a fase de operculação, morreram durante o processo de metamorfose.

Tabela III – Índice de operculação de rainhas tratadas e controle mantidas na colônia por 93 horas após a transferência instrumental.

	Experimento	Tratamento	Indivíduos transferidos	Células de cria operculadas	Índice de operculação (%)
rainhas	1	dsVg 5,0 µg	30	02	6,7
		dsGFP 5,0 µg	14	01	7,1
		sem tratamento	25	09	36,0
	2	dsVg 0,5 µg	18	05	27,8
		dsGFP 0,5 µg	15	04	26,7
		sem tratamento	10	09	90,0
	3	dsVg 0,5 µg	25	07	28,0
		dsGFP 0,5 µg	25	06	24,0
		sem tratamento	15	12	80,0

4.6 – Produção de rainhas em estufa

Devido ao baixo rendimento na produção de rainhas em cúpulas artificiais mantidas nas colônias, optou-se, paralelamente, em produzi-las em laboratório. Larvas no estágio L2 sem tratamento e aquelas que se alimentaram de diferentes doses (0,5 µg ou 3,0 µg) de dsVg ou de dsGFP misturados na dieta natural, por 2 h, foram transferidas para placas de cultivo de células de 24 furos (NUNC) contendo geléia real *ad libitum*, trocada a cada 24 h, e mantidas em estufa a 34ºC e 80% UR. A produção de rainhas em laboratório, mantidas em estufa (Figura 13), não obteve êxito, com morte de 100% das larvas sem tratamento e tratadas com RNA de fita dupla, até o sexto dia após o ensaio. As larvas apresentaram crescimento desigual (Figura 13B) e a morte foi constatada por falta de brilho e segmentação na cutícula, ausência de movimentos do corpo e/ou intensa melanização (Figura 13C).

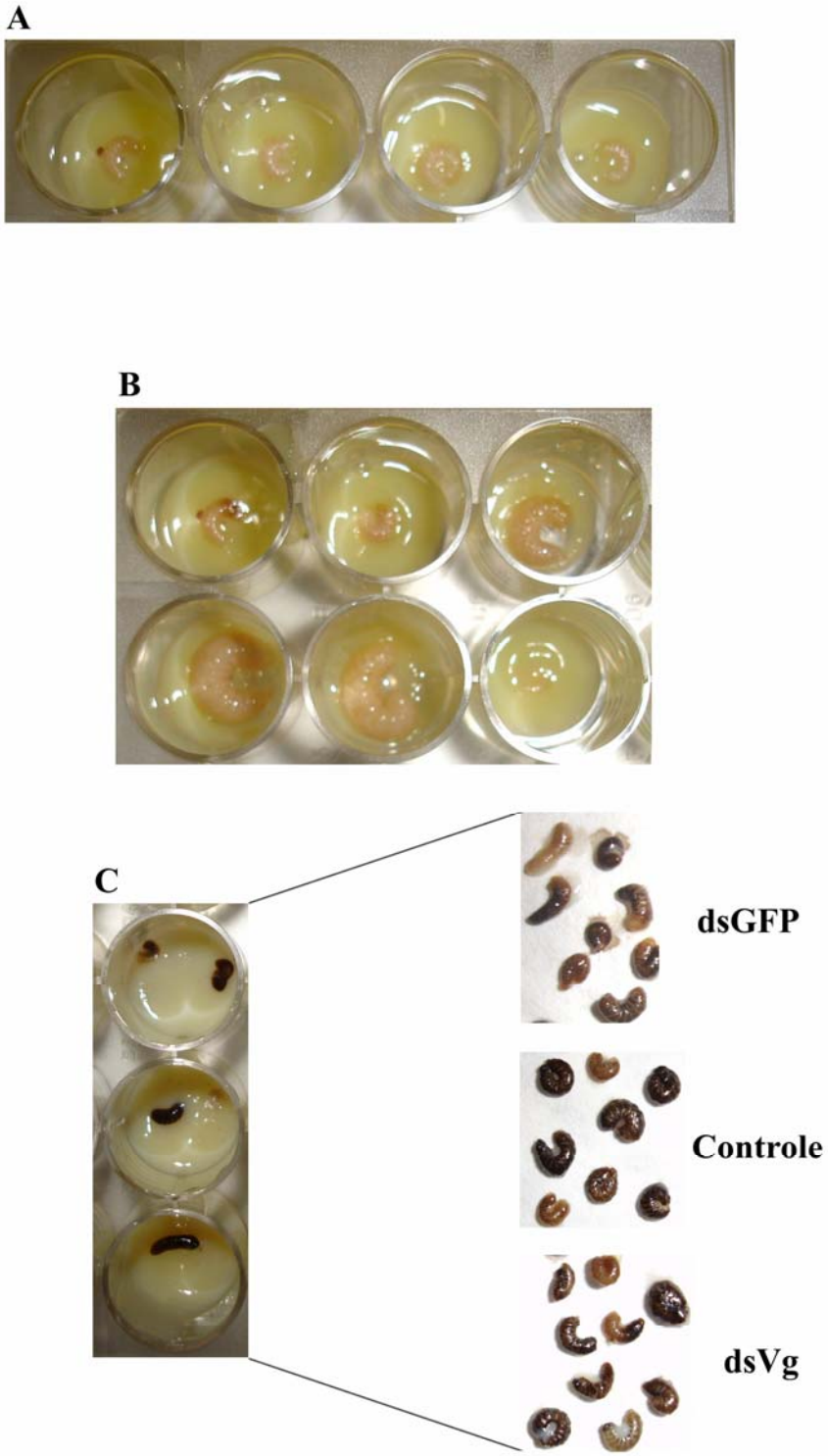

Figura 13 – Produção de rainhas *in vitro*, com geléia real *ad libitum*, mantidas em estufa a 34ºC e 80% UR. **A–** L2 sem tratamento e tratadas com diferentes doses de dsVg ou dsGFP. **B–** Crescimento desigual das larvas ao longo do experimento, independente do tratamento. **C–** Morte das larvas, constatada por intensa melanização, em todos os tratamentos.

Comparando-se os ensaios dois a dois, observa-se diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevivência das larvas tratadas com 3,0 µg de RNA de fita dupla (independente se para dsVg ou dsGFP) em relação aos demais tratamentos e controle, exceto para a comparação entre 0,5 µg de dsVg e 3,0 µg de dsGFP (Tabela IV).

Tabela IV – Sobrevivência de larvas mantidas em estufa para produção de rainhas, sem tratamento (Controle) e tratadas com doses de dsVg (0,5 µg ou 3,0 µg) ou dsGFP (0,5 µg ou 3,0 µg).

		Controle	dsVg		dsGFP	
			0,5 µg	3,0 µg	0,5 µg	3,0 µg
Controle		-	X^2=0,0033 p=0,9539	X^2=10,436 p=0,0012	X^2=0,0131 p=0,9087	X^2=6,1059 p=0,0135
dsVg	0,5 µg		-	X^2=5,9606 p=0,0146	X^2=0,0025 p=0,9604	X^2=1,9265 p=0,1651
dsVg	3,0 µg			-	X^2=7,9415 p=0,0048	X^2=1,7647 p=0,1840
dsGFP	0,5 µg				-	X^2=5,8786 p=0,0153
dsGFP	3,0 µg					-

Estão em destaque, comparações que apresentam diferenças significantes (p<0,02), segundo o teste *Log-Rank* sem censura - método D. Collett. Grau de liberdade (*gl*) = 1, para todas as comparações.

As curvas de sobrevivência de cada tratamento estão ilustradas na Figura 14A. Para verificar se há efeito cumulativo da dose sobre a mortalidade precoce das larvas de rainhas produzidas em estufa, foi realizada análise agregando-se os resultados dos experimentos que utilizaram doses iguais de dsVg e dsGFP, chamados dsRNA 0,5 µg e dsRNA 3,0 µg. Não há diferença significativa (segundo o teste *Log-Rank* sem censura - método D. Collett) no tempo de sobrevivência entre larvas sem tratamento (Controle) e tratadas com 0,5 µg de dsRNA (X^2=0,0248, *gl*=1, p=0,8748). No entanto, o tempo de sobrevivência é significativamente maior nos grupos Controle (X^2=11,4440, *gl*=1, p=0,0007) e tratados com 0,5 µg de dsRNA (X^2=9,6423, *gl*=1, p=0,0019) se comparados ao grupo tratado com 3,0 µg de dsRNA (Figura 14B).

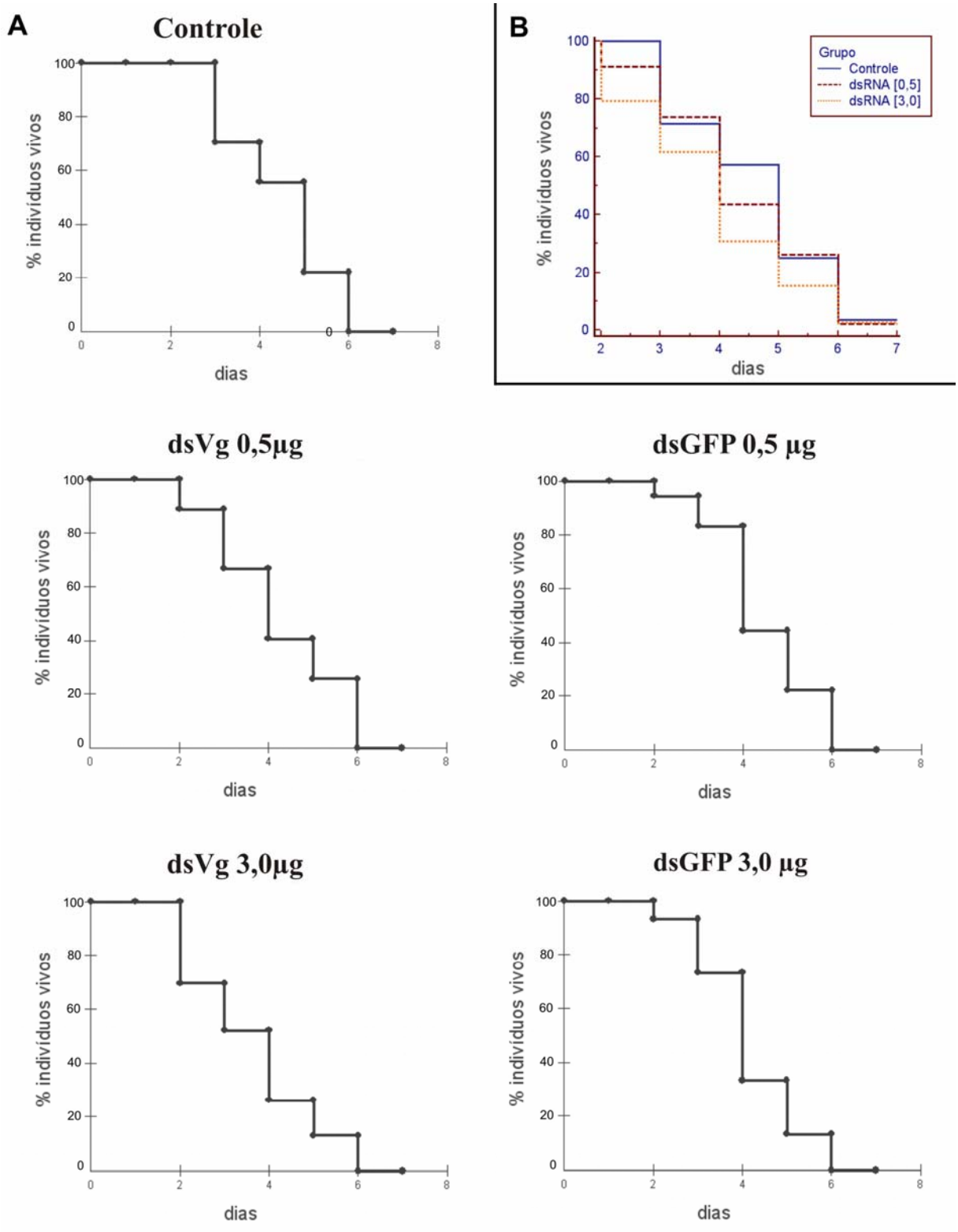

Figura 14 – Curvas de sobrevivência de larvas de rainha em estufa. **A –** sem tratamento (Controle) e tratadas com doses de dsVg (0,5 µg ou 3,0 µg) ou de dsGFP (0,5 µg ou 3,0 µg). **B –** Diferenças na sobrevivência de larvas sem tratamento e tratadas com diferentes doses de RNA de fita dupla (dsRNA 0,5 µg ou 3,0 µg). Utilizou-se o procedimento *Kaplan-Meier* para construção dos gráficos e o teste *Log-Rank* sem censura - método D. Collett para análise estatística (para resultados estatísticos, ver texto).

4.7 – Desenvolvimento pós-embrionário de operárias sem tratamento e tratadas com RNA de fita dupla

Entre as pupas de operárias, tratadas e controles, foram notadas diferenças no desenvolvimento, sobretudo na data esperada de emergência (20 dias após a postura, Figura 15).

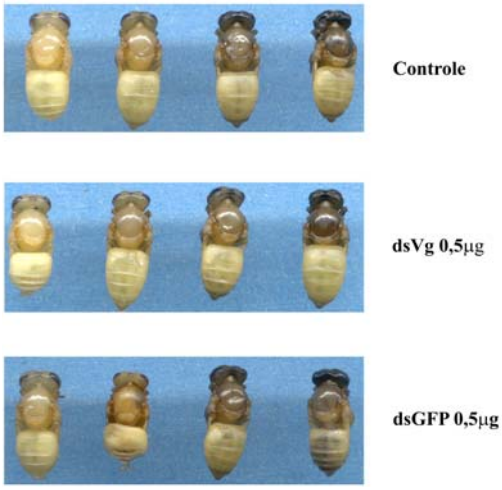

Figura 15 – Variação no desenvolvimento de indivíduos provenientes de postura controlada (diferença máxima entre os indivíduos: 6 horas). Indivíduos imaturos em diferentes estágios pupais são encontrados 20 dias após a postura, momento em que deveriam estar emergindo.

Uma vez que as diferenças também ocorreram nos indivíduos sem tratamento, foram feitas análises para detectar se o atraso verificado era maior nos grupos tratados. Assim, contabilizou-se após 20 dias o número de operárias recém-nascidas de uma postura controlada (vide Figura 5) e, simultaneamente, o número de indivíduos que ainda se encontravam na fase pupal (imaturos), como observado na Tabela V. A porcentagem de indivíduos imaturos, por grupo, foi semelhante e não houve diferença significativa (segundo teste de qui-quadrado para tabela de contingência: L x C) entre os grupos, a saber: Controle *versus* dsVg 0,5 µg (X^2 com Correção de Yates=0,026, *gl*=1, p=0,9685), Controle *versus* dsGFP 0,5 µg (X^2 com Correção de Yates=0,958, *gl*=1, p=0,4508), dsVg 0,5 µg *versus* dsGFP 0,5 µg (X^2 com Correção de

Yates=0,494, *gl*=1, p=0,6850). Logo, os valores dos três grupos foram somados, verificando-se que a porcentagem de indivíduos imaturos de uma postura controlada por 6 horas, no momento em que emergem as primeiras operárias, foi cerca de 21% (Tabela V).

Tabela V – Freqüência de indivíduos imaturos observados na data provável da emergência de OpRN provenientes de postura controlada sem tratamento (Controle) e tratadas com 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP.

Estágio	Controle	dsVg 0,5 µg	dsGFP 0,5 µg	Total
OpRN	n=184	n=34	n=29	n=247
Imaturos	n=52	n=09	n=05	n=66
Total	n=236	n=43	n=34	n=313
% imaturos	22,0	20,9	14,7	21,1

Vinte dias após a postura, momento esperado da emergência das operárias adultas, entre 50-75% dos indivíduos encontravam-se, predominantemente, no estágio de Pbd (pupa de olho marrom com intensa pigmentação torácica). Outros 20-32% encontravam-se em Pbm (pupa de olho marrom com média pigmentação torácica) e 18-20% em Pbl (pupa de olho marrom com leve pigmentação torácica). Foi verificado também que a diferença no desenvolvimento pode ser observada a partir da fase de tecelagem do casulo e operculação, principalmente nos grupos tratados.

Em um dos experimentos, propositalmente, o registro do índice de operculação ocorreu 124 h após a postura controlada (OpL5S1), período em que, mesmo com a variação de 6 h entre os indivíduos, todas as células de cria deveriam estar operculadas. Particularmente nessa situação, as células de cria contendo larvas do grupo controle estavam totalmente operculadas, enquanto a maioria das larvas tratadas com 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP eram menores, encontravam-se ainda na fase de alimentação (provavelmente larva de operária de quinto estágio, em fase de alimentação 3 - OpL5F3) e as células não-operculadas.

4.8 – Desenvolvimento pós-embrionário de rainhas sem tratamento e tratadas com RNA de fita dupla

Para rainhas, foram notadas diferenças principalmente no tamanho das larvas, em relação à fase do desenvolvimento em que se encontravam os indivíduos sem tratamento e tratados com 0,5µg de dsVg ou de dsGFP, ambos mantidos dentro das colônias em realeiras artificiais (Figura 16) ou em estufa (Figura 13B). Em relação à data provável da emergência também foi verificado um atraso. Aos 15 dias, algumas rainhas ainda estavam na fase de pupa fortemente pigmentada, ou seja, a aproximadamente 15 a 20 h da emergência (vide Figura 5).

Figura 16 – Variação observada no desenvolvimento larval de rainhas, provenientes de postura controlada (diferença máxima entre as larvas: 6 horas). A foto ilustra que após 93 h após a transferência instrumental das larvas para cúpulas artificiais, foram encontradas diferenças no tamanho de larvas com idade relativa à RL5S2.

4.9 – Expressão do gene codificador de vitelogenina durante o desenvolvimento pós-embrionário de rainhas e operárias

A expressão relativa de mRNAs do gene codificador de vitelogenina foi quantificada nos estágios larvais (OpL3, OpL5S1, OpL5S2, RL5S2) e adultos (OpRN, Op7d, RRN), por PCR em tempo real. Observaram-se níveis mais baixos da expressão do gene que codifica vitelogenina em todas as larvas analisadas quando comparados aos da fase adulta,

independente da casta. A maior expressão ocorreu em RRN, com abundância de transcritos cerca de 13 vezes maior do que Op7d. Comparadas às OpRN, essas rainhas expressaram, em média, acima de 600 vezes mais mRNA para vitelogenina. Os níveis médios de expressão do gene codificador de vitelogenina em OpL3, OpL5S2 e OpRN foram próximos, não apresentando diferenças significantes (ANOVA, $F \leq 0{,}0357$, $p \geq 0{,}846$). Todas as demais comparações apresentaram diferenças significantes (ANOVA, $F=94{,}8196$, seguido de teste Bonferroni, $p<0{,}0005$, Figura 17).

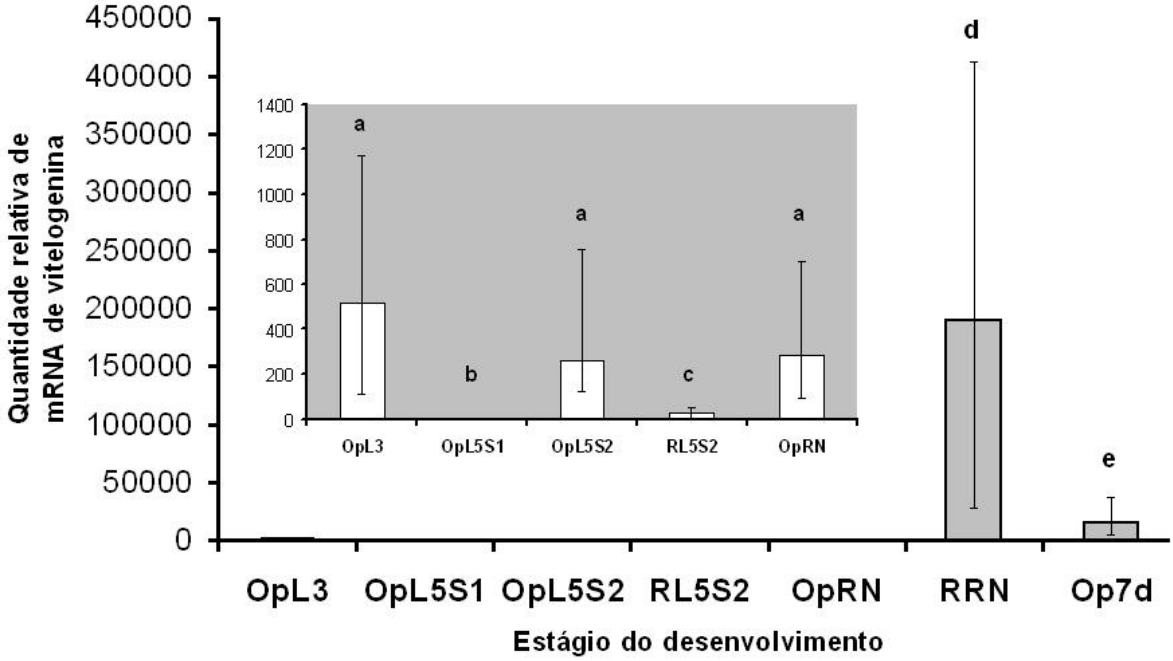

Figura 17 – Expressão relativa de mRNAs do gene codificador de vitelogenina em diferentes estágios do desenvolvimento, larval e adulto, de operárias (OpL3 – n=11, OpL5S1 – n=12, OpL5S2 – n=8, OpRN – n=7 e Op7d – n=17) e rainhas (RL5S2 – n=12 e RRN – n=10). A expressão do gene codificador de actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar a expressão do gene codificador de vitelogenina. A expressão média do gene alvo nas amostras OpL5S1 foi igualada a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Os dados de cada estágio correspondem à expressão da média dos indivíduos e as linhas representam o erro padrão. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significantes (para estatística, ver texto). Inserto: os mesmos dados visualizados em menor escala (0-1400).

4.10 – Expressão do gene codificador de vitelogenina em larvas de rainhas e operárias que se alimentaram de 0,5 μg de dsVg e seus controles

Foi verificada uma redução média de 75% nos transcritos do gene codificador de vitelogenina nas amostras de OpL3 que receberam 0,5 μg de dsVg ou de dsGFP na dieta em relação ao grupo sem tratamento (ANOVA, F=3,7675, seguido de teste Bonferroni, $p<0,05$, Figura 18A). Em OpL5S2 essa redução na média de transcritos do gene codificador de vitelogenina foi maior que 91% nos grupos tratados (0,5 μg de dsVg ou de dsGFP) quando comparada à média dos indivíduos sem tratamento (ANOVA, F=14,7114, seguido de teste Bonferroni, $p<0,05$, Figura 18B). Da mesma forma, a redução média da expressão do gene codificador de vitelogenina em RL5S2 tratadas com 0,5 μg de dsVg ou de dsGFP foi de 71 e 59%, respectivamente, ambas estatisticamente diferentes da média encontrada para amostras RL5S2 sem tratamento (ANOVA, F=3,8738, seguido de teste Bonferroni, $p<0,05$, Figura 18C).

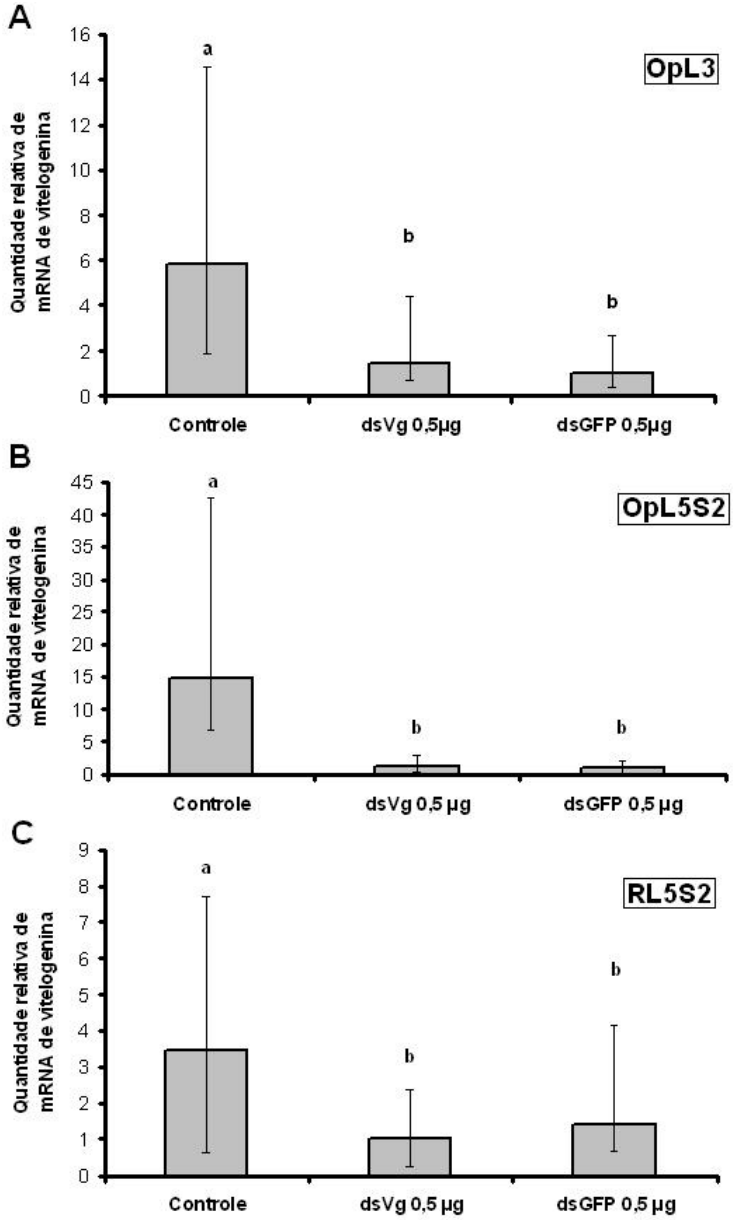

Figura 18 – Expressão relativa de mRNAs do gene codificador de vitelogenina em estágios do desenvolvimento larval de operárias e rainhas sem tratamento e tratadas com 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP. A expressão do gene codificador de actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar a expressão do gene codificador de vitelogenina. **A –** OpL3, Controle (n=11), dsVg 0,5 µg (n=5) e dsGFP 0,5 µg (n=5); a expressão média do gene alvo nas amostras dsGFP 0,5 µg foi igualada a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. **B –** OpL5S2, Controle (n=8), dsVg 0,5 µg (n=10) e dsGFP 0,5 µg (n=10); a expressão média do gene alvo nas amostras dsGFP 0,5 µg foi igualada a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. **C –** RL5S2, Controle (n=12), dsVg 0,5 µg (n=5) e dsGFP 0,5 µg (n=5); a expressão média do gene alvo nas amostras dsVg 0,5 µg foi igualada a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Os dados de cada estágio correspondem à expressão da média dos indivíduos e as linhas representam o erro padrão. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas (para dados de estatística, ver texto).

4.11 –Expressão gênica e proteica de vitelogenina em rainhas e operárias adultas que ingeriram 0,5 μg de dsVg e seus controles

A análise da transcrição do gene codificador de vitelogenina nas OpRN tratadas com 0,5 μg de dsVg não difere, em média, dos controles sem tratamento e tratados com 0,5 μg de dsGFP (ANOVA, F=0,5856, p=0,5727, Figura 19A). Em RRN, a transcrição de vitelogenina diminuiu significativamente nos indivíduos que se alimentaram de 0,5 μg de dsVg durante o estágio L2, atingindo a fase adulta com redução média de 70% na abundância de transcritos desse gene em relação a ambos os controles (ANOVA, F=5,2992, seguido de teste Bonferroni, p<0,05, Figura 19B). O mesmo foi observado nas Op7d que se alimentaram de 0,5 μg de dsVg durante o estágio L2, onde a diminuição na média da expressão de transcritos de vitelogenina girou em torno de 88% quando comparada aos controles sem tratamento e tratados com 0,5 μg de dsGFP (ANOVA, F=8,7142, seguido de teste Bonferroni, p<0,001, Figura 19C). Op7d e RRN são as fases que apresentam maior abundância de transcritos de vitelogenina (Figura 17). O mesmo ocorreu com relação à detecção da proteína vitelogenina circulante na hemolinfa. Os perfis protéicos de 1 μL de hemolinfa de Op7d mostraram que a proteína vitelogenina apresenta variação entre os indivíduos de um mesmo grupo, porém, no conjunto das amostras, os níveis de vitelogenina diminuíram no grupo tratado com 0,5 μg de dsVg (Figura 19D). Nos perfis proteicos da hemolinfa de RRN observou-se que a proteína vitelogenina era extremamente abundante em qualquer dos grupos analisados. A análise da hemolinfa de RRN, diluída cinco vezes, permitiu detectar diferenças na quantidade de vitelogenina circulante entre os grupos, onde se observou traços dessa proteína nas amostras tratadas com 0,5 μg de dsVg ou de dsGFP se comparadas aos indivíduos do controle sem tratamento (Figura 19E).

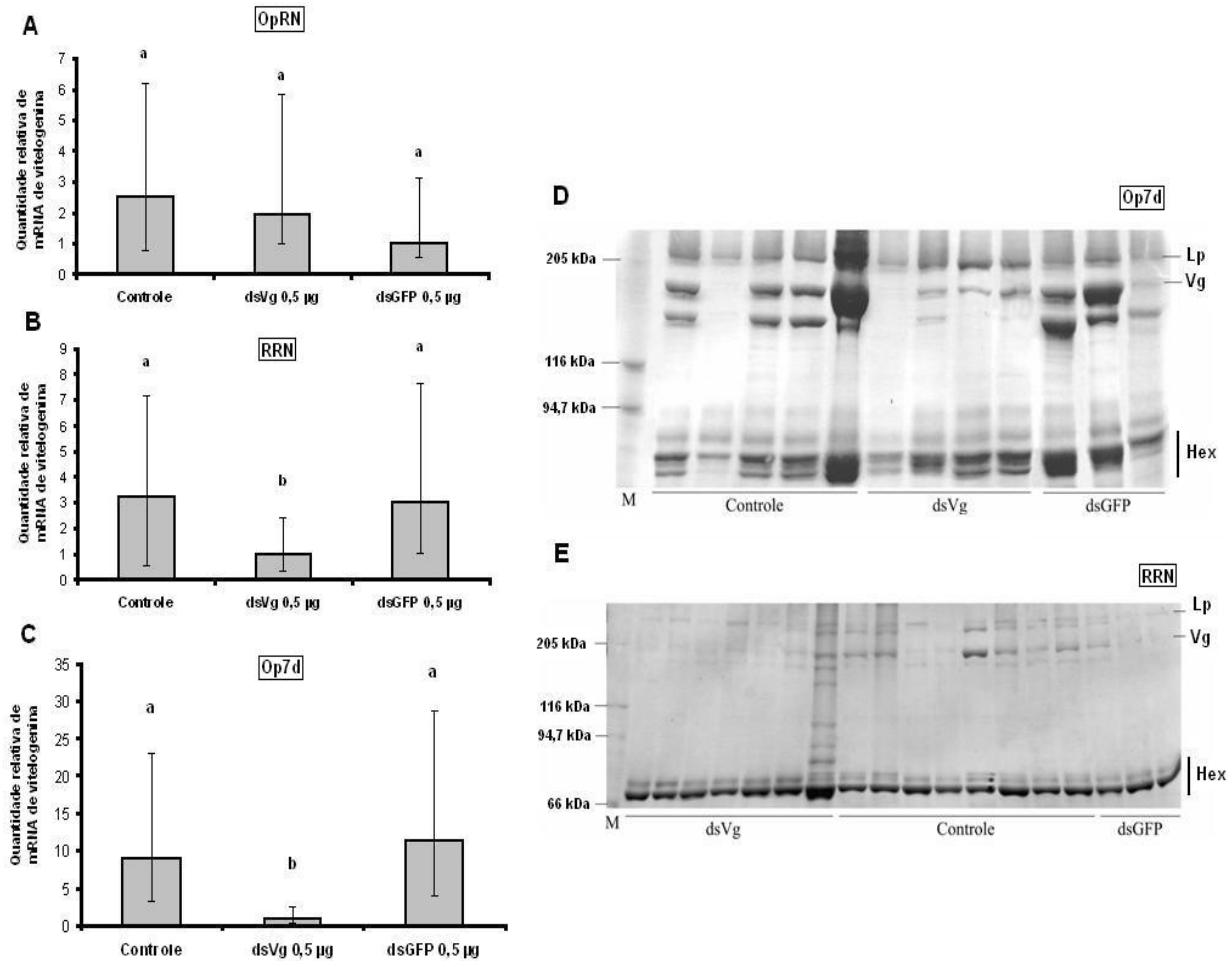

Figura 19 – Expressão gênica e proteica de vitelogenina em rainhas e operárias adultas, sem tratamento e tratadas com 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP. A expressão do gene codificador de actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar a expressão do gene codificador de vitelogenina. **A** – Expressão relativa do gene codificador de vitelogenina em OpRN, Controle (n =7), dsVg 0,5 µg (n=6) e dsGFP 0,5 µg (n=6); a expressão média do gene alvo nas amostras dsGFP 0,5 µg foi igualada a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. **B –** Expressão relativa do gene codificador de vitelogenina em RRN, Controle (n =10), dsVg 0,5 µg (n=7) e dsGFP 0,5 µg (n=3); a expressão média do gene alvo nas amostras dsVg 0,5 µg foi igualada a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. **C –** Expressão relativa do gene codificador de vitelogenina em Op7d, Controle (n =17), dsVg 0,5 µg (n=13) e dsGFP 0,5 µg (n=18); a expressão média do gene alvo nas amostras dsVg 0,5 µg foi igualada a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. **D –** Expressão da proteína vitelogenina em Op7d. **E –** Expressão da proteína vitelogenina em RRN. Os dados em **A**, **B** e **C** correspondem à expressão da média dos indivíduos e as linhas representam o erro padrão; letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas (para dados de estatística, ver texto). Em **D** e **E –** Lp: lipoforina; Vg: vitelogenina; Hex: região das hexamerinas 70a, 70b e 70c (Danty et al., 1998), servindo como parâmetro para quantidades equivalentes de extrato total de proteína circulante na hemolinfa, aplicadas em cada raia do gel.

4.12 – Perfil das proteínas da hemolinfa de rainhas e operárias que ingeriram 0,5 μg de dsVg e seus controles

O total de proteínas circulantes na hemolinfa, nos estágios OpL5S2, RL5S2, Op7d e RRN, foi quantificado pelo método de Bradford (1976). Em linhas gerais, os valores encontrados nas amostras controle variaram mais que nos tratamentos. Os tratamentos com dsRNA interferiram na abundância de proteínas circulantes na hemolinfa de larvas de ambas as castas, diminuindo a síntese em operárias (ANOVA, $F=33,199$, seguido de teste Bonferroni, $p<0,025$, Figura 20) e aumentando em rainhas (ANOVA, $F=5,9146$, seguido de teste Bonferroni, $p<0,05$, Figura 20). O efeito parece ser inverso em indivíduos adultos, onde Op7d tratadas com 0,5 μg de dsVg tiveram aumento na concentração das proteínas circulantes comparadas ao controle (ANOVA, $F=6,4103$, seguido de teste Bonferroni, $p<0,0025$, Figura 20) e, em rainhas, verificou-se uma diminuição das proteínas circulantes nos indivíduos tratados, porém não houve diferença significante (ANOVA, $F=2,6293$, $p=0,0998$, Figura 20).

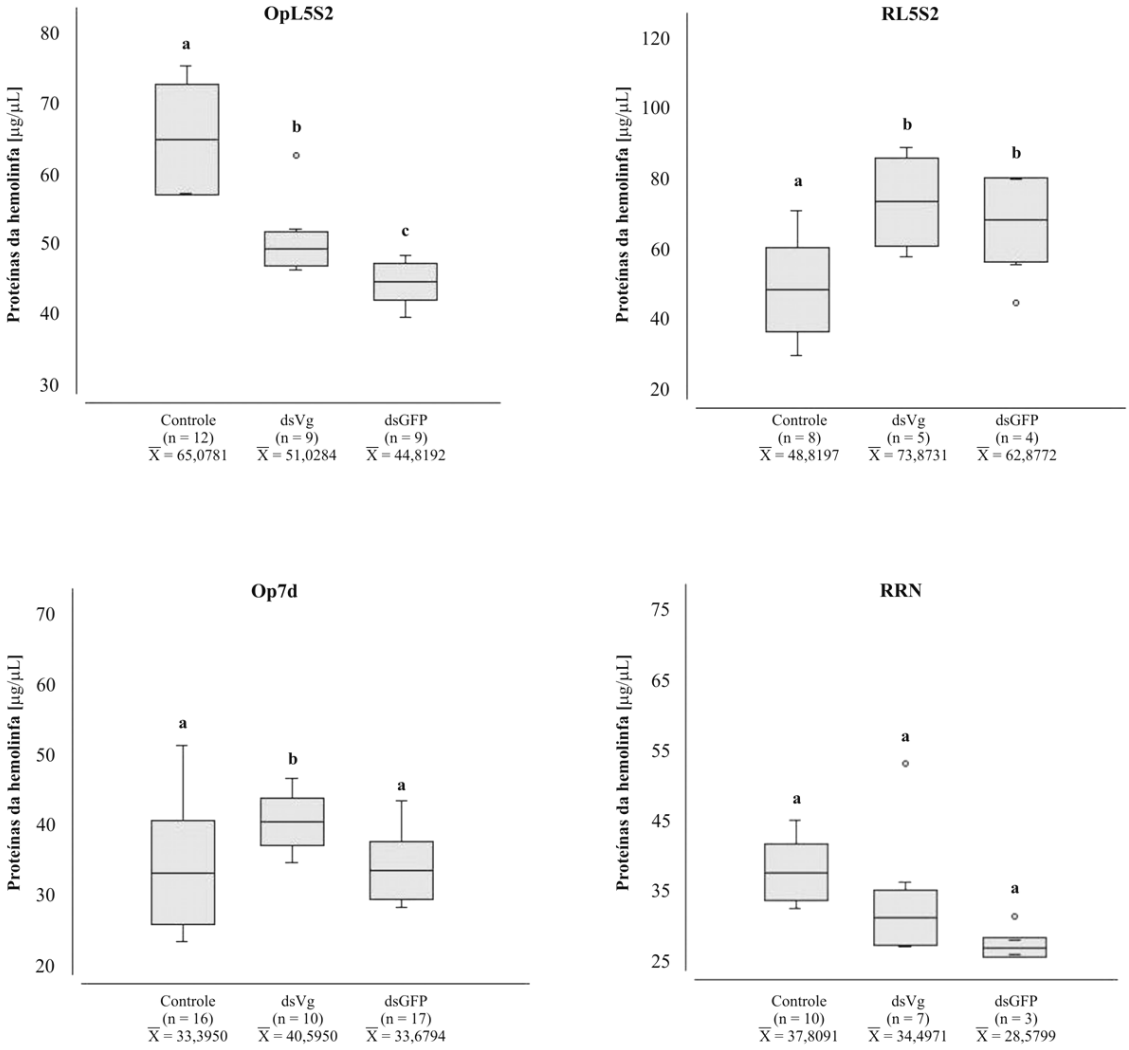

Figura 20 – Quantificação das proteínas circulantes em OpL5S2, RL5S2, Op7d e RRN sem tratamento e tratadas com 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP. Os limites superior e inferior das caixas em cinza correspondem ao desvio padrão e o traço transversal no seu interior representa a média aritmética. As linhas verticais representam os valores máximo e mínimo. Círculos fora das caixas representam amostras discrepantes (*outliers*). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significantes (para dados de estatística, ver texto).

4.13 – Peso de rainhas e operárias que ingeriram 0,5 µg de dsVg e seus controles

Indivíduos sem tratamento e tratados com 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP foram pesados nos estágios OpL5S2, RL5S2, OpRN e RRN. As operárias adultas tiveram seu peso analisado ao nascer. O tratamento com dsRNA alterou o peso das OpL5S2 (ANOVA, F=9,3428, seguido de teste Bonferroni, p<0,0025, Figura 21), não havendo diferenças significantes nas RL5S2 (ANOVA, F=0,966, p=0,5993, Figura 21), OpRN (ANOVA, F=1,074, p=0,3479, Figura 21) e RRN (ANOVA, F=0,2046, p=0,8183, Figura 21).

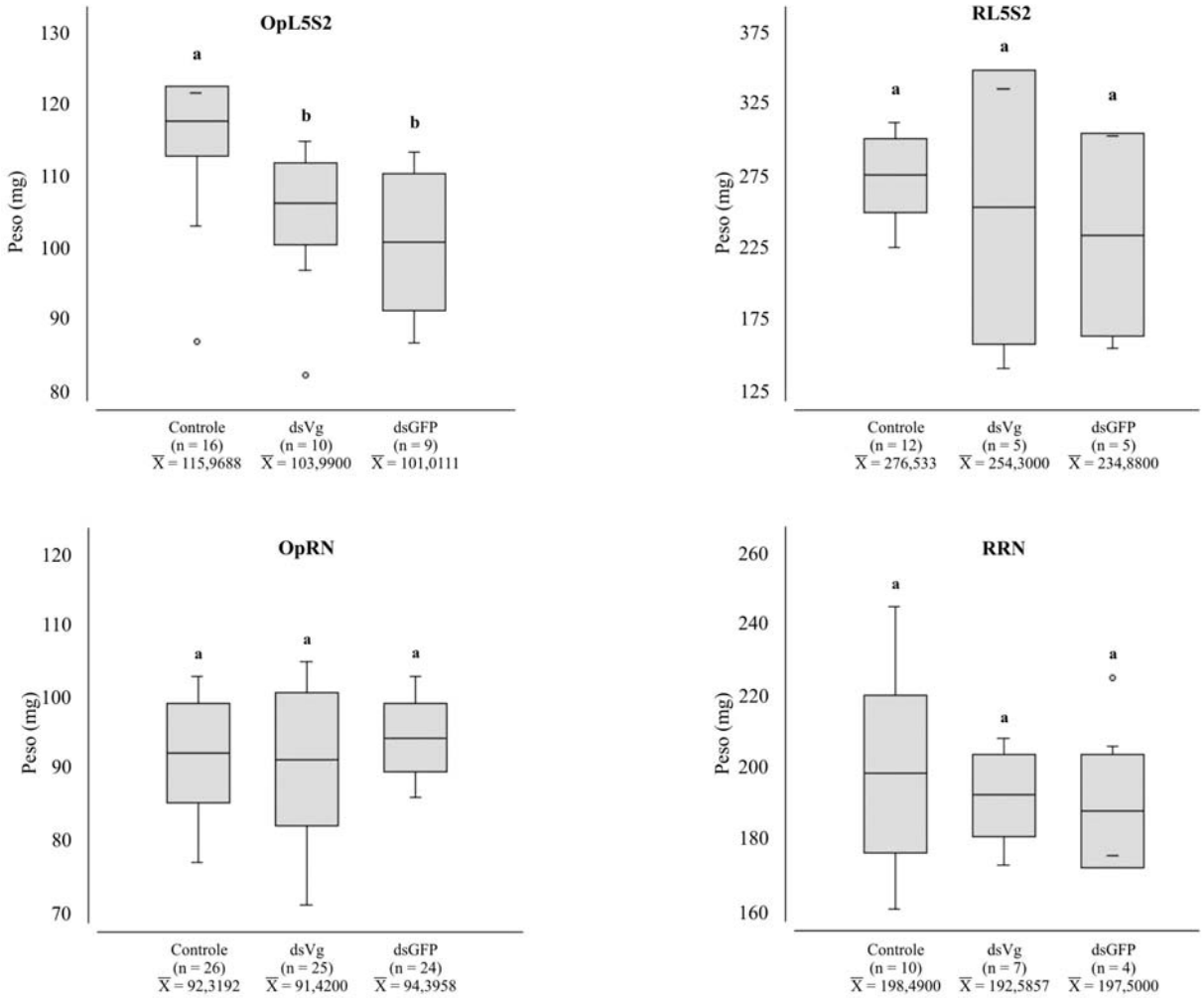

Figura 21 – Peso em OpL5S2, RL5S2, OpRN e RRN sem tratamento e tratadas com 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP. Os limites superior e inferior das caixas em cinza correspondem ao desvio padrão e o traço transversal no seu interior representa a média aritmética. As linhas verticais representam os valores máximo e mínimo. Círculos fora das caixas representam amostras discrepantes (*outliers*). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas (para dados de estatística, ver texto).

4.14 – Quantificação do hormônio juvenil em L5S2 de rainhas e operárias que ingeriram 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP

Os títulos de hormônio juvenil circulantes na hemolinfa de juvenil de RL5S2 e OpL5S2 sem tratamento e que ingeriram 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP foram quantificados (em pg/µL). A quantificação para OpL5S2 sem tratamento apresentou valores questionáveis (Tabela VI) quando comparados aos dados de Rachinsky *et al.* (1990, mensurados em pmol/mL) e, portanto, foram desconsiderados. Em rainhas, o título de hormônio juvenil, nesta fase, é aproximadamente 7 vezes maior do que o de operárias (Rachinsky *et al.*, 1990). Os níveis de hormônio mantiveram-se equivalentes em RL5S2 sem tratamento e tratadas com dsVg. Por outro lado, aumentaram em OpL5S2 tratadas com 0,5 µg de dsVg, atingindo níveis comparáveis aos de rainhas sem tratamento. O efeito de dsGFP sobre o título de hormônio juvenil foi inverso, diminuindo sua concentração em RL5S2 e aumentando em OpL5S2, valores estes semelhantes. Os dados encontram-se organizados na Tabela VI.

Tabela VI – Títulos de hormônio juvenil circulante na hemolinfa (± desvio padrão) de RL5S2 e OpL5S2 sem tratamento e que ingeriram 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP, comparado aos dados da literatura.

	RL5S2	OpL5S2
Rachinsky *et al.* (1990)	114,8 ± 21,0 pmol/mL	16,8 ± 2,8 pmol/mL
Sem tratamento	131,6 ± 22,7 pg/µL (n=4)	130,1 pg/µL (n=2)
dsVg 0,5 µg	130,4 ± 38,4 pg/µL (n=4)	101,7 ± 2,4 pg/µL (n=4)
dsGFP 0,5 µg	89,7 pg/µL (n=2)	84,4 ± 18,1 pg/µL (n=4)

4.15 – Morfologia dos apêndices de Op7d que ingeriram 0,5 µg de dsVg na fase larval e seus controles

A asa mesotorácica e o último par de pernas, ambas do lado direito, de Op7d sem tratamento e tratadas com 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP foram comparadas com as mesmas estruturas de RRN. Os tratamentos não induziram mudanças nas estruturas analisadas, onde asas e pernas de operárias sem tratamento e tratadas permaneceram com características típicas dessa casta (Figura 22).

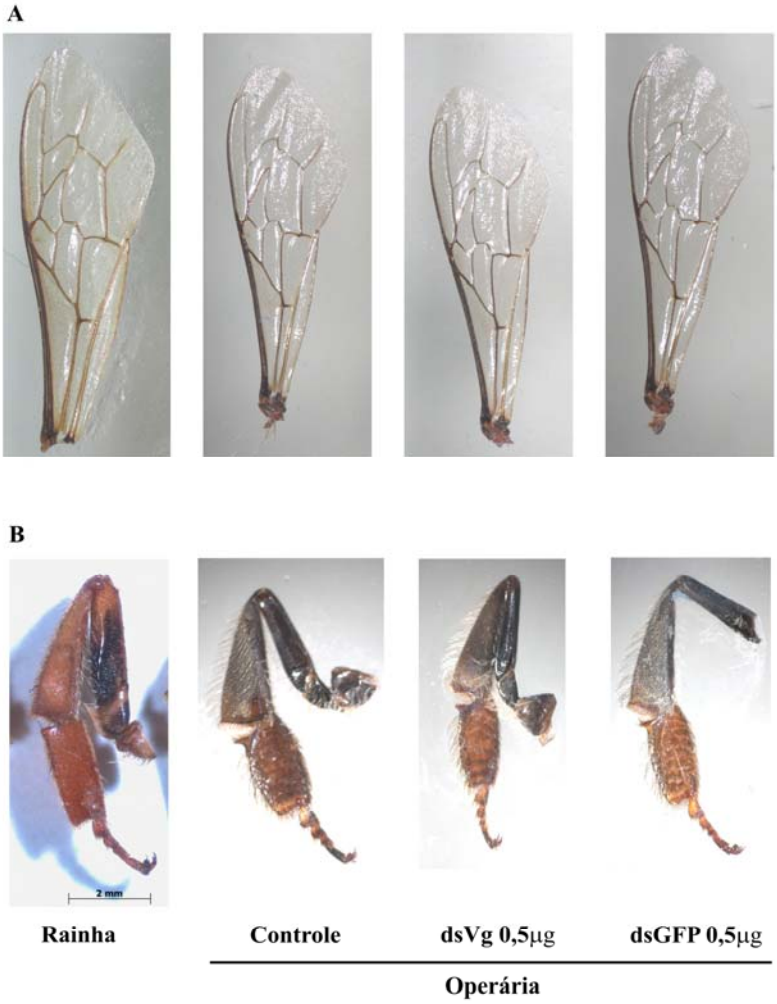

Figura 22 – Comparação da morfologia da asa mesotorácica **(A)** e do último par de pernas **(B)** entre RRN (controle, n=10) e Op7d sem tratamento (n=16) e tratadas com 0,5 µg de dsVg (n=13) ou de dsGFP (n=17).

4.16 – Morfologia dos ovários de OpRN que ingeriram 0,5 µg de dsVg na fase larval e seus controles

Ovários de OpRN sem tratamento (n=7) e tratadas com 0,5 µg de dsVg (n=7) ou de dsGFP (n=7) foram comparadas com os de RRN (n=7). Como pode ser observado na Figura 23, o padrão esperado para o desenvolvimento ovariano em ambas as castas não é alterado pelos tratamentos.

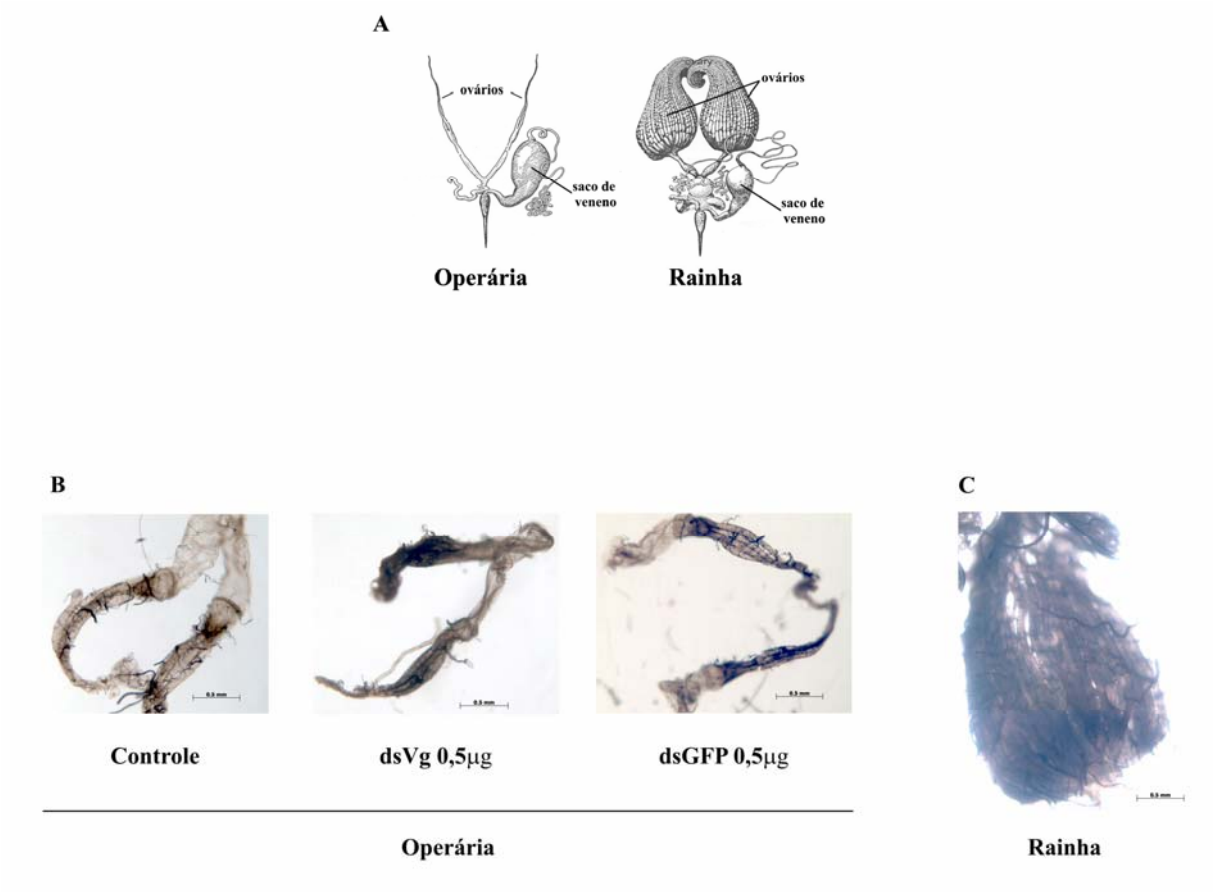

Figura 23 – Ovários. **A** – Representação da morfologia de ovários de OpRN e RRN. **B** – Ovários de OpRN sem tratamento (Controle) e de OpRN tratadas com 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP. **C** – Ovário de RRN.

5 – DISCUSSÃO

Em *A. mellifera*, questões relativas ao comportamento social, haplodiploidia, determinação de castas, longevidade, aprendizagem e memória, despertam o interesse científico há anos. A complexidade e particularidades desses atributos nessas abelhas, se comparadas a outros insetos e organismos, sugerem múltiplos níveis de seleção natural (Gadau et al., 2000; Page e Erber, 2002), que incluem, naturalmente, seus genes.

Muitos dos genes isolados em *A. mellifera* apresentam ortólogos em outros organismos que, embora conservados em seqüências de nucleotídeos, nem sempre exercem funções previamente descritas (Beye et al., 2002). O gene codificador de vitelogenina é um exemplo em que a seleção atuou para o ganho de funções, em abelhas. Diferente do que ocorre em outros invertebrados estudados, esse gene adquiriu funções não-vitelogênicas em *A. mellifera* (Trenczek e Engels, 1986; Trenczek *et al*., 1989; Chen *et al*., 1997; Sappington e Raikhel, 1998; Falchuk, 1998; Amdam e Omholt, 2002; Amdam e Omholt, 2003a; Amdam et al., 2003b; Amdam et al., 2003c; Piulachs et al., 2003; Amdam et al., 2004a; Amdam et al., 2004b; Guidugli et al., 2005a; Brandt et al., 2005; Amdam et al., 2005; Seehuus et al., 2006; Amdam et al., 2006a; Amdam et al., 2006b; Nelson et al., 2007, Corona et al., 2007).

Em função de suas características reprodutivas, as abelhas sociais não constituem um organismo modelo para manipulação genética, dificultando a definição de funções para seus genes. Experimentos com silenciamento, via injeção de dsRNA em embriões pré-blastodérmicos ou em adultos, têm sido, por isto, amplamente utilizados. Por meio dessa ferramenta foi possível identificar outras funções para vitelogenina, em operárias de *A. mellifera*, diferentes daquelas tradicionalmente descritas.

No presente trabalho, investimos na compreensão dos efeitos do silenciamento pós-transcricional, mediado por dsRNA específico do gene codificador de vitelogenina, durante o desenvolvimento pós-embrionário de rainhas e operárias de *A. mellifera*.

Diversos autores atribuem ao estresse provocado pela manipulação, confinamento ou a outros fatores exógenos, as modificações observadas na expressão gênica, nos títulos hormonais, no comportamento e até mesmo na longevidade de *A. mellifera* (Harris e Woodring, 1992; Bitondi et al., 1994; Bitondi e Simões, 1996; Pinto et al., 2002; Pankiw e Page, 2003; Sullivan et al., 2000; Sullivan et al., 2003; Lin et al., 2004; Aronstein e Saldivar, 2005; Aronstein et al., 2006; Seehuus et al., 2006; Barron et al., 2007; Maleszka et al., 2007). Observações semelhantes foram descritas para *Rhodnius prolixus* (Araujo et al., 2006), *Haemonchus contortus* (Geldhof et al., 2006), *Aedes aegypti* (Isoe et al., 2007) e *Dermacentor variabilis* (Mitchell III et al., 2007).

Em *A. mellifera*, experimentos de silenciamento por meio da ingestão de dsRNA oferecido na dieta de L2, mantidas em laboratório, foram bem sucedidos (Aronstein et al., 2006; Patel et al., 2007). Ainda que esses autores tenham otimizado as condições de temperatura e umidade, tenham oferecido dieta qualitativa e quantitativamente controlada, isso apenas mimetizou o que ocorre na colônia e, assim, os efeitos colaterais não podem ser mensurados adequadamente. Por essa razão, na tentativa de minimizar os efeitos indesejados, desenvolvemos um método não-invasivo, com a preocupação de manter as condições naturais para o desenvolvimento, ou seja, as larvas foram tratadas e mantidas na própria colônia.

Optamos pelo tratamento das larvas com 0,5 μg de dsRNA, o que, ainda, pode representar uma *overdose* para as dimensões de L2 se compararmos o seu tamanho ao das operárias adultas, que tiveram os níveis de vitelogenina diminuídos quando receberam, via injeção intra-abdominal, 10 vezes (Amdam et al., 2003b; Guidugli et al., 2005) ou 20 vezes (Amdam et al., 2006a; Nelson et al., 2007; Amdam et al., 2007) essa dose. Aronstein et al.

(2006) ofereceram 1,3 µg de dsRNA do gene *Toll-related receptor* (Am18w) na dieta de L2 de *A. mellifera*, diminuindo em 3,3 vezes a expressão desse gene nos indivíduos tratados. Com 0,5 µg de dsVg, obtivemos redução de 4 vezes na abundância de mRNA de vitelogenina, nas larvas de operárias avaliadas em L3, que foram tratadas em L2.

A aceitação das larvas, cujo alimento continha dsRNA, foi avaliada 24h após o tratamento, para cálculo da taxa de remoção. Esse foi um bom parâmetro para constatar a percepção imediata das operárias à presença deste material exógeno. A remoção da cria é maior quando as doses de 3,0 e 5,0 µg de dsRNA são administradas. Nesse caso, os indivíduos não atingem a fase de operculação, que corresponde à fase de tecelagem do casulo. Abelhas melíferas detectam, com eficiência, crias mortas, doentes, danificadas ou parasitadas, principalmente, por sensilas olfatórias localizadas nas antenas (Rothenbuhler, 1964; Free e Winder, 1983; Visscher, 1983; Gramacho e Spivak, 2003; Goode et al., 2006). Patel et al. (2007) discutem que, independente do tratamento, há massiva rejeição de larvas tratadas até o terceiro estágio. Não foi nosso objetivo averiguar se tal remoção é causada por intoxicação e/ou morte de larvas tratadas ou, simplesmente, um sinal da vigilância das operárias às mínimas perturbações, o que funcionaria como um "controle interno de qualidade da colônia" para manutenção do vigor e da ordem.

A distância entre as células de cria que recebem o tratamento com 0,5 µg de dsRNA foi decisivo para obtenção de um número satisfatório de amostras, o que não vinha ocorrendo quando outras doses de dsVg ou de dsGFP (3,0 ou 5,0 µg) foram oferecidas na dieta das larvas, dada a remoção pelas operárias. Entre 77-84% das larvas permanecem no favo 24 h após o tratamento com doses de 0,5 µg de dsRNA. Por mais que o tratamento com 0,5 µg de dsRNA provoque alterações nas larvas de operárias, essas foram, em sua maioria, imperceptíveis.

Diante dos índices de operculação, de 60% das larvas tratadas com 0,5 µg de dsRNA e de até 85% nos controles (sem tratamento e tratados apenas com água), concluímos que a dose adotada nesse trabalho (0,5 µg de dsRNA) não é, por si só, responsável pela perda de indivíduos. A não-operculação das células de cria pode indicar questões de controle demográfico, restrição de recursos alimentares ou fatores desconhecidos pelo experimentador. Concluímos que o tratamento não-invasivo sob condições naturais é viável.

Tentativas anteriores, em nosso laboratório, de silenciamento pós-transcricional do gene codificador de vitelogenina, administrando-se injeções de 5 a 20 µg de dsVg, em rainhas adultas, não obtiveram êxito. Nesse trabalho, observamos alta mortalidade das larvas que ingeriram 5,0 µg de dsVg ou de dsGFP e foram mantidas em realeiras artificiais dentro da colônia. Estas larvas não atingem a fase adulta.

Em um segundo protocolo experimental, *in vitro*, para produção de rainhas, oferecemos doses menores (0,5 ou 3,0 µg) de dsRNA. Observando-se a curva de mortalidade verificamos que larvas tratadas e controles sem tratamento não responderam positivamente às condições testadas, desenvolvendo-se, no máximo, por seis dias após o ensaio. Concluímos que as condições de temperatura, umidade e/ou alimentação (geléia real) testadas em laboratório não foram adequadas para o desenvolvimento de rainhas até a metamorfose. A dificuldade na produção de rainhas *in vitro* pode ser explicada por propriedades físico-químicas da geléia real. Devido ao seu alto conteúdo de proteínas e lipídios, a geléia real torna-se rapidamente viscosa quando estocada, dificultando a alimentação das larvas por um longo período de tempo (Sasaki et al., 1987). Em condições naturais, as operárias nutridoras visitam as realeiras com freqüência para reposição de geléia real (Beetsma, 1985). Outros autores ofereceram geléia real diluída para produção de rainhas *in vitro* (Patel et al., 2007). No entanto, temos em mente que esse procedimento pode resultar inter-castas, tornando os resultados mais difíceis de serem analisados.

Nossos resultados indicaram que as doses de 0,5 μg de dsVg ou de dsGFP não aumentam a mortalidade das larvas de rainhas, comparativamente àquelas que não receberam tratamento. No entanto, a dose de 3,0 μg de dsVg ou de dsGFP influenciou no tempo de sobrevivência das mesmas.

Tanto em indivíduos sem tratamento quanto nos tratados, observamos mortalidade acentuada no segundo e terceiro dias após o ensaio, que corresponde ao intervalo de tempo entre os estágios L4 (larva de quarto estágio) e L5F1 (larva de quinto estágio, em fase inicial de alimentação). Diversos autores observam diferenças marcantes nos títulos de hormônio juvenil entre rainhas e operárias, neste período, que corresponde à janela fisiológica temporal em que larvas de operárias desenvolvem características de rainha em resposta à aplicação tópica de hormônio juvenil (Wirtz e Beetsma, 1972; Wirtz, 1973; Rembold et al., 1974; Asencot e Lensky, 1976; Copijn et al., 1979; Dietz et al., 1979; Rachinsky e Engels, 1995).

Nossos experimentos confirmam que L4 é um período crítico da diferenciação de castas e que, sob condições não-ideais, a programação genética para o desenvolvimento de rainhas é alterada, comprometendo a sobrevivência das larvas, principalmente, quando se administra substâncias exógenas em altas doses. Recentemente, Barchuk et al. (2007) observaram que L4 é o estágio larval em que se encontra o maior número de genes diferencialmente expressos em rainhas e operárias. Estes autores encontraram 62 genes super-expressos em L4 de operárias contra 105 genes super-expressos em L4 de rainhas, esses últimos com funções moleculares associadas à localização celular, à proteínas que se complexam a outras proteínas e a ácidos nucléicos, à fatores de transcrição, à hidrolases e à oxidoredutases. Acreditamos que, sob condições não-adequadas ou não-naturais, haja o comprometimento de processos biológicos relacionados a estas funções, com importantes implicações, senão vitais, sobre o desenvolvimento normal das rainhas.

Neste trabalho as rainhas foram produzidas em realeiras artificiais e mantidas nas colônias, quando foram oferecidos 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP, considerando que esta dose não diminuiu o tempo de sobrevivência de larvas de rainhas mantidas em estufa. Mesmo alguns indivíduos sem tratamento não completaram o desenvolvimento, sendo removidos pelas operárias antes mesmo da operculação das realeiras. Essas condições se agravam nos indivíduos tratados com 0,5 µg de dsRNA, quando o índice de operculação não ultrapassou 30%. Não sabemos quanto dessa remoção é conseqüência de intoxicação e/ou morte de larvas tratadas ou se, simplesmente, deve-se a um "controle interno de qualidade da colônia". Devem, também, ser considerados: o número de rainhas que uma colônia aceita produzir, as condições climáticas e demográficas, a oferta de alimento e o efeito do experimentador. Visscher (1983) estimou que até 2% das operárias de uma colônia desempenham comportamento necrofórico, postulando que o reconhecimento da cria "anormal" se daria por sinais químicos. É possível que perturbações fisiológicas sejam causadas por substâncias exógenas, refletindo num aumento da síntese protéica em RL5S2 (conforme item 4.12) e que funcionaria como sinal percebido pelas operárias. Ou ainda, diferentemente do que costumamos notar para operárias, as rainhas em desenvolvimento não apresentam plasticidade suficiente para se adaptarem à condições de manipulação *in vitro* e administração de substências exógenas.

Para RL5S2, indivíduos sem tratamento e tratados com 0,5 µg de dsVg ou de dsGFP não apresentaram diferenças significantes no peso médio entre os grupos, que se encontram dentro da faixa de peso esperada para fase de tecelagem de casulo (77,8-379,4 mg) descrita por Nunes-Silva et al. (2006). Concluímos que, em rainhas, o tratamento com 0,5 µg de dsRNA não causou atraso no desenvolvimento.

Juntos, os dados sugerem que os transcritos para o gene codificador de vitelogenina, quando apenas parcialmente deprimidos pelo tratamento em RL5S2 (conforme item 4.11),

permitiriam o desenvolvimento até a fase adulta, enquanto que, um provável silenciamento desse gene, próximo a 100%, inviabilizaria a metamorfose (como discutido anteriormente), o que indica um papel vital da vitelogenina no desenvolvimento de rainhas.

No que diz respeito às discrepâncias observadas no desenvolvimento de operárias, essas devem ser consideradas em dois momentos, antes e depois da metamorfose.

Como esperado as larvas de OpL5S1, sem tratamento, apresentaram células de cria operculadas, enquanto aquelas que receberam tratamento apresentavam tamanho corporal menor e células de cria não-operculadas. Porém, em todas as coletas realizadas 209 h após a postura (no estágio de interesse, OpL5S2), as células de cria de larvas sem tratamento e tratadas encontravam-se operculadas. O peso de OpL5S2 tratadas é estatisticamente menor do que o das sem tratamento (conforme item 4.13). Aparentemente, é possível sugerir que o tratamento possa atrasar o desenvolvimento das larvas. Ainda, em OpL5S2, o silenciamento do gene codificador de vitelogenina foi eficiente, em que larvas tratadas com 0,5 µg de dsVg apresentaram expressão de transcritos de vitelogenina comparáveis à fase OpL5S1 (conforme Figura 17) que, por sua vez, apresentou os menores níveis de expressão desse gene nas amostras analisadas no presente trabalho.

Esse achado nos ajuda a compreender o atraso na operculação das células de cria, nas larvas de operárias tratadas. Feromônios encontrados na cutícula das larvas (*brood pheromone*) são ésteres de ácidos graxos capazes de controlar tarefas das operárias como alimentação e operculação das células de cria (Le Conte et al., 1990; 1994; 1995). Provavelmente, larvas com atraso no desenvolvimento, causado pela administração de dsRNA, somente liberam sinais químicos para operculação horas mais tarde.

Cristino et al. (2006) identificaram um maior número de elementos *cis*-regulatórios compartilhados na região promotora dos genes diferencialmente expressos em larvas de operárias do que dos genes diferencialmente expressos em rainhas. Barchuk et al. (2007)

construíram redes de expressão gênica a partir de genes diferencialmente expressos em diferentes estágios larvais de rainhas *versus* de operárias, as quais foram mais densas e interconectadas em operárias. É sensato pensar que, o tratamento com doses de dsRNA tanto de um gene exógeno (como é o GFP) quanto de genes codificadores proteínas importantes (como a vitelogenina) representam, naturalmente, um "corpo estranho" para larvas, que provocam respostas mais pronunciadas em operárias, dada a complexidade de suas redes regulatórias, e podem afetar genes que desencadeiam alterações, sobretudo morfológicas. Ainda neste contexto, sugerimos que redes regulatórias mais amplas favoreçam a adaptação das operárias aos efeitos colaterais do tratamento. Já para rainhas, a adaptação aos efeitos colaterais parece limitada e, considerando-se que suas redes gênicas são simplificadas, a alteração de um ou poucos genes pode comprometer o desenvolvimento e sobrevivência.

Particularidades à parte, as variações em tamanho e peso nas amostras de larvas, analisadas individualmente, em ambas as castas, sugerem que a via de insulina, a principal responsável na regulação do crescimento em resposta ao *status* nutricional (Oldham e Hafen, 2003; Colombani et al., 2003) foi afetada e aventar, assim, a hipótese de que outros genes que participam dessa via também tenham sido alterados e, finalmente, o próprio hormônio juvenil.

Com o silenciamento de transcritos de vitelogenina houve um aumento dos títulos de hormônio juvenil em OpL5S2 tratadas com 0,5 μg de dsVg. Esse resultado corrobora nossa hipótese de que o gene codificador de vitelogenina esteja, de maneira ainda desconhecida, associado aos eventos de determinação e/ou diferenciação das castas, uma vez que, seu silenciamento parcial já provoque um aumento dos títulos hormonais que atinge níveis próximos aos observados em larvas de rainhas. Essa evidência nos leva a crer que o cenário "duplo repressor", que propõem um *feedback* regulatório entre os títulos de vitelogenina e de hormônio juvenil na fase adulta de operárias (Amdam e Omholt, 2003a), também é observado na fase larval desta casta.

Na data esperada para emergência de operárias adultas, foram encontradas pupas nas fases de Pbl a Pbd, tanto no grupo sem tratamento quanto nos tratados, nas mesmas proporções, o que excedeu a variação de 6 h decorrntes das posturas controladas. Para rainhas, foram encontradas, na data de emergência de adultos, apenas pupas Pbd, fato este, dentro da margem de variação de 6 h.

Diferenças na maturidade das operárias, também ocorridas no grupo sem tratamento, não resultaram do tratamento com dsRNA, mas da variação temporal de 6 h da postura controlada somada a diversidade genética intra-populacional. Uma vez que as larvas atravessam a barreira da metamorfose, certamente já se adaptaram ou eliminaram os distúrbios fisiológicos provocados pelo tratamento e seguem o desenvolvimento a bom termo.

Tem sido considerado que a seleção natural que opera sobre os insetos sociais favorece a variabilidade genotípica dos descendentes, por exemplo, aumentando a taxa de recombinação intra-cromossômica (para revisão, Wilfert et al., 2007). Em *A. mellifera* a taxa de recombinação é de 19 cM/Mb (centimorgans por megabase), com média de 5,7 eventos de recombinação por par de cromossomos, por meiose, sendo essa freqüência a mais alta até então descrita em genomas de animais (Beye et al., 2006). Somada à recombinação meiótica, a poliandria das rainhas gera altos níveis de diversidade genotípica nos descendentes, fazendo surgir subfamílias de operárias dentro da colônia, chamadas patrilíneas, gerando uma excepcional variabilidade intra-colônia, que resulta em variações fenotípicas, como as relacionadas à venação das asas, pigmentação, metabolismo de vôo, cuidado com a cria, extensão do ferrão e da probóscide, resistência aos parasitas e patógenos, coleta preferencial de néctar ou pólen ou água, entre outras características morfológicas e comportamentais relatadas na literatura (Kryger et al., 2000; Tarpy, 2003; Radloff et al., 2003; Palmer e Oldroyd, 2003; Lenoir et al., 2006; Chapman et al., 2007; Oldroyd e Thompson, 2007). Dessa forma, operárias de uma mesma colônia são genotipicamente divergentes e podem responder,

individualmente, às variações do ambiente. A introdução de rainhas de linhagem européia por apicultores no Estado de São Paulo ainda ocorrem (Soares, comunicação pessoal). Não se pode descartar a possibilidade de que alelos dessas linhagens, as quais possuem desenvolvimento mais longo, estejam presentes na população do apiário estudado. Variações no tempo de eclosão das larvas também podem ocorrer (Harbo et al., 1981; Collins, 2004).

O uso do controle exógeno dsGFP representa uma simulação dos distúrbios ocasionados pela manipulação e tratamento com dsRNA. Este controle já foi usado em alguns trabalhos que envolvem silenciamento do gene codificador de vitelogenina em *A. mellifera* (Amdam et al., 2006a; Nelson et al., 2007; Patel et al., 2007; Amdam et al., 2007). Sabe-se que abelhas respondem ao estresse com mudanças, por exemplo, no sistema endócrino e comportamento. Uma simples injeção pode ser responsável por tais mudanças.

Uma vez que a interferência (RNAi) é mediada por reconhecimento de seqüência, fragmentos gerados pela degradação dos transcritos do gene alvo poderiam acessar outros alvos, que possuem similaridade de seqüência, conhecido por efeito *off target* (Elbashir et al., 2001; Jackson et al., 2003; Scacheri et al., 2004; Qiu et al., 2005). A seqüência de gene codificador de GFP não é encontrada no genoma de abelhas e, assim, desconsideramos a possibilidade do dsGFP causar silenciamento inespecífico, sobretudo ao gene codificador de vitelogenina.

Segundo Rual et al. (2007), o tamanho mínimo de similaridade entre o dsRNA com alvos específicos e/ou inespecíficos, capaz de desencadear silenciamento efetivo, varia de 30 a 50 nucleotídeos. Assim, quando observamos diminuição da expressão do gene que codifica a vitelogenina, sobretudo em larvas de rainhas e operárias, concluímos que o dsGFP exerce efeito inibitório, pré-transcricional, e não silenciamento pós-transcricional desse gene ou, ainda, que possa estar sendo interpretado pelas abelhas como uma infecção viral que ativa a maquinaria de silenciamento, como ocorre em *Drosophila* (Zambon et al., 2006). Efeitos de

dsGFP foram notados no peso de OpL5S2 e, também, nos títulos de hormônio juvenil, na concentração de proteínas totais e na abundância de transcritos de vitelogenina na fase larval de rainhas (RL5S2) e operárias (OpL3, OpL5S2) tratadas com 0,5 μg dessa molécula.

Procedemos análises adicionais que mostraram que o mRNA do gene codificador de vitelogenina se alinham entre 20-25 nt apenas com quatro genes preditos nessa abelha (números de acesso: GB19690, GB17139, GB18079, GB14196), todos sem ortólogos bem-definidos. Outros alinhamentos, naturalmente, ocorrem, mas são menores que 20 nt. Isso indica que dificilmente o silenciamento via dsVg apresentaria efeito *off target*.

O tratamento com moléculas de dsVg, oferecido na dieta natural de L2, deprime a expressão do gene codificador de vitelogenina durante o desenvolvimento larval e nas formas adultas estudadas, de rainhas e operárias. Isso mostra que essas moléculas efetivamente atravessam o epitélio intestinal, circulam na hemolinfa e atingem os diversos tecidos, especialmente, o corpo gorduroso, onde a vitelogenina é sintetizada. Em insetos hematófagos, moléculas grandes como a imunoglobulina G, oriunda do sangue dos hospedeiros, atravessam o epitélio intestinal, sem causar danos (Schlein et al., 1976; Ackerman et al., 1981; Hatfield, 1988; Ramasamy et al., 1988; Lackie e Gavin, 1989; Ben-Yakir, 1989; Tracey-Patte et al., 1987; Allingham et al., 1992). Em *A. mellifera*, foi relatado que a octopamina (^{3}H-OA) ingerida por operárias recém-nascidas também atravessa a barreira intestinal (Dombroski et al., 2003), cai na hemolinfa e é incorporada no cérebro (Barron et al., 2007).

Notamos que Op7d tratadas com dsGFP são defensivas e resistentes à anestesia em gelo, enquanto os controles e tratados com dsVg foram mais facilmente manipuladas para extração de hemolinfa. Op7d tratadas com dsVg liberaram menos hemolinfa nas incisões abdominais do que os demais grupos (sem tratamento e dsGFP). São dados adicionais, apenas de observação que, no entanto, podem ser considerados para o planejamento de outros trabalhos.

É preciso salientar que os efeitos do método RNAi variam entre os experimentos e indivíduos, que vão do silenciamento completo do gene alvo até nenhum efeito (Geldhof et al., 2006; presente trabalho). Para minimizar os efeitos inconsistentes são requeridas altas doses de dsRNA que podem, no entanto, promover efeitos *off target* (Boisson et al., 2006). Com relação à eficiência de silenciamento, alguns autores consideram que a ingestão é menos efetiva que a injeção de dsRNA (Hunter, 1999; Araujo et al., 2006). No caso da indução do silenciamento por ingestão, a desvantagem reside no fato de que cada abelha pode consumir quantidades diferentes de dsRNA, sendo a resposta menos ou mais acentuada entre os indivíduos (Barron et al., 2007; presente trabalho). Por mais que essas moléculas sejam capazes de atravessar o intestino, não se pode garantir que todas o fazem. As vantagens do silenciamento via ingestão de dsRNA residem em evitar a manipulação e o estresse (Aronstein et al., 2006; presente trabalho), na facilidade do tratamento de um maior número de amostras em menor tempo (Barron et al., 2007; presente trabalho) e no uso de quantidades menores de dsRNA para indução do silenciamento (Pal et al., 2004; presente trabalho).

O dsVg silenciou parcialmente o gene de vitelogenina em todos os casos estudados, exceto em OpRN. Nessa fase, a expressão do gene codificador de vitelogenina é baixa, comparando-se à RRN e Op7d. Uma vez que a maquinaria de transcrição para esse gene é basal em OpRN, o sistema de silenciamento permaneceu "em silêncio". Uma vez que há abundância de transcrição de vitelogenina, como observado em RRN e Op7d, o sistema de silenciamento torna-se novamente competente, degradando os transcritos desse gene.

Para RL5S2, observamos que o tratamento com dsVg 0,5 μg reduz a expressão média de vitelogenina em 70% comparando-se aos controles. No entanto, ao sacrificar as rainhas nessas fases (para análise), fica a pergunta por quanto tempo sobreviveriam dada mortalidade observada na transição larva-pupa e alta remoção (dada a não-operculação das realeiras). O número amostras de rainhas tratadas que atingiram a fase adulta é pequeno, comparando-se às

operárias. A redução de mRNA de vitelogenina nessas poucas amostras de RRN é significativa, e esse trabalho representa a primeira iniciativa, com sucesso, do silenciamento desse gene nessa casta. Mesmo significativa, observamos que a redução na vitelogenina na fase adulta de rainhas não inviabilizou o desenvolvimento de ovários (dados não-apresentados). Patel et al. (2007) mostraram que o silenciamento do gene da via insulínica AmTOR (*A. mellifera Target of Rapamycin*), em larvas de rainhas, induz o desenvolvimento de corbículas, estruturas típicas de operárias para coleta de pólen.

De acordo com os procedimentos experimentais adotados nesse trabalho para análise qualitativa do perfil total de proteínas circulantes na hemolinfa, Op7d e RRN foram as únicas fases em que se observou, com clareza, a presença da vitelogenina nos géis de poliacrilamida. A variabilidade da expressão de proteínas de vitelogenina nas amostras controle era esperada (veja, Bitondi et al., 1994; Bitondi e Simões, 1996; Amdam et al., 2003b). Concluímos que a maquinaria de tradução em RRN é altamente eficiente, uma vez que, mesmo com redução significante de transcritos, a abundância de sua proteína (que sob condições normais pode chegar a 70% do total de proteínas da hemolinfa segundo Engels, 1972, 1974) nos indivíduos tratados não difere dos controles, justificando a importância da vitelogenina para a ovogênese.

Com relação à quantificação total de proteínas, larvas de rainhas e operárias responderam inversamente ao tratamento. Enquanto OpL5S2 tratadas têm generalizada diminuição de síntese protéica, RL5S2 apresentaram aumento. Essas respostas diferenciais ao tratamento podem ser explicadas pela regulação de genes e complexidade de redes regulatórias casta-específicas (Cristino et al., 2006; Barchuk et al., 2007).

A concentração total de proteína em OpL5S2 tratadas é equivalente à de RL5S2 sem tratamento. Curiosamente, a concentração total de proteínas de RL5S2 tratadas, aumenta, comparáveis às OpL5S2 controle. É prematuro dizer que houve uma inversão de papéis das castas (rainha tornando-se operária e operária tornando-se rainha) devido à indução de

silenciamento de vitelogenina, porém, os resultados intrigam. Essa inversão de papéis foi experimentalmente induzida por transferências recíprocas de larvas de rainhas e operárias de *A. mellifera* para ambientes nutricionais umas das outras, com posterior retorno às dietas originais (Weaver, 1957). Recentemente, Wheeler et al. (2006) mostraram, também por transferência recíproca, que algumas proteínas da via de insulina respondem de forma casta-específica às mudanças nutricionais.

Os títulos de hormônio juvenil em RL5S2 não se alteram em resposta ao tratamento com dsVg. Já em OpL5S2 tratadas, os títulos de hormônio juvenil são comparáveis aos de RL5S2. Outra evidência, é que a expressão de vitelogenina em OpL5S2 tratadas equivale não somente à de OpL5S1 (como já discutido), mas também à de RL5S2 sem tratamento, o que sugere que o silenciamento do gene codificador de vitelogenina em operárias, desencadeia respostas típicas de rainhas, nesse caso o perfil de transcrição do gene alvo. Juntos, os dados sugerem, mais uma vez, que o silenciamento do gene codificador de vitelogenina em larvas de operárias estimula o surgimento de um ambiente fisiológico típico de rainhas.

Na fase adulta, esse cenário parece atenuado. Ao que parece, as operárias resgatam sua programação original, já que não se observa diferenças no desenvolvimento ovariano, nas asas mesotorácicas e no terceiro par de pernas. Estas estruturas, em rainhas adultas, são maiores. Ainda, as Op7d têm corbícula, uma característica associada ao comportamento de forrageamento de pólen em operárias. Em resposta ao silenciamento, Op7d tratadas têm concentração de protéinas superior aos de Op7d e RRN controles. Nessa fase, a vitelogenina corresponde a 30-40% do total de proteínas circulantes na hemolinfa (Fluri et al., 1982; Engels, 1974; Engels et al., 1990). Sugerimos que a carência de vitelogenina, nesta fase, é compensada pela expressão de outras proteínas, provavelmente não ligadas à rede de expressão da vitelogenina. Amdam et al. (2003b) induziram o silenciamento de vitelogenina, por RNAi, via injeção em embriões e o desenvolvimento prosseguiu até a fase adulta. A

respeito desse trabalho, dois pontos devem ser considerados: 1 – apenas 15% dos embriões injetados, que emergiram como adultos, apresentaram silenciamento parcial de vitelogenina e 2 – os autores não analisaram caracteres morfológicos destes 15% de abelhas mencionadas.

A regulação da expressão do gene codificador de vitelogenina pelo balanço dos títulos de hormônio juvenil e ecdisteróides circulantes na hemolinfa é conhecida (Barchuck et al., 2002). Sabemos que a concentração da vitelogenina em rainhas adultas é alta (Engels, 1972, 1974, Barchuk et al., 2002) e que operárias nutridoras produzem vitelogenina em abundância, sob baixos títulos de hormônio juvenil (Rutz et al., 1976). Porém, os títulos desta proteína no ciclo de vida de operárias adultas não são contínuos como nas rainhas (Fluri et al., 1982; Engels, 1974; Engels et al., 1990) e a aplicação de altas doses de hormônio juvenil inibe a síntese de vitelogenina nas nutridoras (Rutz et al., 1976, Pinto et al., 2000). A produção de vitelogenina em operárias nutridoras apresenta forte correlação com dieta rica em proteínas (pólen) e não com os níveis de hormônio juvenil (Bitondi et al., 1994; Bitondi e Simões, 1996), da mesma forma que a síntese de vitelogenina em rainhas adultas não é dependente de hormônio juvenil (Engels e Ramamurty, 1976; Ramamurty e Engels, 1977; Engels et al., 1990; revisados por Hartfelder e Engels, 1998). A participação dos ecdisteróides na síntese de vitelogenina não é descartada, ainda que estes hormônios provoquem um aumento generalizado de proteínas no corpo gorduroso, mas não especificamente a síntese dessa proteína (Engels et al., 1990). Sugere-se, ainda, que neurohormônios gonadotrópicos e neuropeptídeos sejam responsáveis pela sua produção em abelhas (Hermann, 1969; Feldlaufer et al., 1986; Kaatz, 1988; Kaatz e Dittrich, 1989; Engels et al., 1990; Robinson et al., 1991).

A regulação da expressão e os padrões de síntese de vitelogenina são intrigantes e, ainda, um enigma. Por essas razões, investigamos outras fontes de controle da expressão gênica, analisando potenciais alvos de silenciamento pós-transcricional na região 3´UTR desse gene, analisando microRNAs.

MicroRNAs (miRNA) são pequenos RNAs endógenos não-codificadores, que variam de 18-25 nucleotídeos (nt) de extensão e que funcionam como importantes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica (Reinhart *et al.*, 2000). Em animais, seu processamento se dá no núcleo, onde se expressam os longos precursores primários que sofrem ação da enzima RNase 3 Drosha e, então, são transportados para o citoplasma com aproximadamente 70nt, numa estrutura em alça. A enzima Dicer, que possui um domínio RNA helicase, cliva o fragmento de 70 para ~20nt (miRNA processado ou maduro). Esse pequeno fragmento se associa à micro-ribonucleoproteínas (miRNPs) que, quando se ligam parcialmente à região 3´UTR, silenciam a expressão de mRNA alvos (Ambros, 2003). De 20 a 30% dos transcritos de mamíferos são alvos de microRNAs (Krek et al., 2005; Lewis et al., 2005; Stark et al., 2005; Carthew, 2006), o que sugere que a expressão gênica regulada por RNAs é mais comum do que se imaginava (Mattick, 2001, 2004).

Métodos computacionais têm sido desenvolvidos para predição de miRNAs e identificação de seus alvos. Tais métodos se baseiam em programação dinâmica para calcular o melhor pareamento entre os miRNAs candidatos com seus genes-alvo, em equações de termodinâmica para cálculo de valores de energia livre (ΔG) capazes de garantir a formação de duplex RNA-RNA e, por fim, na teoria evolutiva que assume a conservação dessas moléculas ao longo da evolução das espécies (Enright *et al.*, 2003), o que permite análises "*cross-species*".

Encontramos nove microRNAs, descritos para *A. mellifera* e outros insetos, candidatos a exercerem o papel de reguladores de vitelogenina. No que diz respeito às variações de energia livre (ΔG), a interação entre o microRNA *bantam* com a região 3´UTR do gene *hid5*, validada experimentalmente em *D. melanogaster*, ocorre a -17 kcal/mol (Brennecke et al., 2003). Assim, consideramos significantes os pareamentos acima desse valor, utilizado como corte. Os nove pareamentos entre microRNAs e o alvo 3´UTR do gene codificador de

vitelogenina ocorreram entre -17,5 e -21,3 kcal/mol. Em estudos paralelos, utilizamos os programas miRanda (*microRNA Target Scanning Algorith*, versão 1.0b, Enright *et al*., 2003) e *RNAHybrid* para confrontar 25 microRNAs de *A. mellifera* (disponíveis na base de dados *miRbase 7.1* em outubro de 2005) contra 1000 pb após o códon de parada de todos os 10.157 genes preditos, a partir do genoma dessa abelha (Nunes et al., 2005a, 2006a). Encontramos que 90% das interações miRNA/mRNA ocorreram com $\Delta G \leq$ - 25Kcal/mol. Ao utilizarmos esse valor de corte, nenhum microRNA se alinhou à região 3´UTR do transcrito de vitelogenina.

A vitelogenina possui uma região 3´UTR pequena, 56 nt, o que pressupõe um alvo estringente para ação de microRNAs. Podemos dizer que a síntese de vitelogenina não requer controle pós-trancricional via RNAs regulatórios? Não. Ao comparamos 1.650 seqüências de microRNAs (precursores e maduros) disponíveis no *miRBase 6.0* (abril de 2005) contra 11.244 cDNAs parciais (*Open Reading frame Expressed Sequence Tags*, ORESTES) de *A. mellifera* (Nunes et al., 2004), usando o algoritmo *BLAST*, identificamos nessas bibliotecas 99 novos candidatos a microRNAs e uma tendência de expressão desses mais acentuada nas fases iniciais do desenvolvimento (embriões e larvas) do que em pupas e indivíduos adultos (Nunes *et al.*, 2005b). Essas inferências, ainda preliminares, nos indicam que microRNAs, ainda desconhecidos em abelhas, podem regular a vitelogenina pós-trancricionalmente, sobretudo antes da metamorfose. Está aberto, portanto, um amplo e promissor caminho de investigações de microRNA como reguladores da expressão gênica e, baseando-se nos trabalhos de Sempere *et al*. (2002 e 2003) abrem-se perspectivas da associação dessas pequenas moléculas ao controle de processos fisiológicos modulados por ecdisteróides e hormônio juvenil, durante o desenvolvimento de *A. mellifera*.

Dois elementos *cis*-regulatórios descritos por Cristino et al. (2006), sendo um frequentemente encontrado na região promotora de genes diferencialmente expressos em

larvas de rainhas e o outro na região promotora de genes diferencialmente expressos em larvas de operárias foram encontrados até 1000 pb antes do códon de início de tradução (ATG) do gene codificador de vitelogenina (Cristino, comunicação pessoal). Em humanos, quanto mais fatores de transcrição regulam a transcrição de um gene, mais microRNAs o regulam após a transcrição (Cui et al., 2007). Ao contrário, sugerimos que a vitelogenina obedeça a um mecanismo regulatório onde estão envolvem poucos microRNAs e poucos fatores de transcrição. Provavelmente os elementos cis-regulatórios presentes em seu promotor, requerem fatores de transcrição casta-específicos e a expressão desse gene deve ocorrer de forma independente nas larvas de rainhas e operárias. Essas informações reforçam que a complexidade de funções desempenhada pela vitelogenina no ciclo de vida de *A. mellifera* é acompanhada por uma regulação estringente na transcrição e na tradução.

As vias de desenvolvimento em abelhas são ímpares entre os insetos. Por isso a necessidade de se investir em novas metodologias para refinar preciosas informações vindas de décadas. Inúmeros modelos têm sido propostos para compreensão das interações entre vitelogenina e hormônio juvenil (Amdam e Omholt, 2003a; Hunt et al., 2007; Page e Amdam, 2007) em *A. mellifera*, sobretudo em adultos.

Lipídios correspondem a aproximadamente 30-40% do peso seco de ovos de insetos. Ovócitos de insetos são capazes de sintetizar triacilgliceróis a partir de ácidos graxos, porém seqüestram lipoproteínas da hemolinfa, carreadoras de lipídios, como é o caso da vitelogenina e lipoforina. No entanto, na constituição de vitelogenina encontra-se de 8-15% de lipídios, logo, essa proteína contribui apenas com pequena quantidade da reserva energética dos ovos (para revisão, Ziegler e Van-Antwerpen, 2006). Em *Manduca sexta*, a vitelogenina seqüestrada contribui com apenas 5% da quantidade dos lipídios dos ovos (Kawooya e Law, 1988). Rainhas virgens e operárias nutridoras, ambas não-poedeiras, produzem vitelogenina em abundância, porém, sem relação com sua captação pelos ovócitos (Engels, 1972, 1973;

Fluri et al. 1981, 1982, revisados por Hartfelder e Engels, 1998). Corona et al. (2007) mostraram que tanto o transcrito quanto a proteína de vitelogenina estão presentes na cabeça, no tórax e no abdomen de rainhas adultas. Estes autores destacam que apenas a proteína é muito abundante nos ovários. Segundo Engels (1973) um ovo recém-posto pesa 100 μg, dos quais 5-7 μg são vitelina. Essas informações mostram a importância da vitelogenina na reprodução, mas, também, deslocam seu papel para outros compartimentos e funções, de onde vêm nosso interesse em aprofundar os conhecimentos sobre a vitelogenina fora do contexto reprodutivo.

A fase larval deve ser olhada com cautela. Na trilha dos estudos pós-genômicos, investigamos tendências funcionais de genes co-expressos ao longo da ontogênese, a partir de ~5.000 etiquetas de cDNA (Nunes *et al*., 2004) de várias fases do ciclo de vida de operárias. Verificamos que a fase larval possui um perfil de expressão gênica particular, diferente das similaridades encontradas entre a fase embrionária e a transição pupa-adulto (Nunes et al., 2006b). As discrepâncias da fase larval, frente aos demais estágios do desenvolvimento, somadas aos dados disponíveis na literatura sobre o comportamento da vitelogenina e do hormônio juvenil nessas abelhas, fazem do polifenismo, bem como das particularidades morfo-fisiológicas dessa etapa do desenvolvimento, um capítulo à parte. Nesse contexto, nossa sugestão é que tanto a regulação da expressão e as funções da vitelogenina sejam divergentes nas fases, larval e adulta, ou seja, contexto-dependentes. Porém, por mais que sua regulação ocorra de forma independente durante o desenvolvimento, os efeitos pleiotrópicos da vitelogenina sobre múltiplos processos fisiológicos parecem constantes em abelhas adultas (Nelson et al., 2007) e larvas (presente trabalho).

Novos elementos provenientes do estudo de genes da via insulínica em larvas e adultos de *A. mellifera* (Wheeler et al., 2006; Barchuk et al., 2007; Patel et al., 2007; Corona

et al., 2007) vêm agregando informações importantes para o entendimento do desenvolvimento, longevidade e comportamento desse “super-organismo”.

Em abelhas, faltam-nos informações moleculares na fase larval, sobre o papel do receptor de vitelogenina e do receptor de hormônio juvenil, da ação de outros neurohormônios (incluindo os ecdisteróides, hormônio protoracicotrópico_PTTH, ETH) e, finalmente, da expressão de alatostatinas, alatotropinas, genes do complexo Broad (E74, E75), macromoléculas que funcionam como sinais mediados pela nutrição diferencial.

Nosso trabalho corrobora, via silenciamento gênico, a relação da vitelogenina com o hormônio juvenil relacionados à fisiologia e diferenciação de castas, mostrando, de forma indireta, ligação com a via de insulina e uma reprogramação genética após a metamorfose. As informações acrescentam elementos que podem enriquecer os modelos vigentes.

6 – CONCLUSÕES

Os dados do presente trabalho permite-nos concluir que:

- o tratamento não-invasivo com a dose de 0,5 μg de RNAs de dupla fita oferecido na dieta de larvas de segundo estágio, mantidas em condições naturais, é viável;

- a remoção da cria 24h após o tratamento e o índice de operculação são bons parâmetros para se avaliar o sucesso de experimentos dessa natureza;

- o número de indivíduos coletados é maior sempre que se mantém certa distância entre as células de cria que recebem o tratamento com 0,5 μg de dsRNA;

- doses de RNA de fita dupla (dsVg ou dsGFP) igual ou superior a 3 μg inviabilizam o desenvolvimento de rainhas e operárias de *A. mellifera*;

- o quarto estágio larval é crítico para o desenvolvimento de rainhas de *A. mellifera*;

- o tratamento com moléculas de dsVg, oferecido na dieta natural de L2, deprime a expressão do gene codificador de vitelogenina durante o desenvolvimento larval e nas formas adultas estudadas, de rainhas e operárias;

- o silenciamento do gene codificador de vitelogenina em larvas de operárias está de alguma forma associado ao aumento dos títulos de hormônio juvenil, evidência esta que indica um

feedback regulatório (hipótese “duplo repressor”) também na fase larval, a propósito do que ocorre na fase adulta de operárias;

- o silenciamento do gene codificador de vitelogenina em larvas de operárias estimula o surgimento de um ambiente fisiológico típico de rainhas, porém, após a metamorfose, as operárias tratadas com dsVg resgatam sua programação genética original, quando se observa que caracteres morfológicos típicos desta casta (ovários, as asas mesotorácicas e o terceiro par de pernas) não se alteram;

- moléculas de dsGFP, quando ingeridas pelas larvas, exercem inibição pré-transcricional do gene codificador de vitelogenina e alterações fisiológicas são observáveis em larvas de rainhas e operárias;

- a maquinaria de tradução para os mRNA de vitelogenina em rainhas adultas é altamente eficiente, uma vez que, mesmo com redução significante de transcritos, a abundância de sua proteína é alta;

- que a regulação da expressão e as funções da vitelogenina sejam divergentes nas fases, larval e adulta, ou seja, contexto-dependentes, devendo atender a um mecanismo regulatório que envolvem poucos microRNAs e poucos fatores de transcrição, casta-específicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackerman S, Clare FB, McGill TW e Sonenshine DE. 1981. Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis*. Journal of Parasitology 67 (5):737-740.

Allingham PG, Kerlin RL, Tellam RL, Briscoe SJ e Standfast HA. 1992. Passage of host immunoglobulin across the midgut epithelium into the hemolymph of blood fed buffalo flies *Haematobia irritans exigua*. Journal of Insect Physiology 38 (1):9-17.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW e Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215 (3):403-410.

Ambros V. 2003. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. Cell 113 (6):673-676.

Amdam GV e Omholt SW. 2002. The regulatory anatomy of honeybee lifespan. Journal of Theoretical Biology 216 (2):209-228.

Amdam GV e Omholt SW. 2003a. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: The double repressor hypothesis. Journal of Theoretical Biology 223 (4):451-464.

Amdam GV, Simões ZLP, Guidugli KR, Norberg K e Omholt SW. 2003b. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. BMC Biotechnology 3:1.

Amdam GV, Norberg K, Hagen A e Omholt SW. 2003c. Social exploitation of vitellogenin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100 (4):1799-1802.

Amdam GV, Norberg K, Fondrk MK e Page RE. 2004a Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101 (31):11350-11355.

Amdam GV, Simões ZLP, Hagen A, Norberg K, Schroder K, Mikkelsen O, Kirkwood TBL e Omholt SW. 2004b Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. Experimental Gerontology 39 (5):767-773.

Amdam GV, Aase A, Seehuus SC, Fondrk MK, Norberg K e Hartfelder K. 2005a. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. Experimental Gerontology 40 (12):939-947.

Amdam GV, Norberg K, Omholt SW, Kryger P, Lourenço AP, Bitondi MMG e Simões ZLP. 2005b. Higher vitellogenin concentrations in honey bee workers may be an adaptation to life in temperate climates. Insectes Sociaux 52 (4):316-319.

Amdam GV e Page RE. 2005c. Intergenerational transfers may have decoupled physiological and chronological age in a eusocial insect. Ageing Research Reviews 4 (3):398-408.

Amdam GV, Norberg K, Page RE, Erber J e Scheiner R. 2006a. Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). Behavioural Brain Research 169 (2):201-205.

Amdam GV, Csondes A, Fondrk MK e Page RE. 2006b. Complex social behaviour derived from maternal reproductive traits. Nature 439 (7072):76-78.

Amdam GV, Nilsen KA, Norberg K, Fondrk MK e Hartfelder K. 2007. Variation in endocrine signaling underlies variation in social life history. American Naturalist 170(1):37-46.

Araujo RN, Santos A, Pinto FS, Gontijo NF, Lehane MJ e Pereira MH. 2006. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. Insect Biochemistry and Molecular Biology 36 (9):683-693.

Aronstein K, Pankiw T e Saldivar E. 2006. Sid-I is implicated in systemic gene silencing in the honey bee. Journal of Apicultural Research 45 (1):20-24.

Aronstein K e Saldivar E. 2005. Characterization of a honey bee toll related receptor gene Am18w and its potential involvement in antimicrobial immune defense. Apidologie 36 (1):3-14.

Asencot M e Lensky Y. 1976. Effect of sugars and juvenile hormone on differentiation of female honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) to queens. Life Sciences 18 (7):693-700.

Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL e Santos AS. 2005. BioEstat 4.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém-PA. Imprensa Oficial do Estado do Pará, Brasil.

Barchuk AR, Bitondi MMG e Simões ZLP. 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.

Barchuk AR, Maleszka R e Simões ZLP. 2004. *Apis mellifera* ultraspiracle: cDNA sequence and rapid up-regulation by juvenile hormone. Insect Molecular Biology 13 (5):459-467.

Barchuk AR, Cristino AS, Kucharski R, Costa LF, Simões ZLP e Maleszka R. (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. BMC Developmental Biology 7:70.

Barron AB, Maleszka J, Vander Meer RK, Robinson GE e Maleszka R. 2007. Comparing injection, feeding and topical application methods for treatment of honeybees with octopamine. Journal of Insect Physiology 53 (2):187-194.

Beetsma J. 1985. Feeding-behavior of nurse bees, larval food composition and caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera* L.). Fortschritte Der Zoologie 31: 407-410.

Ben-Yakir D. 1989. Quantitative studies of host immunoglobulin-G in the hemolymph of ticks (Acari). Journal of Medical Entomology 26 (4):243-246.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM e Hannon GJ. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409:363-366.

Beye M, Hartel S, Hagen A, Hasselmann M e Omholt SW. 2002. Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. Insect Molecular Biology 11 (6):527-532.

Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, Page RE e Omholt SW. 2003. The gene csd is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. Cell 114 (4):419-429.

Beye M, Gattermeier I, Hasselmann M, Gempe T, Schioett M, Baines JF, Schlipalius D, Mougel F, Emore C, Rueppell O, Sirvio A, Guzman-Novoa E, Hunt G, Solignac M e Page RE. 2006. Exceptionally high levels of recombination across the honey bee genome. Genome Research 16 (11):1339-1344.

Bitondi MMG, Paulino Simões ZL, Nascimento AM e Garcia SL. 1994. Variation in the haemolymph protein composition of confined Apis mellifera and partial restoration of vitellogenin titre by juvenile hormone analogue treatment. Journal of Hymenoptera Research 3: 107-117.

Bitondi MMG e Simões ZLP. 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 (1):27-36.

Bitondi MMG, Nascimento AM, Cunha AD, Guidugli KR, Nunes FMF e Simões ZLP. 2006. Characterization and expression of the Hex 110 gene encoding a glutamine-rich hexamerin in the honey bee, *Apis mellifera*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 63 (2):57-72.

Boisson B, Jacques JC, Choumet V, Martin E, Xu JN, Vernick K e Bourgouin C. 2006. Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. FEBS Letters 580 (8):1988-1992.

Boleli IC, Hartfelder K e Simões ZLP. 1995. Serotonin-like immunoreactivity in the central nervous and neuroendocrine system of honey bee (*Apis mellifera*) larvae and pupae. Zoology 99 (1):58-67.

Boleli IC, Simões ZLP e Hartfelder K. 1998. The stomatogastric nervous system of the honey bee (*Apis mellifera*) in a critical phase of caste development. Journal of Morphology 236 (2):139-149.

Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72 (1-2):248-254.

Brandt BW, Zwaan BJ, Beekman M, Westendorp RGJ e Slagboom PE. 2005. Shuttling between species for pathways of lifespan regulation: acentral role for the vitellogenin gene family? Bioessays 27 (3):339-346.

Breathnach R e Chambon P. 1981. Organization and expression of eukaryotic split genes-coding for proteins. Annual Review of Biochemistry 50: 349-383.

Brennecke J, Stark A, Russell RB e Cohen SM. 2005. Principles of microRNA-target recognition. PLoS Biology 3 (3):404-418.

Bünning J. 1994. The insect ovary. Chapman & Hall, London.

Carthew RW. 2006. Gene regulation by microRNAs. Current Opinion in Genetics & Development 16 (2):203-208.

Chapman NC, Oldroyd BP e Hughes WOH. 2007. Differential responses of honeybee (*Apis mellifera*) patrilines to changes in stimuli for the generalist tasks of nursing and foraging. Behavioral Ecology and Sociobiology 61: 1185-1194.

Chen JS, Sappington TW e Raikhel AS. 1997. Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry. Journal of Molecular Evolution 44 (4):440-451.

Collins AM. 2004. Variation in time of egg hatch by the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Annals of the Entomological Society of America 97 (1):140-146.

Colombani J, Raisin S, Pantalacci S, Radimerski T, Montagne J e Léoopold P. 2003. A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. Cell 114 (6):739-749.

Copijn GM, Beetsma J e Wirtz P. 1979. Queen differentiation and mortality after application of different juvenile hormone analogs to worker larvae of the honeybee (*Apis mellifera*

L.). Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie Van Wetenschappen Series C-Biological and Medical Sciences 82 (1):29-42.

Corona M, Estrada E e Zurita M.1999.Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. Journal of Experimental Biology 202 (8):929-938.

Corona M, Velarde RA, Remolina S, Moran-Lauter A, Wang Y, Hughes KA e Robinson GE. 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104 (17):7128-7133.

Cristino AS, Nunes FMF, Lobo CH, Bitondi MMG, Simões ZLP, Costa LD, Lattorff HMG, Moritz RFA, Evans JD e Hartfelder K. 2006. Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality. Insect Molecular Biology 15 (5):703-714.

Cui QH, Yu ZB, Pan YL, Purisima EO e Wang E. 2007. MicroRNAs preferentially target the genes with high transcriptional regulation complexity. Biochemical and Biophysical Research Communications 352 (3):733-738.

Danforth B. 2007. Bees. Current Biology 17 (5):R156-R161.

Danty E, Arnold G, Burmester T, Huet JC, Huet D, Pernollet JC e Masson C. 1998. Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 28 (5-6):387-397.

Dietz A, Herman HR e Blum MS. 1979. The role of exogenous JHI, JHII, JHIII and anti-JH (Precocene II) on queen induction of 4.5 day-old worker honey bee larvae. Journal of Insect Physiology 25: 503-512.

Dogra GS, Ulrich GM e Rembold H. 1977. Comparative study of endocrine system of honey bee larvae under normal and experimental conditions. Zeitschrift Fur Naturforschung 32c (7-8):637-642.

Dombroski TCD, Simões ZLP e Bitondi MMG. 2003. Dietary dopamine causes ovary activation in queenless *Apis mellifera* workers. Apidologie 34 (3):281-289.

Eder J, Kremer JP e Rembold H. 1983. Correlation of cytochrome c titer and respiration in *Apis mellifera*: adaptative responses to caste determination defines workers, intercastes and queens. Comparative Biochemistry Physiology - B 76: 703-716.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K e Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411 (6836):494-498.

Engels W. 1972. Intraindividual and interindividual protein-metabolism in *Apis mellifica* regarding oogenesis. Insectes Sociaux 19 (4):415-416.

Engels W. 1972. Quantitative investigations on vitellogenic protein-metabolism in honey bee (*Apis mellifica*). Wilhelm Roux Archiv Fur Entwicklungsmechanik Der Organismen 171 (1):55-86.

Engels W. 1973. Temporal and spatial pattern of yolk incorporation into oocyte of *Apis mellifica*. Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie 142 (3):409-430.

Engels W. 1974. Occurrence and significance of vitellogenins in female castes of social Hymenoptera. American Zoologist 14 (4):1229-1237.

Engels W e Ramamurty PS. 1976. Initiation of oogenesis in allatectomized virgin honey bee queens by carbon dioxide treatment. Journal of Insect Physiology 22 (10):1427-1432.

Engels W, Kaatz H, Zillikens A, Simões ZPL, Trube A, Braun R e Dittrich F. 1990. Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In: Advances in Invertebrate Reproduction. Elsevier, Amsterdam 5: 495-502.

Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C e Marks DS. 2003. MicroRNA targets in Drosophila. Genome Biology 5(1):R1.

Evans JD e Wheeler DE. 1999. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96 (10):5575-5580.

Evans JD e Wheeler DE. 2000. Expression profiles during honeybee caste determination. Genome Biology 2: 1-6.

Evans JD e Wheeler DE. 2001. Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. Bioessays 23 (1):62-68.

Evans JD e Gundersen-Rindal D. 2003. Beenomes to *Bombyx*: Future directions in applied insect genomics. Genome Biology 4 (3):107.

Evans JD e Weaver DB. 2003. Beenome soon: Honey bees as a model 'nonmodel' system for comparative genomics. Comparative and Functional Genomics 4 (3):351-352.

Falchuk KH. 1998. The molecular basis for the role of zinc in developmental biology. Molecular and Cellular Biochemistry 188 (1-2):41-48.

Feldlaufer MF, Svoboda JA e Herbert EW. 1986. Makisterone-A and 24-methylenecholesterol from the ovaries of the honey-bee, *Apis mellifera* L. Experientia 42 (2):200-201.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE e Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans.* Nature 391 (6669):806–811.

Fluri P, Sabatini AG, Vecchi MA e Wille H. 1981. Blood juvenile hormone, protein and vitellogenin titers in laying and non-laying queen honeybees. Journal of Apicultural Research 20 (4):221-225.

Fluri P, Luscher M, Wille H e Gerig L. 1982. Changes in weight of the pharyngeal gland and hemolymph titers of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. Journal of Insect Physiology 28 (1):61-68.

Fluri P e Bogdanov S. 1987. Effects of artificial shortening of the photoperiod on honeybee (*Apis mellifera*) polyethism. Journal of Apicultural Research 26(2): 83-89.

Free JB e Winder ME. 1983. Brood recognition by honeybee (*Apis mellifera*) workers. Animal Behaviour 31:539-545.

Gadau J, Page RE, Werren JH e Schmid-Hempel P. 2000. Genome organization and social evolution in Hymenoptera. Naturwissenschaften 87 (2):87-89.

Geldhof P, Murray L, Couthier A, Gilleard JS, McLauchlan G, Knox DP e Britton C. 2006. Testing the efficacy of RNA interference in *Haemonchus contortus*. International Journal for Parasitology 36 (7):801-810.

Gilbert LI, Granger AN e Roe RM. 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. Insect Biochemistry and Molecular Biology 30:617-644.

Goode K, Huber Z, Mesce KA e Spivak M. 2006. Hygienic behavior of the honey bee (*Apis mellifera*) is independent of sucrose responsiveness and foraging ontogeny. Hormones and Behavior 49 (3):391-397.

Goodman WG, Coy DC, Baker FC, Xu L e Toong YC. 1990. Development and application of a radioimmunoassay for the juvenile hormones. Insect Biochemistry 20 (4):357-364.

Goodman WG, Orth AP, Toong YC, Ebersohl R, Hiruma K e Granger NA. 1995. Recent advances in radioimmunoassay technology for the juvenile hormones. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 30 (2-3):295-306.

Gramacho KP e Spivak M. 2003. Differences in olfactory sensitivity and behavioral responses among honey bees bred for hygienic behavior. Behavioral Ecology and Sociobiology 54 (5):472-479.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A e Enright AJ. 2006. miRbase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Nucleic Acids Research 34: D140-D144.

Guidugli KR, Nascimento AM, Amdam GV, Barchuk AR, Omholt S, Simões ZLP e Hartfelder K. 2005a. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. FEBS Letters 579 (22):4961-4965.

Guidugli KR, Piulachs MD, Bellés X, Lourenço AP e Simões ZLP. 2005b. Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 59 (4):211-218.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D e Hannon GJ. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature 404:293-296.

Harbo JR, Bolten AB, Rinderer TE e Collins AM. 1981. Development periods for eggs of africanized and european honeybees. Journal of Apicultural Research 20 (3):156-159.

Harris JW e Woodring J. 1992. Effects of stress, age, season, and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brain. Journal of Insect Physiology 38 (1):29-35.

Hartfelder K, Köstlin K e Hepperle C. 1995. Ecdysteroid-dependent protein synthesis in caste-specific development of the larval honey bee ovary. Roux´s Archives of Developmental Biology 205:73-80.

Hartfelder K e Steinbrück G. 1997. Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. Invertebrate Reproduction and Development 31:237-250.

Hartfelder K e 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.

Hartfelder K. 2000. Insect juvenile hormone: From "status quo" to high society. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 33 (2):157-177.

Hatfield PR. 1988. Detection and localization of antibody ingested with a mosquito bloodmeal. Medical and Veterinary Entomology 2 (4):339-345.

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

Hermann H. 1969. Die neurohormonale Kontrolle der Paarungsflüge und der Eilegetätigkeit bei der Bienenkönigin. Z. Bienenfrosch 9:509-544.

Honey Bee Genome Consortium. 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. Nature 443 (7114):931-949.

Hrassnigg N e Crailsheim K. 1998. The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*Apis mellifera* L.). Journal of Insect Physiology 44(5-6):393-404.

Huber F. 1821. New observations on bees. W. & C. Tait and Longman, Hurst, Rees, Orme and Brown, London.

Hunt GJ, Amdam GV, Schlipalius D, Emore C, Sardesai N, Williams CE, Rueppell O, Guzman-Novoa E, Arechavaleta-Velasco M, Chandra S, Fondrk MK, Beye M e Page RE. 2007. Behavioral genomics of honeybee foraging and nest defense. Naturwissenschaften 94 (4):247-267.

Hunter CP. 1999. Genetics: a touch of elegance with RNAi. Current Biology 9 (12):R440-2.

Ikeya T, Galic M, Belawat P, Nairz K e Hafen E. 2002. Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. Current Biology 12 (15):1293-1300.

Isoe J, Kunz S, Manhart C, Wells MA e Miesfeld RL. 2007. Regulated expression of microinjected DNA in adult *Aedes aegypti* mosquitoes. Insect Molecular Biology 16 (1):83-92.

Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G e Linsley PS. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. Nature Biotechnology 21 (6):635-637.

Kaatz H. 1988. Juvenilhormon-unabhangige Initiation und Regulation der Vitellogenin-Synthese bei der Bienenkönigin (*Apis mellifera* L.). Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft 81: 272-273.

Kaatz H e Dittrich F. 1989. Hormonal and pheromonal regulation of vitellogenin synthesis in honeybees. In: Molecular Insect Science (Hagedorn HH, ed.). New York: Plenum press, pp. 325-326.

Kanost MR, Kawooya JK, Law JH, Ryan RO, Van Heusden MC e Ziegler R. 1990. Insect hemolymph proteins. Advances in Insect Physiology 22:299-396.

Kaufman TC, Severson DW e Robinson GE. 2002. The *Anopheles* genome and comparative insect genomics. Science 298 (5591):97-98.

Kawooya JK e Law JH. 1988. Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. Journal of Biological Chemistry 263 (18):8748-8753.

Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ e Plasterk RH. 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans.* Genes and Development 15: 2654–2659.

Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M e Rajewsky N. 2005. Combinatorial microRNA target predictions. Nature Genetics 37 (5):495-500.

Kryger P, Kryger U e Moritz RFA. 2000. Genotypical variability for the tasks of water collecting and scenting in a honey bee colony. Ethology 106 (9):769-779.

Lackie AM e Gavin S. 1989. Uptake and persistence of ingested antibody in the mosquito *Anopheles stephensi*. Medical and Veterinary Entomology 3 (3):225-230.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. Nature 227 (5259):680-685.

Laidlaw HH. 1992. The hive and the honey bee. Ed. Graham, J. M. Dadant, Hamilton, II. p. 84-89; 276-271.

Le Conte Y, Arnold G, Trouiller J e Masson C. 1990. Identification of a brood pheromone in honeybees. Naturwissenschaften 77 (7):334-336.

Le Conte Y, Sreng L e Poitout SH. 1995. Brood pheromone can modulate the feeding-behavior of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). Journal of Economic Entomology 88 (4):798-804.

Le Conte Y, Sreng L e Trouiller J. 1994. The recognition of larvae by worker honeybees. Naturwissenschaften 81 (10):462-465.

Lenoir JC, Laloi D, Dechaume-Moncharmont FX, Solignac M e Pham MH. 2006. Intra-colonial variation of the sting extension response in the honey bee *Apis mellifera*. Insectes Sociaux 53 (1):80-85.

Lewis BP, Burge CB e Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell 120 (1):15-20.

Lin HR, Dusset C e Huang ZY. 2004. Short-term changes in juvenile hormone titers in honey bee workers due to stress. Apidologie 35 (3):319-327.

Liu WH e Saint DA. 2002. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. Analytical Biochemistry 302 (1):52-59.

Livak KJS e Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods 25 (4):402-408.

Maleszka J, Foret S, Saint R e Maleszka R. 2007. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). Development Genes and Evolution 217 (3):189-196.

Mattick JS. 2001. Non-coding RNAs: The architects of eukaryotic complexity. EMBO Reports 2 (11):986-991.

Mattick JS. 2004. RNA regulation: A new genetics? Nature Reviews Genetics 5 (4):316-323.

Menzel R. 2001. Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. Learning and Memory 8 (2):53-62.

Michelette ERD e Soares AEE. 1993. Characterization of preimaginal developmental stages in africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). Apidologie 24 (4):431-440.

Mitchell III RD, Ross E, Osgood C, Sonenshine DE, Donohue KV, Khalil SM, Thompson DM e Roe RM. 2007. Molecular characterization, tissue-specific expression and RNAi knockdown of the first vitellogenin receptor from a tick. Insect Biochemistry and Molecular Biology 37 (4):375-388.

Moritz RFA e Southwick EE. 1992. Bees as superorganisms. Springer-Verlag., Berlin.

Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page RE e Amdam GV. 2007. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. PLoS Biology 5 (3):673-677.

Nijhout HF. 1994. Insect Hormones. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.

Nijhout HF. 2003. The control of body size in insects. Developmental Biology 261 (1):1-9.

Nunes FMF, Valente V, Sousa JF, Cunha MAV, Pinheiro DG, Maia RM, Araujo DD, Costa MCR, Martins WK, Carvalho AF, Monesi N, Nascimento AM, Peixoto PMV, Silva MFR, Ramos RGP, Reis LFL, Dias-Neto E, Souza SJ, Simpson AJG, Zago MA, Soares AEE, Bitondi MMG, Espreafico EM, Espindola FS, Paçó-Larson ML, Simões ZLP, Hartfelder K e Silva Jr WA. 2004. The use of Open Reading frame ESTs (ORESTES) for analysis of the honey bee transcriptome. BMC Genomics 5: 84.

Nunes FMF, Cristino AS e Simões ZLP. 2005a. Perfil funcional de potenciais alvos gênicos regulados por microRNAs em *Apis mellifera*. CDROM do I Simpósio Brasileiro de Insetos Sociais, Belo Horizonte - MG, Brasil.

Nunes FMF, Cristino AS e Simões ZLP. 2005b. in silico analysis of cDNA libraries revealed an important source to discover novel *Apis mellifera* microRNAs. CDROM do 51º Congresso Brasileiro de Genética, Águal de Lindóia - SP, Brasil.

Nunes FMF, Cristino AS, Macedo LMF e Simões ZLP. 2006a. Biological processes regulated by microRNAs in *Apis mellifera* are closely related to developmental pathways. CDROM do 52º Congresso Brasileiro de Genética, Foz do Iguaçu - PR, Brasil.

Nunes FMF, Freitas FCP, Macedo LMF, Simões ZLP e Cristino AS. 2006b. Genes co-expressos durante o desenvolvimento de operárias de *Apis mellifera*. CDROM do VII Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto - SP, Brasil.

Nunes-Silva PG, Gonçalves LS, Francoy TM e De Jong D. 2006. Rate of growth and development time of africanized honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers during ontogenetic development. Brazilian Journal of Morphology Science 23 (3-4):325-332.

Oldham S, Stocker H, Laffargue M, Wittwer F, Wymann M e Hafen E. 2002. The *Drosophila* insulin/IGF receptor controls growth and size by modulating $PrdInsP_3$ levels. Development 129:4103-4109.

Oldham S e Hafen E. 2003. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. Trends in Cell Biology 13 (2):79-85.

Oldroyd BP e Thompson GJ. 2007. Behavioural genetics of the honey bee *Apis mellifera*. Advances in Insect Physiology 33: doi: 10.1016/S0065-2806(06)33001-9.

Page RE e Peng CYS. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. Experimental Gerontology 36 (4-6):695-711.

Page RE e Erber J. 2002. Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. Naturwissenschaften 89 (3):91-106.

Page RE, Gadau J e Beye M. 2002. The emergence of hymenopteran genetics. Genetics 160 (2):375-379.

Page RE e Amdam GV. 2007. The making of a social insect: developmental architectures of social design. Bioessays 29 (4):334-343.

Pal U, Li X, Wang T, Montgomery RM, Ramamoorthi N, deSilva AM, Bao F, Yang XF, Kantor FS, Telford S, Pypaert M, Anderson JF e Fikrig E. 2004. TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. Cell 119:457-468.

Palmer KA e Oldroyd BP. 2003. Evidence for intra-colonial genetic variance in resistance to *American foulbrood* of honey bees (*Apis mellifera*): further support for the parasite/pathogen hypothesis for the evolution of polyandry. Naturwissenschaften 90 (6):265-268.

Pankiw T e Page RE. 2003. Effect of pheromones, hormones, and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.). Journal of Comparative Physiology A - Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology 189 (9):675-684.

Patel A, Fondrk MK, Kaftanoglu O, Emore C, Hunt G, Frederick K e Amdam GV. 2007. The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. PLoS ONE 62:e509.

Penzlin H. 1985. Stomatogastric nervous system. In: Comparative Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (GA Kerkut e LI Gilbert, eds.). Pergamon, Oxford 5: 371-406.

Pinto LZ, Bitondi MMG e Simões ZLP. 2000. Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. Journal of Insect Physiology 46 (2):153-160.

Pinto LZ, Hartfelder K, Bitondi MMG e Simões ZLP. 2002. Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. Journal of Insect Physiology 48 (8):783-790.

Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuk AR, Cruz J, Simões ZLP e Bellés X. 2003. The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. Insect Biochemistry and Molecular Biology 33 (4):459-465.

Postlethwait JH e Giorgi F. 1985. Vitellogenesis in insects. In: Developmental Biology - A Comprehensive Synthesis (Browder E, ed.) 1:85-126.

Prestwich GD, Wojtasek H, Lentz AJ e Rabinovich JM. 1996. Biochemistry of proteins that bind and metabolize juvenile hormones. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 32 (3-4):407-419.

Qiu S, Adema CM e Lane T. 2005. A computational study of off-target effects of RNA interference. Nucleic Acids Research 33 (6):1834-1847.

Rachinsky A, Strambi C, Strambi A e Hartfelder K. 1990. Caste and metamorphosis - hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. General and Comparative Endocrinology 79 (1):31-38.

Rachinsky A. 1994. Octopamine and serotonin influence on *corpora allata* activity in honey bee (*Apis mellifera*) larvae. Journal of Insect Physiology 40: 549-554.

Rachinsky A e Engels W. 1995. Caste development in honeybees (*Apis mellifera*) - juvenile hormone turns on ecdysteroids. Naturwissenschaften 82 (8):378-379.

Radloff SE, Hepburn R e Bangay LJ. 2003. Quantitative analysis of intracolonial and intercolonial morphometric variance in honeybees, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. Apidologie 34 (4):339-351.

Raikhel AS e Dhadialla TS. 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. Annual Review of Entomology 37: 217-251.

Raikhel AS, Brown MR e Bellés X. 2005. Hormonal control of reproductive processes. In Comprehensive Molecular Insect Science (Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, eds.). Oxford: Elsevier 3: 433-491.

Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL e Moorman AFM. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neuroscience Letters 339 (1):62-66.

Ramamurty PS e Engels W. 1977. Allatectomy and juvenile hormone effects on synthesis and incorporation of vitellogenin in honeybee queen (*Apis mellifica*). Zoologische Jahrbucher-Abteilung Fur Allgemeine Zoologie Und Physiologie Der Tiere 81 (2):165-176.

Ramasamy MS, Ramasamy R, Kay BH e Kidson C. 1988. Anti-mosquito antibodies decrease the reproductive capacity of *Aedes aegypti*. Medical and Veterinary Entomology 2 (1):87-93.

Ratnieks FLW e Wenseleers T. 2005. Policing insect societies. Science 307 (5706):54-56.

Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M e Giegerich R. 2004. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. RNA 10 (10):1507-1517.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR e Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature 403 (6772):901-906.

Rembold H. 1965. Biologically active substances in royal jelly. Vitamins and Hormones 23: 359-382.

Rembold H, Czoppelt C e Rao PJ. 1974. Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in honeybee, *Apis mellifera*. Journal of Insect Physiology 20 (7):1193-1202.

Rembold H. 1987a. Caste differentiation of the honey bee - fourteen years of biochemical research at Martinsried. In: Chemistry and Biology of Social Insects. Ed. Eder, J. and Rembold, H., Verlag, J. Peperny, München, pp. 3-13.

Rembold H. 1987b. Caste-specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera.* Insect Biochemistry 17(7): 1003-1006.

Rembold H, Czoppelt C, Grüne M, Lackner B, Pfeffer J e Woker E. 1992. Juvenile hormone titers during honey bee embriogenesis and metamorphosis. In: Insect Juvenile Hormone Research. B. (Mauchamp, F. Couillaud e J. C. Baehr, eds.) INRA, Paris. pp. 37-43.

Robinson GE, Strambi C, Strambi A e Feldlaufer MF. 1991. Comparison of juvenile hormone and ecdysteroid hemolymph titers in adult worker and queen honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Insect Physiology 37 (12):929-935.

Robinson GE e Ben-Shahar Y. 2002. Social behavior and comparative genomics: new genes or new gene regulation? Genes Brain and Behavior 1 (4):197-203.

Robinson GE, Grozinger CM e Whitfield CW. 2005. Sociogenomics: social life in molecular terms. Nature Reviews Genetics 6 (4):257-U16.

Robinson GE, Evans JD, Maleszka R, Robertson HM, Weaver DB, Worley K, Gibbs RA e Weinstock GM. 2006. Sweetness and light: illuminating the honey bee genome. Insect Molecular Biology 15 (5):535-539.

Rothenbuhler WC. 1964. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees .I. Responses of 4 inbred lines to disease-killed brood. Animal Behaviour 12 (4):578-583.

Rual JF, Klitgord N e Achaz G.2007. Novel insights into RNAi off-target effects using *C. elegans* paralogs. BMC Genomics 8:106.

Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Miklos GLG, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W, Cherry JM, Henikoff S, Skupski MP, Misra S, Ashburner M, Birney E, Boguski MS, Brody T, Brokstein P, Celniker SE, Chervitz SA, Coates D, Cravchik A, Gabrielian A, Galle RF, Gelbart WM, George RA, Goldstein LSB, Gong FC, Guan P, Harris NL, Hay BA, Hoskins RA, Li JY, Li ZY, Hynes RO, Jones SJM, Kuehl PM, Lemaitre B, Littleton JT, Morrison DK, Mungall C, O'Farrell PH, Pickeral OK, Shue C, Vosshall LB, Zhang J, Zhao Q, Zheng XQH, Zhong F, Zhong WY, Gibbs R, Venter JC, Adams MD e Lewis S. 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. Science 287 (5461):2204-2215.

Rusinov V, Baev V, Minkov IN e Tabler M. 2005. Microinspector: A web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence. Nucleic Acids Research 33: W696-W700.

Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA e Barrell B. 2000. Artemis: Sequence visualization and annotation. Bioinformatics 16 (10):944-945.

Rutz W, Gerig L, Wille H e Luscher M. 1976. Function of juvenile hormone in adult worker honeybees, *Apis mellifera*. Journal of Insect Physiology 22 (11):1485-1491.

Sanger F, Nicklen S e Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74 (12):5463-5467.

Sappington TW e Raikhel AS. 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. Insect Biochemistry and Molecular Biology 28 (5-6):277-300.

Sappington TW. 2002. The major yolk proteins of higher Diptera are homologs of a class of minor yolk proteins in Lepidoptera. Journal of Molecular Evolution 55(4):470-475.

Sasaki M, Tsuruta T e Asada S. 1987. Role of the physical property of royal jelly in queen differentiation of honeybees. In: Chemistry and Biology of Social Insects. PepernyVerlag, Munich. pp. 306-307.

Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, Hughes CM, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Meyerson M e Collins FS. 2004. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101 (7):1892-1897.

Schlein Y, Spira DT e Jacobson RL. 1976. Passage of serum immunoglobulins through gut of *Sarcophaga falculata*, pand. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 70 (2):227-230.

Schmidt-Capella IC e Hartfelder K. 1998. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. Journal of Insect Physiology 44:385-391.

Schmidt-Capella IC e Hartfelder K. 2002. Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of larval honey bee ovary. Cell Tissue Research 307:265-272.

Seehuus SC, Krekling T e Amdam GV. 2006. Cellular senescence in honey bee brain is largely independent of chronological age. Experimental Gerontology 41 (11):1117-1125.

Seehuus SC, Norberg K, Gimsa U, Krekling T e Amdam GV. 2006. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103 (4):962-967.

Sempere LF, Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Berger EM, Ambros V e Ros A. 2002. The expression of the let-7 small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. Developmental Biology 244 (1):170-179.

Sernpere LF, Sokol NS, Dubrovsky EB, Berger EM e Ambros V. 2003. Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and Broad-complex gene activity. Developmental Biology 259 (1):9-18.

Severson DW, Williamson JL e Aiken JM. 1989. Caste-specific transcription in the female honey bee. Insect Biochemistry 19: 215-220.

Siemering KR, Golbik R, Sever R e Haseloff J. 1996. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. Current Biology 6 (12):1653-1663.

Soares CAG, Lima CMR, Dolan MC, Piesman J, Beard CB e Zeidner NS. 2005. Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the isac gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. Insect Molecular Biology 14 (4):443-452.

Snodgrass RE. 1984. Anatomy of the honey bee. Cornell University, London.

Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB e Cohen SM. 2005. Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. Cell 123 (6):1133-1146.

Sullivan JP, Jassim O, Fahrbach SE e Robinson GE. 2000. Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. Hormones and Behavior 37 (1):1-14.

Sullivan JP, Fahrbach SE, Harrison JF, Capaldi EA, Fewell JH e Robinson GE. 2003. Juvenile hormone and division of labor in honey bee colonies: effects of allatectomy on flight behavior and metabolism. Journal of Experimental Biology 206 (13):2287-2296.

Tarpy DR. 2003. Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 270 (1510):99-103.

Timmons L e Fire A. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. Nature 395 (6705):854–854.

Toth AL e Robinson GE. 2007. Evo-devo and the evolution of social behavior. Trends in Genetics 23 (7):334-341.

Tracey-Patte PD, Kemp DH e Johnston LAY. 1987. *Boophilus microplus* - passage of bovine immunoglobulins and albumin across the gut of cattle ticks feeding on normal or vaccinated cattle. Research in Veterinary Science 43 (3):287-290.

Trenczek T e Engels W. 1986. Occurrence of vitellogenin in drone honeybees (*Apis mellifica*). International Journal of Invertebrate Reproduction and Development 10 (3):307-311.

Trenczek T, Zillikens A e Engels W. 1989. Developmental patterns of vitellogenin hemolymph titer and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Insect Physiology 35 (6):475-481.

Vermunt AMW, Kamimura M, Hirai M, Kiuchi M e Shiotsuki T. 2001. The juvenile hormone binding protein of silkworm haemolymph: gene and functional analysis. Insect Molecular Biology 10 (2):147-154.

Visscher PK. 1983. The honey bee way of death - necrophoric behavior in *Apis mellifera* colonies. Animal Behaviour 31:1070-1076.

von Frisch K. 1967. Honeybees: Do they use direction and distance information provided by their dances? Science 158:1072-1075.

Wheeler DE e Kawooya JK. 1990. Purification and characterization of honey bee vitellogenin. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 14 (4):253-267.

Wheeler DE, Buck N e Evans JD. 2006. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. Insect Molecular Biology 15 (5):597-602.

Wilfert L, Gadau J e Schmid-Hempel P. 2007. Variation in genomic recombination rates among animal taxa and the case of social insects. Heredity 98 (4):189-197.

Winston ML. 1987. The honey bee colony: life history. In: The hive and the honey bee (Graham JM, ed.) Dadant & Sons-Hamilton, Illinois.

Wirtz P e Beetsma J. 1972. Induction of caste differentiation in honeybee (*Apis mellifera*) by juvenile hormone. Entomologia Experimentalis Et Applicata 15 (4):517-520.

Wirtz P. 1973. Differentiation in the honey bee larvae. Meded. Landbouwhoogeschool, Wageningen 73-75:1-155.

Zambon RA, Vakharia VN e Wu LP. 2006. RNAi is na antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. Cellular Microbiology 8 (5): 880-889.

Zhang JZ, Saleh DS e Wyatt GR. 1996. Juvenile hormone regulation of an insect gene: a specific transcription factor and a DNA response element. Molecular and Cellular Endocrionology 122:15-20.

Zhou S, Zhang J, Hirai M, Chinzei Y, Kayser H, Wyatt GR e Walker VK. 2002. A locust DNA-binding protein involved in gene regulation by juvenile hormone. Molecular and Cellular Endocrionology 190 (1-2):177-185.

Ziegler R e Van Antwerpen R. 2006. Lipid uptake by insect oocytes. Insect Biochemistry and Molecular Biology 36 (4):264-272.

APÊNDICE

Insect Molecular Biology (2006) **15**(5), 703–714

Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality

OnlineOpen: This article is available free online at www.blackwell-synergy.com

A. S. Cristino*, F. M. F. Nunes†, C. H. Lobo†, M. M. G. Bitondi§, Z. L. P. Simões§, L. da Fontoura Costa¶, H. M. G. Lattorff, R. F. A. Moritz**, J. D. Evans†† and K. Hartfelder‡**

**Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; †Departamento de Genética and ‡Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; §Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; ¶Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil; **Institut für Biologie, Molekulare Ökologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany; ††Bee Research Laboratory, USDA-ARS, BARC-F, Beltsville, MD, USA*

Abstract

The honey bee queen and worker castes are a model system for developmental plasticity. We used established expressed sequence tag information for a Gene Ontology based annotation of genes that are differentially expressed during caste development. Metabolic regulation emerged as a major theme, with a caste-specific difference in the expression of oxidoreductases vs. hydrolases. Motif searches in upstream regions revealed group-specific motifs, providing an entry point to *cis*-regulatory network studies on caste genes. For genes putatively involved in reproduction, meiosis-associated factors came out as highly conserved, whereas some determinants of embryonic axes either do not have clear orthologs (*bag of marbles*, *gurken*, *torso*), or appear to be lacking (*trunk*) in the bee genome. Our results are the outcome of a first genome-based initiative to provide an annotated framework for trends in gene regulation during female caste differentiation (representing developmental plasticity) and reproduction.

Keywords: caste development, oogenesis, meiosis, UCR motifs, AlignACE.

Received 20 April 2006; accepted after revision 17 July 2006. Correspondence: Klaus Hartfelder, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, Brazil. Tel.: +55 16 36023063; fax: +55 16 36331786; e-mail: klaus@fmrp.usp.br

Re-use of this article is permitted in accordance with the Creative Commons Deed, Attribution 2·5, which does not permit commercial exploitation.

Introduction

The evolution of social organization in the Hymenoptera is intricately linked to the division of reproductive activities between highly fertile queens and functionally sterile workers (Wilson, 1971). Ontogenetically, these alternative phenotypes primarily reflect the differential feeding of larvae, a mechanism that is especially pronounced in the honey bee, *Apis mellifera*. Queen-destined larvae are fed large amounts of royal jelly during the entire larval feeding phase, whereas larvae destined to become workers receive an altered diet during the last larval instars (Haydak, 1970). This differential feeding program, in turn, acts on the endocrine system where it generates caste-specific signatures in juvenile hormone (JH) and ecdysteroid titres (Hartfelder & Engels, 1998; Rachinsky *et al.*, 1990). These metamorphic hormones are part of the endocrine programme that drives morphogenesis into either of the two alternative pathways.

The major differences between an adult honey bee queen and a worker reside in the reproductive system. A queen usually has close to 200 ovarioles per ovary and is capable of producing several hundred eggs per day. Workers in contrast have between two and 12 ovarioles per ovary (Snodgrass, 1956), which do not show signs of ongoing oogenesis as long as the queen is present. If the queen is lost, a number of workers can activate their ovaries and produce haploid eggs that will develop into drones (Kropácová & Haslbachová, 1971; Page & Erickson, 1988; Moritz *et al.*, 1996).

In order to come to an understanding of the molecular nature and the signal transduction pathways underlying these developmental and ovary activation signals, differential gene expression profiling in honey bee caste development

© 2006 The Authors
Journal compilation © 2006 The Royal Entomological Society

was initiated in the late nineties. The main body of currently available data resulted from a cDNA library generated by suppression subtractive hybridization (SSH) that contrasted queen and worker larvae (Evans & Wheeler, 1999). Subsequent macroarray analyses (Evans & Wheeler, 2000) revealed a clustering of these expressed sequence tags (ESTs) into three distinct groups: genes overexpressed in young (bipotent) larvae, genes overexpressed in fifth-instar queen larvae, and genes overexpressed in fifth-instar worker larvae. A second study focusing on oxidative metabolism identified a set of differentially expressed mitochondrial genes (Corona *et al.*, 1999). The third approach was a DDRT-PCR screen for hormone responsive genes to investigate the mode of action of ecdysteroids in the differentiation of the larval ovary (Hepperle & Hartfelder, 2001). Many of these EST sets could not be properly annotated at that time, either because of a limited number of fully sequenced insect genomes, or because the libraries contained large numbers of transcripts in 3′-gene regions, including poorly conserved untranslated regions (UTRs). The draft assembly for the honey bee genome (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) now permits a much more reliable annotation of this unique set of experimentally validated genes.

Reproductive activity of honey bees is determined in a two-step process. The basic differences in reproductive capacity between queen and workers manifest themselves during larval development by a wave of programmed cell death that leads to the destruction of over 95% of the ovariole primordia in the larval ovary of workers (Schmidt-Capella & Hartfelder, 1998). In the adult life cycle of each caste, the co-ordinated flux of egg production through previtellogenic and vitellogenic growth will require the activity of other sets of genes. Some of these act as determinants of the major egg and also embryonic axes. As the fruit fly is the most well developed insect model for axis determination (St Johnston & Nüsslein-Volhard, 1992), and maternal factors have not yet been functionally characterized in the honey bee, searching the genome assembly (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) provides the first major opportunity to explore putative patterning networks in honey bees.

The vitellogenic growth phase of the honey bee oocyte has long been the centre of attention as a means of describing differential fertility of the female castes (Engels, 1974). The synthesis of large amounts of vitellogenin by the queen fat body is intimately related to her high reproductive rate. The equally high vitellogenin titres in haemolymph of nonreproducing young worker bees, however, have been an enigma as their ovaries are inactive in the presence of the queen. Vitellogenin expression has apparently become uncoupled from oocyte growth during the evolution of the sterile worker caste and has acquired secondary functions. It became involved in the production of royal jelly (Amdam *et al.*, 2003) and in the regulation of worker lifespan (Amdam *et al.*, 2004) through an inhibitory effect on the endocrine system (Guidugli *et al.*, 2005). Along with such unique life-history traits related to socially organized reproduction, honey bees also promise to answer new questions involving meiosis, as the honey bee genome exhibits recombination rates that exceed those of all other higher organisms (Hunt & Page, 1995; Solignac *et al.*, 2004) and as honey bee males, being haploid, forego meiosis I in producing gametes.

The honey bee genome sequence database (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) has become an extremely valuable resource not only for comparative genomics, but also for functional genomics. One of the oldest, and for evolutionary biologists most challenging question in social insect biology is the development of a reproductive and a nonreproductive caste (Darwin, 1859). Apart from its implications on evolutionary theory in terms of kin selection (Hamilton, 1964), this is essentially a question of how developmental pathways diverge to shape distinct phenotypes, and how oogenesis is regulated to achieve levels of extremely high (queen) and extremely low (worker) fertility.

The annotation of genes related to caste development and differential reproduction in the honey bee has implications well beyond this species. It represents the first genome-wide annotation of a molecular architecture behind reproductive division of labour. In the light of current discussions on the importance of alternative phenotypes in the evolution of novelties (West-Eberhard, 2003) the honey bee genome information is certainly one of the most valuable resources. In the present manuscript we delineate a strategy on how to transcend from a straightforward gene annotation approach to functional studies based on motif analysis of upstream regulatory regions.

Results and discussion

From caste to BLAST: differentially expressed genes in caste development

The full list of genes that are overexpressed in fifth-instar queen or worker larvae, is made available online in the Supplementary material (Table 1S). This list includes scaffold number, corresponding EST number(s), GLEAN3-predicted protein sequence, similarity and identity indices to corresponding *Drosophila melanogaster* orthologs, as well as protein domain information (Pfam).

A general result was that a relatively large subset of genes (nine of 34) overexpressed in honey bee queen larvae is represented by putative *Drosophila* orthologs for which no Gene Ontology (GO) term for Biological Process is indicated in Flybase. In contrast, all worker genes correspond to functionally relatively well-defined *Drosophila* genes. Even when taking into consideration the conceptual limits in attributing GO terms on biological process from *Drosophila* orthologs to honey bee genes, this finding could have a bearing on basic questions in socioevolution,

© 2006 The Authors

namely, which caste is the novelty, the queen or the worker(s)? Phrased in other terms, the genome sequence information now permits to address at a molecular level questions that are fundamental to understand the role of (and evolutionary trends in) ontogenetic processes that structure insect societies, especially in hymenopterans. Such basic questions are (1) how many degrees of freedom (or release from constraints) may actually have been gained from splitting the functions normally performed by a solitary ancestral hymenopteran female into two or more castes, and (2) how was this release from constraints integrated into postembryonic differentiation processes to generate truly alternative phenotypes. A second observation of potential interest to functional genomics was that a relatively large subset of the caste-related genes maps to chromosome 2 (seven of 51 unique sequences).

Most genes in the caste gene list are represented by one or two EST hits, except for a predicted *hexamerin 70b* gene (GB10869-PA). This gene was evidenced by 10 ESTs, one in a 5′-located exon and nine in the 3′ region (five ESTs comprising parts of exon 7 and parts of the 3′-UTR, the other four ESTs landing in exons 6 and 7). The macroarray data (Evans & Wheeler, 2000) established this gene as overexpressed in the worker caste. Hexamerins are an important class of storage proteins that show interesting expression patterns related to caste and reproduction in many social insects (Martinez *et al.*, 2001; Hunt *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2006a,b). A cDNA encoding the honey bee Hexamerin 70b subunit has recently been cloned and sequenced (Cunha *et al.*, 2005), and hormone manipulation experiments showed that the abundance of *hexamerin 70b* transcripts in larval development is positively correlated with high levels of JH and ecdysteroids. This could actually reflect a regulatory feedback function in JH titre regulation, as exemplified in the termite *Reticulitermes flavipes*, where the Hex1/Hex2 ratio controls JH availability for caste-specifically differentiating tissues (Zhou *et al.*, 2006b).

Within the honey bee caste genes for which GO information was imported and deduced from their *Drosophila* orthologs we noted a predominance of terms clustering as 'cellular physiological process' (95%; GO:0050875) and 'metabolism' (90%; GO:0008152) in the 'Biological Process' (GO:0008150) category (Fig. 1A). GO-statistics differences between queens and workers became apparent in terms clustering as 'cell differentiation' (0% for queen and 28.5% for workers; GO:0030154) and 'metabolism' (96% for queen and 78.5% for worker; GO:0008152) in the 'Biological Process' (GO:0008150) (Fig. 2A).

With respect to 'Molecular Function' (GO:0003674), most terms were related to mRNA translation ('nucleic acid binding' (38%; GO:0003676), 'structural constituent of ribosome' (24%; GO:0003735), 'protein binding' (12%; GO:0005515), 'nucleotide binding' (12%; GO:0000166), 'translation factor activity, nucleic acid binding' (7%; GO:0008135). Further important terms were 'oxidoreductase activity' (19%; GO:0016491) and 'hydrolase activity' (16.5%; GO:0016787) (Fig. 1B). For these latter two terms we noted potentially interesting differences related to caste, with 'hydrolase activity' being overrepresented by worker transcribed genes, whereas 'oxidoreductase activity' was exclusively represented by queen genes (Fig. 2B). Even though these GO assignments on Molecular Function are based on evidence from *D. melanogaster*, without experimental evidence for *Apis mellifera*, the corresponding genes are well conserved in sequence and show the

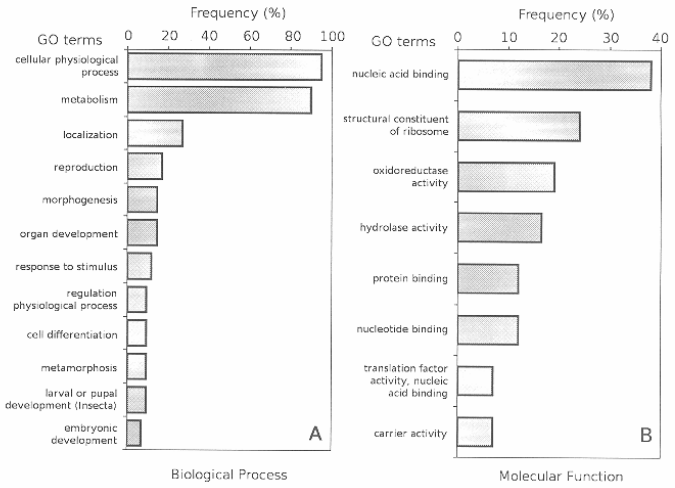

Figure 1. Dominant gene ontology terms for (A) Biological Process and (B) Molecular Function in honey bee genes with an experimentally validated caste-specific expression pattern during the last larval instar. The graph was generated by a FatiGO analysis set at level 3. Frequencies indicate the appearance of GO terms in the total set of queen and worker differentially expressed genes.

© 2006 The Authors

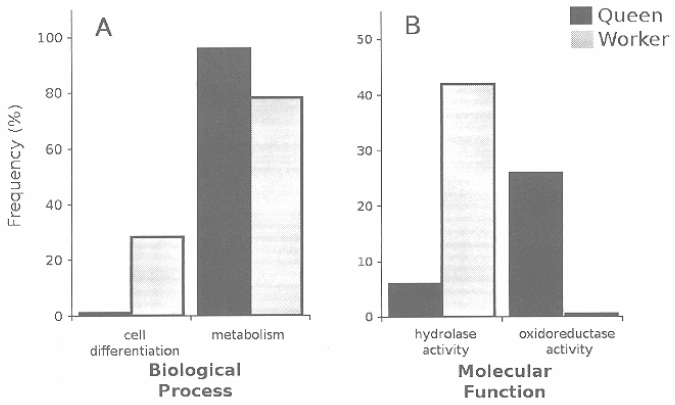

Figure 2. Gene Ontology categories with caste-specific expression patterns for Biological Process (A). Genes classified as part of cell differentiation processes are significantly overexpressed in workers, whereas genes related to metabolism are overexpressed in queen larvae. In the Molecular Function categories (B) we observed an apparent split indicating differential enzyme preferences in queens (overexpress oxidoreductases) and in workers (overexpress hydrolases). The graph was generated by a FatiGO analysis set at level 3. Frequencies indicate the appearance of GO terms in the queen (black bars) and worker differentially expressed genes (grey bars).

relevant protein domains (Supplementary material, Table 1S), and thus, are indicative of functional trends.

In general terms, the caste-specific separation into metabolic pathway preferences, oxidoreductases vs. hydrolases, may reflect the switch in diet that a worker larva experiences during the fourth and fifth larval instar. This represents a switch from a protein/lipid-rich diet to a more carbohydrate-rich diet (Haydak, 1970), and this switch apparently is accompanied by an increase in the expression of genes coding for proteins with hydrolase activity. Similar switches in gene expression patterns have recently been reported for *D. melanogaster* in an experiment where larvae were shifted from a cornmeal diet to a banana diet (Carsten *et al.*, 2005), resulting in the up- or downregulation of 55 genes of a test population of 6000. Among these are five genes with dehydrogenase/oxidoreductase activity. These parallels in dietary switch responses are indicative of conserved coregulated gene networks. An open question is, of course, how these can be co-opted to generate different phenotypes, such as the castes of social insects. In this respect, social insects clearly go a big step beyond the simple metabolic switch response seen in *Drosophila*. They have apparently incorporated divergent metabolic regulation into a network architecture consistent with morphogenetic differentiation. This required that metabolic regulation became integrated through the endocrine system with developmental patterning processes.

The importance of metabolic regulation on caste development has also come to light in a recent Representational Difference Analysis (RDA) study on caste development in the highly eusocial stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Judice *et al.*, 2006). This is particularly interesting because in this genus, caste development is thought to be based on a genetic predisposition (Kerr, 1950). Metabolic regulation may, thus, be a *sine qua non* for caste development, and caste-specific metabolic pathways may be set in motion rather independently of the nature of the initial switch (nutritional or genetic). The question of how this metabolic switch may integrate with the resultant endocrine signature characteristic for each caste is still a widely open field, but, recent studies in *Drosophila* showing an interaction between ecdysone and insulin signalling in the determination of body size (Colombani *et al.*, 2005; Mirth *et al.*, 2005) may provide a lead.

This is also the point to reflect on how justified it is to heuristically rely on *Drosophila* orthologs and to use their GO attributes in a developmental context (caste differentiation) that has no parallel in *Drosophila*. A recent gene expression profiling study in the ant *Camponotus festinatus* employing a microarray set-up of 384 clones showed significantly different expression levels for larval vs. adult ants in 91 genes (21 confirmed by qRT–PCR), including an *Apis hexamerin 70b* ortholog (Goodisman *et al.*, 2005). When comparing the temporal expression patterns of these ant genes with expression profiles for their respective *Drosophila* orthologs (Arbeitsman *et al.*, 2002) relatively little accord was noted for the two species, leading to the suggestion that these genes may have taken on distinct functions due to the long divergence time between dipterans and hymenopterans (Goodisman *et al.*, 2005). Differences aside, these examples show that in practically all studies on large-scale functional considerations in gene expression, we are strongly wedded with *Drosophila*, and even though functional divergence in orthologs may have occurred, there is little experimental gene-by-gene evidence available for any of the major insect orders outside of Diptera.

Functional studies are clearly profiting from the now available honey bee genome sequence, as evident from the increasing number of RNAi experiments in honeybees (see citations in Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). This is still a small number compared with

© 2006 The Authors

the large-scale RNAi assays established for *Drosophila* (Boutros *et al.*, 2004), but the development of cell culture approaches in the honey bee (Bergem *et al.*, 2006) represents a step in this direction.

Alternatively, regulatory functional associations between genes and their integration into networks can be inferred from the presence of response elements in upstream control regions. In our analysis of differentially expressed genes in queen-worker development we took a bioinformatics approach for a first look into the molecular architecture of a developmental polyphenism.

Table 1. Kolmogorov–Smirnov analysis of ROC AUC and MNCP metric for statistical significance of putative regulatory motifs in upstream control regions of genes with queen or worker-specific expression patterns. These motifs were contrasted with a random set of motifs detected in a random set of UCRs of GLEAN3-predicted honey bee genes.

Group pairs	ROC AUC	MNCP
Random × (Queen + Worker)	$P > 0.1$	$P < 0.001$
Random × Queen	$P > 0.1$	$P < 0.005$
Random × Worker	$P > 0.1$	$P < 0.001$
Queen × Worker	$P < 0.1$	$P > 0.1$

Motif search in upstream regions of differentially expressed genes

The genes related to caste development are among the first honey bee genes for which experimentally validated expression data were generated (Corona *et al.*, 1999; Evans & Wheeler, 1999, 2000; Hepperle & Hartfelder, 2001; Guidugli *et al.*, 2004). Certainly, these 51 genes do not comprise all the genes involved in caste development but they are expected be prominent players as they were the ones that stood out in the SSH and DDRT-PCR approaches. The 51 caste genes do not represent gene families but rather fall into many very different molecular function categories. This made us ask whether the observed overexpression pattern of different genes in either queen or worker larvae may be associated with the occurrence of specific regulatory motifs in the upstream control regions (UCR) of these genes.

Three different algorithms, AlignACE (Roth *et al.*, 1998), MEME (Bailey & Elkan, 1995) and MDscan (Liu *et al.*, 2002) were used to construct a pipeline for detecting overrepresented motifs in the two unaligned sets of UCR sequences for the caste-specifically expressed genes. This pipeline was run on a 'top-10' set of 12 genes (six for each caste), which showed the most pronounced caste differences in expression (Evans & Wheeler, 2000) and also on a randomly selected set of UCRs (background control). We calculated four different metrics for each motif: MAP score (Roth *et al.*, 1998), a group-specificity score (Church score) (Hughes *et al.*, 2000), and a ROC AUC and MNCP metric (Clarke & Granek, 2003). A first set of filters was used to detect motifs with a potential for regulatory functions (MAP score ≥ 5; ROC AUC ≥ 0.7). This resulted in 46 motifs out of 123 total UCR motifs found in the queen UCR set and in 71 motifs out of 261 total found in the worker UCR set (Supplementary material, Table 2S).

A parametric statistical test (MANOVA; $P = 0.0001$; Wilks' = 0.78; $F = 7.2$) and a nonparametric statistical test (Kolmogorov–Smirnov; Table 1) on ROC AUC and MNCP indices showed that these two sets of filtered motifs are significantly different from a randomly selected set of motifs. The rank-order metrics, ROC AUC and MNCP, have previously been used to compare the association of short regulatory sequence features with gene expression data (microarray analyses on coregulated genes) and they have been useful in flagging false positives erroneously included in 'top-10' sets of differentially expressed genes (Clarke & Granek, 2003).

To select highly specific motifs found in each data set we used the group-specificity score (Church score $\leq 1e^{-05}$; Hughes *et al.*, 2000) to identify the most likely motifs involved in decision making for pathways leading to queen (two motifs, Fig. 3A) or to worker development (12 motifs with Church score $\leq 1e^{-07}$, Fig. 3B). As the SSH and DDRT-PCR approaches on caste development can be expected to retrieve only a subpopulation of such genes, these motifs represent only a partial scenario of the transcriptional regulatory network underlying caste development. The motifs can now be used to screen other GLEAN3-predicted genes to integrate a candidate list of putatively coregulated genes in caste development that can be submitted to further experimental validation.

Each motif found in UCRs of queen (46) and worker (71) overexpressed genes was compared with the entire set of *D. melanogaster cis*-regulatory motifs contained in the TRANSFAC database (version 4.0; Wingender *et al.*, 2000). Only alignments passing 80% identity for each position-specific site matrix (PSSM) were considered as significant matches. Whereas none of the most specific motifs for each caste showed similarity to any of the *D. melanogaster* motifs, some of the more ubiquitous ones did resemble binding sites of transcription factors, such as *Antennapedia, Ultrabithorax, zerknüllt, even skipped, trithorax-like, tailless, paired, fushi tarazu* and *Adh transcription factor 1* (Supplementary material, Table 2S).

When we plotted the positions of the two queen and the 12 worker motifs in the UCRs of the caste-specifically expressed genes (Fig. 4) an interesting pattern emerged for the worker-specific motifs. Some of the worker motifs appeared to be clustered and occurring in tandem; furthermore, they were positioned relatively close to the predicted translation start sites in some of the genes that are overexpressed during worker development (annotation results of these genes are listed in Supplementary material, Table 1S). A position close to the predicted translation start

© 2006 The Authors

(A) Queen

Motif	MAP	Church	ROC_AUC	MNCP	Motif consensus
Q1	5.50	1.37e-07	0.82	208.38	
Q2	5.27	2.57e-05	0.95	19.20	

(B) Worker

Motif	MAP	Church	ROC_AUC	MNCP	Motif consensus
W1	12.79	5.32e-10	0.74	113.04	
W2	11.39	5.32e-10	0.74	97.89	
W3	8.93	5.32e-10	0.83	237.48	
W4	7.04	5.32e-10	0.83	227.58	
W5	9.31	5.32e-10	0.90	118.10	
W6	9.86	5.32e-10	0.74	334.61	
W7	15.86	5.59e-10	0.74	206.11	
W8	8.55	1.37e-07	0.82	77.90	
W9	7.44	1.37e-07	0.90	35.16	
W10	13.83	1.37e-07	0.74	169.79	
W11	11.09	1.37e-07	0.83	184.30	
W12	10.59	1.37e-07	0.74	68.93	

Figure 3. Putative regulatory motifs and their consensus sequences in UCRs of queen and worker overexpressed genes. Scores for MAP, Church, ROC AUC and MNCP metrics indicate degree of group specificity and significance level.

sites is generally taken as a sign of strong regulatory effect (Davidson, 2001).

As caste development is highly dependent on changes in haemolymph titres of JH and ecdysteroids we also screened the UCRs of the differentially expressed genes for putative nuclear receptor binding sites. Regulatory elements involved in the JH response are not well understood yet, so any prediction in this direction would be elusive (Wheeler & Nijhout, 2003). Functional ecdysone response elements (EcRE) have, however, been identified and it is now well established that the EcR/USP complex binds to direct or inverted (palindromic) repeats (Riddihough & Pelham, 1987; Antoniewski *et al.*, 1995; Perera *et al.*, 2005). A PSSM search (Wassermann & Sandelin, 2004) based on a canonical representation (rGkTCAaTGamcy) (Perera *et al.*, 2005) did not reveal any putative EcRE motif in the UCRs of the 51 caste-differentially expressed genes. However, this does not rule out that these genes respond to changes in JH and/or ecdysteroid titres as these hormones require EcR/USP binding primarily in the expression of early genes, but not necessarily for the late response genes (Li & White, 2003; Sullivan & Thummel, 2003).

In conclusion, the predictions from such a combined strategy that searches for group-specific and for conserved regulatory motifs in GLEAN3 predicted honey bee genes

© 2006 The Authors

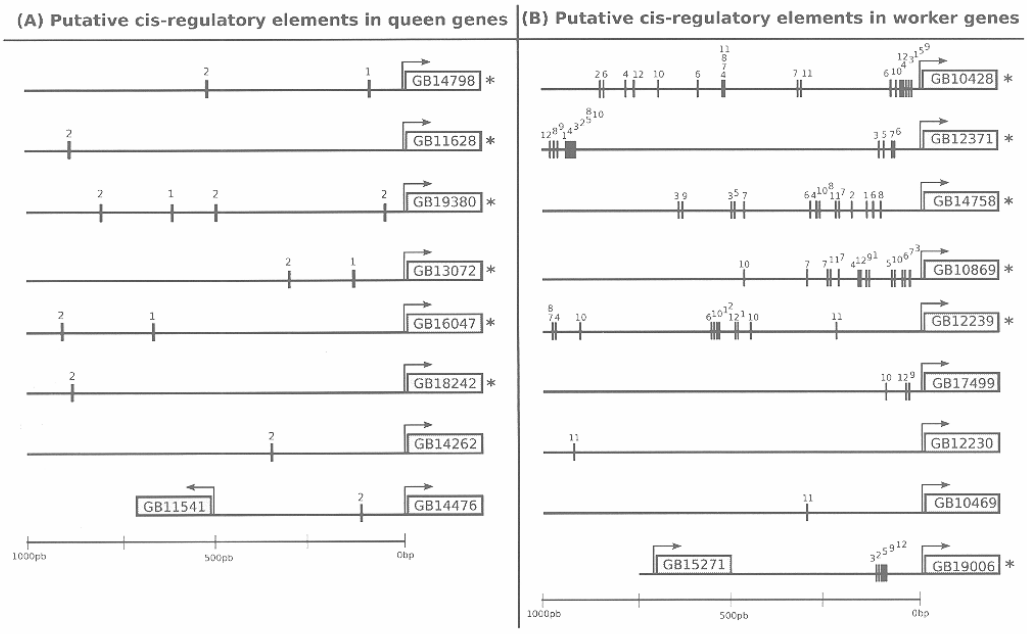

Figure 4. Map of the group-specific motifs found in queen and worker UCRs of caste-specifically expressed genes. The coding region is represented by the GLEAN3 prediction number (assembly 4.0) with arrows indicating the translation start site. Asterisks mark UCRs of the 'top10' set used to find the over-represented motifs.

represents a major transition from nonhypothesis-driven high-throughput screens to hypothesis-driven searches for context-dependent gene expression in honey bees. Such directed search results can serve as a platform for experimental analyses of genome-wide integration in hormonal control of caste development in bees. In addition, this study exemplifies how existent algorithms for detecting shared regulatory motifs can be joined into a toolkit for predicting coregulated gene expression patterns in honey bees. These methods have been shown to be robust and are gaining acceptance for use in functional and comparative genomics (Liu *et al.*, 2004; Pritsker *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005).

Oogenesis and reproduction

As caste development sets the stage for reproductive division of labour, genes involved in reproductive processes are strong candidates for functional analyses. In the present study we performed BLAST searches to identify honey bee orthologs for a list of 32 fly genes with the GO attribute 'oogenesis' and for four genes specifically related to 'vitellogenesis'. The list for fly genes involved in nuclear events in germ cells consisted of 20 genes for 'female meiosis', 12 genes for 'recombination' and 21 genes under the heading 'chromosome segregation including segregation distortion' (Supplementary material, Table 3S). In some cases, these GO attributes for fly genes, of course overlapped.

BLASTN and BLASTX searches for these fly genes against the honey bee genome assembly 3.0 and the GLEAN3 Official Set (aa) retrieved statistically well supported putative bee orthologs for most of these candidates. For the genes involved in meiosis, recombination and chromosome segregation this finding, although not unexpected, is of interest as meiosis in the haploid honey bee drone is strongly modified when compared with a normal diploid meiosis. The first meiosis is initiated but the nucleus remains undivided and only the superfluous centrioles are eliminated as cytoplasmatic buds (Hoage & Kessel, 1968). An interesting gene, thelytoky (*th*), has recently been mapped in this context (Lattorff *et al.*, 2005). It prevents almost completely meiotic recombination in the automixis of laying workers of the Cape honey bee. As an indication of the interplay between meiosis and later development, this locus also appears to be an integral part of various gene cascades involved in caste determination (Lattorff *et al.*, 2006).

The fly genes retrieved in the GO searches for 'oogenesis' represent a much larger range of Molecular Function categories, such as transcription factors, proteins regulating

© 2006 The Authors

translation by RNA binding, RNA helicases, enzymes (ubiquitination, transfer of sugar residues, sulfotransferase), GTPase activity, and several factors binding to cytoskeletal proteins (Supplementary material, Table 3S). This wide range of functional categories is expected as these genes are involved in a series of different steps during oogenesis in the polytrophic meroistic ovary. Oogenesis starts out with the maintenance of germline and somatic stem cell identity in the germline niche in the upper germarium. A key gene involved in this process is *pumilio* (Forbes & Lehmann, 1998), which is represented by a highly conserved bee ortholog, GB10504-PA. The second step is the formation of germ cell cysts, the determination of an oocyte within each cyst, and the survival of these cysts, involving genes such as *benign gonial cell neoplasm* (Lin *et al.*, 1994), *encore* (Hawkins *et al.*, 1996), *ovo* and *ovarian tumour* (*otu*) (Staab & Steinmann-Zwicky, 1995), all well conserved in the honey bee genome. Interestingly, we could not find a clear bee ortholog for *bag of marbles* (*bam*), which is one of the prime early response genes in the cystoblast differentiation pathway in *Drosophila* (McKearin, 1997).

The third step comprises previtellogenic growth of the follicle, and during these stages a number of maternal factors are deposited and anchored either within the oocyte or in the perivitelline space that define the egg and the future embryonic axes (for review see, St Johnston & Nüsslein-Volhard, (1992). In the list of *Drosophila* genes involved in early steps of axis determination a couple of surprises came up in the search for honey bee orthologs. A big surprise was that we could not find a *gurken* ortholog in the bee, even though this gene sets up both the anterior–posterior and dorsal–ventral axes in the *Drosophila* egg (González-Reyes *et al.*, 1995), whereas downstream components of the Gurken signalling cascade appear to be preserved in the bee genome (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). Similar apparent gaps in constituents of patterning cascades were noted for the terminal regions of the embryo, such as a lack of a *torso* ortholog, whereas its ligand, *torso-like*, is represented by a well conserved ortholog in the bee (GB18663-PA).

With respect to genes involved in the final processes of oogenesis we primarily looked at genes that play a part during vitellogenesis. There are four genes of interest in this class, the primary one coding for the yolk protein precursor vitellogenin. This gene has already been sequenced for the honey bee (Piulachs *et al.*, 2003) and, as expected, it is much more related to vitellogenins of other insects and even vertebrates than to the *Drosophila* yolk proteins, which apparently are derived from lipases (Hagedorn *et al.*, 1998). The second gene of interest is the bee ortholog to *yolkless*, as this (GB16571-PA) could represent a putative vitellogenin receptor. The other two *Drosophila* genes with clear orthologs in the bee are CG18641 and CG12139, which code for a lipase and an LDL receptor, respectively.

General conclusions

The current analysis made use of previous experimental analyses on differential transcription during caste development of honey bee larvae. In the annotation of these genes, which includes references to Gene Ontology terms associated with their respective *Drosophila* orthologs, two major configurations emerged. First of all, worker genes were better defined in terms of GO attributes, compared with the relatively large number of queen genes that had no GO terms associated to their respective *Drosophila* orthologs. Even when taking into consideration the conceptual limits in attributing GO terms on molecular function and biological process from *Drosophila* orthologs to honey bee genes, this finding could have a bearing on general basic questions in socioevolution, namely, which caste is more divergent from a nonsocial reproductive female bee prototype or reproductive ground plan, the queen or the worker? Less speculative is the second major conclusion coming out of the GO analysis for Molecular Function, showing and confirming (Eder *et al.*, 1983; Corona *et al.*, 1999) the important role of metabolic regulation in caste development. This facet is demonstrated especially clearly in the caste-specific expression of oxidoreductases (queen) vs. hydrolases (workers).

The honey bee genome information provided not only a much improved annotation platform for caste-specifically expressed ESTs, but, even more so, opens the possibility to explore putative regulatory features of the honey bee genome. In the current study we employed modified Gibbs sampling and expectation-maximization algorithms (AlignACE, MDScan, MEME) to detect group-specific motifs in gene regions up to 1000 bp upstream of translation start sites. We detected 14 motifs that were significantly over-represented in the caste genes, when compared with corresponding motifs found in a random set of GLEAN3-predicted honey bee genes. The localization of such motifs in UCRs of worker-overexpressed genes revealed a clustering of such motifs close to the predicted basal promotor regions suggesting strong regulatory effects. Such search strategies and the detected motifs can provide the lead to reveal and unravel *cis*-regulatory networks for and within specific contexts of honey bee biology.

Caste polyphenism in social insects makes a strong case for the emergence of novelties at a microevolutionary level (West-Eberhard, 2003). Without the pretension to discuss exhaustively the mechanisms underlying this surge of developmental plasticity, two major themes become apparent in this and other studies. Regulatory change has been demonstrated in the shut-down of wing disc patterning cascades in ants (Abouheif & Wray, 2002) and is certainly also implicit in observed temporal changes in gene expression during postembryonic development of ants and bumble bees (Goodisman *et al.*, 2005; Pereboom

© 2006 The Authors

et al., 2005). Such change would be expected to involve *cis*-regulatory elements, that is, change in transcription factor binding sites in UCRs, as approached in this study, and also evolutionary change in response thresholds to circulating morphogenetic hormones (for review see, Hartfelder & Emlen, 2005). The second and quite unexpected theme is the acquisition of new systemic functions by evolutionary rather old proteins, such as vitellogenin and hexamerins. These apparently unspectacular proteins have evolved into key players for caste evolution and reproductive division of labour via novel regulatory connectivity with JH (Amdam *et al.*, 2004; Guidugli *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006a,b).

Experimental procedures

Selection and annotation of ESTs representing differentially expressed genes in honey bee caste development

The starting point were 164 entries (mainly 3′-ESTs) in GenBank (BG101532–BG101697) from an SSH library (Evans & Wheeler, 1999; Evans & Wheeler, 2000). When validated by macroarray analyses, a clustering into three major classes became apparent: (I) genes overexpressed in young larvae; (II) genes overexpressed in last instar queen larvae; and (III) genes overexpressed in last instar worker larvae. For this study we excluded the class I ESTs because their expression is not caste-specific, but rather represents expression differences between young (still bipotent) and older larvae. To the class II queen ESTs (82) we added one complete cDNA entry (AY601642) from a DDRT-PCR screen (Corona *et al.*, 1999), and to the class III set of worker ESTs (40) we added seven GenBank dbEST entries (BG149167–BG149173) from a DDRT-PCR screen on ovary development (Hepperle & Hartfelder, 2001).

The EST sequences were submitted to BLASTN searches (parameters: -G 2 -E 3 -W 15 -F 'm D' -U -e 1e-20) against genome sequence assembly Amel_v3.0 to retrieve matches in linked or unlinked genomic contigs and to exclude no-matches (seven ESTs in queen). ESTs that aligned within the same scaffold were checked for clustering and overlap. This clustering also served to exclude genes that were represented by non-overlapping ESTs from both castes. This procedure generated a set of 51 unique putative gene sequences overexpressed in either queen (34) or in worker larvae (17). These 51 nonredundant sequences were submitted to BLASTX searches against the Official Set of GLEAN3-predicted protein sequences (cut-off value at $1e^{-20}$). For ESTs with no significant protein sequence matches, the genomic regions adjacent to the mapped EST were searched to find neighbouring ORFs, especially those nearest to putative 3′ UTRs of predicted proteins, as the EST libraries have a bias in this direction.

Official Set protein sequences were aligned against Amel_v3.0 sequence assembly using TBLASTN to map protein to genome and subsequently, they were aligned using BLASTP against the GenBank nonredundant (nr) and the Flybase protein sequence databases. The manual features annotation procedure of the Artemis 7.0 program (Rutherford *et al.*, 2000) was used to map ORFs, putative splice sites of exons and ESTs to genome coordinates. The final annotation file was generated with a Python script in GFF format (http://www.sanger.ac.uk/Software/formats/GFF/).

Honey bee sequences annotated as orthologs to *D. melanogaster* genes were putatively assigned the GO terms listed in the respective Flybase entry. In addition, the definition of new GO terms (Biological Process ontology) related to caste development and polyphenism (GO:0048651 and GO:0048650, respectively) was co-ordinated with the Gene Ontology Consortium (Ashburner *et al.*, 2000). The FatiGO web tool (Al-Sharour *et al.*, 2004) was used to cluster GO terms (level 3 setting) for Biological Process and Molecular Function.

For the detection of conserved domains, the 51 protein sequences were screened against the Pfam database (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/) using the HMMER platform (current release 2.3.2, http://hmmer.wustl.edu/), with a cut-off value set at $1e^{-10}$.

Annotation of oogenesis and reproduction genes

In order to identify putative honey bee orthologs to *D. melanogaster* genes we searched the following GO terms in Flybase: 'oogenesis' (GO:0009993), 'vitellogenesis' (GO:0007296), 'female meiosis' (GO:0007143), 'DNA recombination' (GO:0006310), and 'chromosome segregation' (GO:0007059). Genes related to segregation distortion were searched for in Flybase in phenotypic descriptions and mutant effects of *D. melanogaster* genes as this phenomenon is not represented by a GO term. Hence this group may be more heterogeneous than the others. From this list we removed genes of pleiotropic function (multifaceted GO entries in Biological Process) and genes that lacked defined transcripts in the *Drosophila* genome database.

For the GO terms 'oogenesis' and 'vitellogenesis' we performed TBLASTN and BLASTP searches for 42 fruit fly genes against the Amel_v3.0 genome assembly and the GLEAN3-predicted protein sequences (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006), respectively. The orthologous *D. melanogaster* gene was characterized by the same procedure as described above (reciprocal best hit). For the GO terms 'female meiosis', 'DNA recombination', 'chromosome segregation' and the non-GO group 'segregation distortion', transcripts of *D. melanogaster* were searched against nr databases at NCBI using BLASTP. The obtained sequences were searched against the Amel_v3.0 genome assembly and the GLEAN3-predicted protein sequences using TBLASTN. Homologous sequences (threshold $1e^{-10}$) were predicted using the BioEdit software (Hall, 1999). ORFs showing significant homology (BLASTP, threshold $1e^{-20}$) were assembled and used in BLASTP searches against the nr databases at NCBI.

Motif search in upstream regions in caste-specifically expressed genes

In order to detect overrepresented motifs in the upstream control regions (UCRs) of the two sets of caste-related genes we selected gene subsets based on two criteria: (1) those that had shown the highest caste-specificity in the array analyses (Evans & Wheeler, 2000), and (2) those that had a conserved 5′ region when compared with the *Drosophila* orthologs. These 'top10' genes consisted of six queen genes (GB13072, GB11628, GB19380, GB14798, GB16047 and GB18242) and of six worker genes (GB10869, GB12371, GB12239, GB10428, GB19006, GB14758). The motif search was conducted separately on the two sets of UCR sequences using three methods: AlignAce (Roth *et al.*, 1998), MEME (Bailey & Elkan, 1995) and MDscan (Liu *et al.*, 2002). Default parameters values were used in all searches, except that GC content in intergenic regions was set to 25%, representing the background value established for the honey bee UCR database generated in this study.

© 2006 The Authors

The database containing 10,156 UCR sequences was generated by parsing the Official Set annotation file (downloaded in GFF format from http://www.beegenome.hgsc.bcm.tmc.edu/beeftp.html) to extract upstream regions starting from the terminal 5′-genomic coordinate of each predicted CDS. The UCRs were arbitrarily set to a size frame of 1000 nucleotides (Roth *et al.*, 1998), but were trimmed whenever another predicted ORF was detected in any of these regions.

The MAP (maximum a priori log likelihood) score, group specificity score (called Church score in this manuscript) (Hughes *et al.*, 2000), ROC AUC (area under the curve for a receiver-operator characteristic plot) metric and MNCP (mean normalized conditional probability) metric (Clarke & Granek, 2003) were used to detect motifs that most likely correspond to biologically significant *cis*-regulatory elements. The filters ran on the UCRs of the subsets of queen and worker genes were a MAP score cut-off value of 5.0, followed by a ROC AUC cut-off at 0.7, followed by a group specificity score cut-off at $1e^{-05}$. The UCR database of all GLEAN3 predicted honey bee genes was used as the background to calculate these metrics.

A parametric test (MANOVA) and a nonparametric test (Kolmogorov–Smirnov) were conducted to identify significance levels for the two sets of filtered motifs found in the UCRs of caste-specifically expressed genes against filtered motifs found in the random UCR set. Random motifs were sampled from a motif database (10 391 motifs) generated by running our script 100 times with a random sets of UCR sequences.

The main criterion for identifying known regulatory motifs among these caste-specific ones was the alignment of the PSSM for each bee motif with the *Drosophila melanogaster* sequences in the TRANSFAC database (release 4.0) (Wingender *et al.*, 2000). Only the alignments passing a threshold of 80% identity for each PSSM were considered as significant matches. In addition, we checked for a specific binding motif, the EcR/USP motif (rGkTCAaTGamcy-3′), known to function in the expression of genes responding to morphogenetic hormone titres (Perera *et al.*, 2005).

Operating system and programming tools

An Ubuntu Linux (version Breezy) operating system was used to implement all scripts and pipelines designed for annotation procedures and motif discovery. The Python programming language (http://www.python.org/), Biopython (http://www.biopython.org), and TAMO (Tools for Analysis of Motifs) packages (Gordon *et al.*, 2005) were used in program design. Other web applications were built using the Zope application server (http://www.zope.org) hosted at http://zulu.fmrp.usp.br/beelab.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo; 99/00719-6) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; 472963/2-3-1).

References

Abouheif, E. and Wray, G.A. (2002) Evolution of the genetic network underlying wing polyphenism in ants. *Science* **297**: 249–252.

Al-Sharour, F., Diaz-Uriarte, R. and Dopazo, J. (2004) FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* **20**: 578–580.

Amdam, G.V., Norberg, K., Hagen, A. and Omholt, S.W. (2003) Social exploitation of vitellogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 1799–1802.

Amdam, G.V., Simões, Z.L.P., Hagen, A., Norberg, K., Schroder, K., Mikkelsen, O., *et al.* (2004) Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp Gerontol* **39**: 767–773.

Antoniewski, C., O'Grady, M.S., Edmondson, R.G., Lassieur, S.M. and Benes, H. (1995) Characterization of an EcR/USP heterodimer target site that mediates ecdysone responsiveness of the *Drosophila Lsp-2* gene. *Mol Gen Genet* **249**: 545–556.

Arbeitsman, M.N., Furlong, E.E.M., Imam, F., Johnson, E., Null, B.H., Baker, B.S., *et al.* (2002) Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science* **297**: 2270–2275.

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., *et al.* (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genet* **25**: 25–29.

Bailey, T.L. and Elkan, D. (1995) Unsupervised learning of multiple motifs in biopolymers using expectation maximization. *Machine Learning J* **21**: 58–83.

Bergem, M., Norberg, K. and Aamodt, R.M. (2006) Long-term maintenance of in vitro cultured honeybee (*Apis mellifera*) embryonic cells. *BMC Dev Biol* **6**: 17: online.

Boutros, M., Kiger, A.A., Armknecht, S., Kerr, K., Hild, M., Koch, B., *et al.* (2004) Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* **303**: 832–835.

Carsten, L.D., Watts, T. and Markov, T.A. (2005) Gene expression patterns accompanying a dietary switch in *Drosophila melanogaster*. *Mol Ecol* **14**: 3203–3208.

Clarke, N.D. and Granek, J.A. (2003) Rank order metrics for quantifying the association of sequence features with gene regulation. *Bioinformatics* **19**: 212–218.

Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., *et al.* (2005) Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* **310**: 667–670.

Corona, M., Estrada, E. and Zurita, M. (1999) Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. *J Exp Biol* **202**: 929–938.

Cunha, A.C., Nascimento, A.M., Guidugli, K.R., Simões, Z.L.P. and Bitondi, M.M.G. (2005) Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee. *J Insect Physiol* **51**: 1135–1147.

Darwin, C.R. (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*. John Murray, London.

Davidson, E.H. (2001) *Genomic Regulatory Systems: Development and Evolution*. Academic Press, San Diego.

Eder, J., Kremer, J.P. and Rembold, H. (1983) Correlation of cytochrome c titer and respiration in *Apis mellifera*: adaptive responses to caste determination defines workers, intercastes and queens. *Comp Biochem Physiol B* **76**: 703–716.

Engels, W. (1974) Occurrence and significance of vitellogenins in female castes of social Hymenoptera. *Am Zool* **14**: 1229–1237.

Evans, J.D. and Wheeler, D.E. (1999) Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5575–5580.

© 2006 The Authors

Evans, J.D. and Wheeler, D.E. (2000) Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biol 2* **1**: 6 pages, online http://genomebiology.com/2000/2/1/research/0001.1.

Forbes, A. and Lehmann, R. (1998) Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development* **125**: 679–690.

González-Reyes, A., Elliot, H. and St. Johnston, D. (1995) Polarization of both major body axes in *Drosophila* by *gurken-torpedo* signalling. *Nature* **375**: 654–658.

Goodisman, M.A., Isoe, J., Wheeler, D.E. and Wells, M.A. (2005) Evolution of insect metamorphosis: a microarray-based study of larval and adult gene expression in the ant *Camponotus festinatus*. *Evolution* **59**: 858–870.

Gordon, D.B., Nekludova, L., McCallum, S. and Fraenkel, E. (2005) TAMO: a flexible, object-oriented framework for analysing transcriptional regulation using DNA-sequence motifs. *Bioinformatics* **21**: 3164–3165.

Guidugli, K.R., Hepperle, C. and Hartfelder, K. (2004) A member of the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily is a target of the ecdysone response in honey bee (*Apis mellifera*) caste development. *Apidologie* **35**: 37–47.

Guidugli, K.R., Nascimento, A.M., Amdam, G.V., Barchuk, A.R., Omholt, S.W., Simões, Z.L.P. and Hartfelder, K. (2005) Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Lett* **579**: 4961–4965.

Hagedorn, H.H., Maddison, D.R. and Tu, Z. (1998) The evolution of vitellogenins, cyclorrhaphan yolk proteins and related molecules. *Adv Insect Physiol* **27**: 335–384.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**: 95–98.

Hamilton, W.D. (1964) The genetical theory of social behaviour I. & II. *J Theor Biol* **7**(1–16): 17–52.

Hartfelder, K. and Emlen, D.J. (2005) Endocrine control of insect polyphenism. In *Comprehensive Insect Molecular Science* (Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S., *eds)*, Vol. 3, pp. 651–703. Elsevier, Oxford.

Hartfelder, K. and Engels, W. (1998) Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr Topics Dev Biol* **40**: 45–77.

Hawkins, N.C., Thorpe, J. and Schüpbach, T. (1996) *encore*, a gene required for the regulation of germ line mitosis and oocyte differentiation during *Drosophila* oogenesis. *Development* **122**: 281–290.

Haydak, M.H. (1970) Honey bee nutrition. *Annu Rev Entomol* **15**: 143–156.

Hepperle, C. and Hartfelder, K. (2001) Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development. *Naturwissenschaften* **88**: 113–116.

Hoage, T.R. and Kessel, R.G. (1968) An electron microscopic study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera* L.) with special reference to centriole replication and elimination. *J Ultrastruct Res* **24**: 6–32.

Honey Bee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee. *Apis mellifera*. *Nature* (in press).

Hughes, J.D., Estep, P.W., Tavazole, S. and Church, G.M. (2000) Computational identification of *cis*-regulatory elements associated with groups of functionally related genes in *Saccharomyces cervisiae*. *J Mol Biol* **296**: 1205–1214.

Hunt, G.J. and Page, R.E. (1995) Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics* **139**: 1371–1382.

Hunt, J.H., Buck, N.A. and Wheeler, D.E. (2003) Storage proteins in vespid wasps: characterization, developmental pattern, and occurrence in adults. *J Insect Physiol* **49**: 785–794.

Judice, C.C., Carazzole, M.F., Festa, F., Sogayar, M.C., Hartfelder, K. and Pereira, G.A.G. (2006) Gene expression profiles underlying alternative caste phenotypes in a highly eusocial bee, *Melipona quadrifasciata*. *Insect Mol Biol* **15**: 33–44.

Kerr, W.E. (1950) Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics* **35**: 143–152.

Kropácová, S. and Haslbachová, H. (1971) The influence of queenlessness and of unsealed brood on the development of ovaries in worker honeybees. *J Apicult Res* **10**: 57–61.

Lattorff, H.M.G., Moritz, R.F.A. and Fuchs, S. (2005) A single gene determines thelytokous parthenogenesis in honey bee workers (*Apis mellifera capensis*). *Heredity* **94**: 533–537.

Lattorff, H.M.G., Moritz, R.F.A., Solignac, M. and Crewe, R.M. (2006) Control of reproductive dominance by the *thelytoky* gene in honeybees. *Biol Lett* (in press).

Li, T.R. and White, K.P. (2003) Tissue-specific gene expression and ecdysone-regulated genomic networks in *Drosophila*. *Dev Cell* **5**: 59–72.

Lin, H., Yue, L. and Spradling, A.C. (1994) The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development* **120**: 947–956.

Liu, X.S., Brutlag, D.L. and Liu, J.S. (2002) An algorithm for finding protein-DNA binding sites with applications to chromatin-immunoprecipitation microarray experiments. *Nature Biotechnol* **20**: 835–839.

Liu, Y., Liu, S., Wei, L., Altman, R.B. and Batzoglou, S. (2004) Eukaryotic regulatory element conservation analysis and identification using comparative genomics. *Genome Res* **14**: 354–366.

Martinez, T., Burmester, T., Veenstra, J.A. and Wheeler, D.E. (2001) Sequence and evolution of a hexamerin from the ant *Camponotus festinatus*. *Insect Mol Biol* **9**: 427–431.

McKearin, D. (1997) The *Drosophila* fusome, organelle biogenesis and germ cell differentiation: if you build it. ... *Bioessays* **19**: 147–152.

Mirth, C., Truman, J.W. and Riddiford, L.M. (2005) The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* **15**: 1–12.

Moritz, R.F.A., Kryger, P. and Allsopp, M.H. (1996) Competition for royalty in bees. *Nature* **384**: 31.

Page, R.E. and Erickson, E.H. (1988) Reproduction by worker honey bees (*Apis mellifera* L). *Behav Ecol Sociobiol* **23**: 117–126.

Pereboom, J.J.M., Jordan, W.C., Sumner, S., Hammond, R.L. and Bourke, A.F.G. (2005) Differential gene expression in queen-worker caste determination in bumble bees. *Proc R Soc B* **272**: 1145–1152.

Perera, S.C., Zheng, S., Feng, Q.L., Krell, P.J., Retnakaran, A. and Palli, S.R. (2005) Heterodimerization of ecdysone receptor and ultraspiracle on symmetric and asymmetric response elements. *Arch Insect Biochem Physiol* **60**: 55–70.

Piulachs, M.D., Guidugli, K.R., Barchuk, A.R., Cruz, J., Simões, Z.L.P. and Bellés, X. (2003) The vitellogenin of the honeybee, *Apis mellifera*. Structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem Mol Biol* **33**: 459–465.

Pritsker, M., Liu, Y.C., Beer, M.A. and Tavazole, S. (2004) Whole

© 2006 The Authors

genome discovery of transcription factor binding sites by network-level conservation. *Genome Res* **14**: 99–108.

Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A. and Hartfelder, K. (1990) Caste and metamorphosis – hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen Comp Endocr* **79**: 31–38.

Riddihough, G. and Pelham, H.R.B. (1987) An ecdysone response element in the *Drosophila hsp27* promotor. *EMBO J* **6**: 3729–3734.

Roth, F.P., Hughes, J.D., Estep, P.W. and Church, G.M. (1998) Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantification. *Nature Biotechnol* **16**: 939–945.

Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A. and Barrell, B. (2000) Artemis: sequence visualisation and annotation. *Bioinformatics* **16**: 944–945.

Schmidt-Capella, I.C. and 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.

Snodgrass, R.E. (1956) *Anatomy of the Honey Bee*. Cornell University Press, Ithaca.

Solignac, M., Vautrin, D., Baudry, E., Mougel, F., Loiseau, A. and Cornuet, J.M. (2004) A microsatellite-based linkage map of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Genetics* **167**: 253–262.

St Johnston, D. and Nüsslein-Volhard, C. (1992) The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **68**: 201–219.

Staab, S. and Steinmann-Zwicky, M. (1995) Female germ cells of *Drosophila* require zygotic *ovo and otu* product for survival in larvae and pupae respectively. *Mech Dev* **54**: 205–210.

Sullivan, A.A. and Thummel, C.S. (2003) Temporal profiles of nuclear receptor gene expression profiles reveal coordinate transcriptional responses during *Drosophila* development. *Mol Endocrinol* **17**: 2125–2137.

Wassermann, W.W. and Sandelin, A. (2004) Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nature Rev Genet* **5**: 267–287.

West-Eberhard, M.J. (2003) *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.

Wheeler, D.E. and Nijhout, H.F. (2003) A perspective for understanding the modes of juvenile hormone as a lipid signaling system. *Bioessays* **25**: 994–1001.

Wilson, E.O. (1971) *The Insect Societies*. Belknapp Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.

Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., *et al.* (2000) TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res* **28**: 316–319.

Zhou, X., Oi, F.M. and Scharf, M.E. (2006a) Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. *Proc Natl Acad Sci, USA* **103**: 4499–4504.

Zhou, X., Tarver, M.R., Bennett, G.W., Oi, F.M. and Scharf, M.E. (2006b) Two hexamerin genes from the termite *Reticulitermes flavipes*: sequence, expression, and proposed functions in caste regulation. *Gene* **376**: 47–58.

Zhu, Z., Shendure, J. and Church, G.M. (2005) Discovering functional transcription factor combinations in the human cell cycle. *Genome Res* **15**: 848–855.

Supplementary material

The following material is available for this article online:

Table S1. Annotation results of caste-specifically expressed honey bee genes.

Table S2. Caste-specific motifs in UCRs of honey bee genes.

Table S3. Annotation of honey bee orthologs to Drosophila melanogaster genes involved in Reproduction.

This material is available as part of the online article from http://www.blackwell-synergy.com

© 2006 The Authors

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