

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

**Genes codificadores dos peptídeos
antimicrobianos e de outras proteínas envolvidas
na resposta imune 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

Aluna: Anete Pedro Lourenço
Orientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

Ribeirão Preto

-2007-

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Lourenço, Anete Pedro

Genes codificadores dos peptídeos antimicrobianos e de outras proteínas envolvidas na resposta imune de *Apis mellifera* / Anete Pedro Lourenço; orientadora Zilá Luz Paulino Simões – Ribeirão Preto, 2007.

172p.: 39 il.

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

1. *Apis mellifera*. 2. Peptídeos antimicrobianos. 3. Proteínas envolvidas na resposta imune. 4. Imunidade.

*Ao meu amor André Garraffoni,
pelo entusiasmo e paixão pela Ciência contagiantes.*

Agradecimentos

Meu agradecimento especial à minha orientadora, professora **Dra. Zilá Luz Paulino Simões** pela oportunidade para a realização deste trabalho e também pela confiança e amizade demonstrada a mim durante nosso convívio. Obrigada por acreditar no meu potencial em todos estes anos e participar da minha formação como cientista.

Aos professores **Dra. Márcia M.G. Bitondi** e **Dr. Klaus Hartfelder** pelas sugestões, críticas, e enorme ajuda na correção dos meus trabalhos. E ainda, ao prof. Klaus por executar o procedimento de radioimunoensaio.

Ao professor **Dr. Jay Evans** por me receber em seu laboratório, pela confiança depositada em mim, pelo apoio e supervisão durante o desenvolvimento de parte de minha tese nos Estados Unidos.

À professora **Dra. Gro Amdam** por me receber em seu laboratório na Noruega, passar seu conhecimento sobre RNA de interferência pouco antes do início do meu doutorado, pelas sugestões valiosas em meu trabalho e por auxiliar nas análises estatísticas de dados apresentados neste trabalho.

Aos professores **Dr. Ademilson Espencer Soares** e **Dr. David De Jong** pelo apoio, conversas agradáveis e auxílio no meu trabalho.

Ao técnico **Luiz Roberto Aguiar** pela ajuda indispensável na coleta e sábio manejo das abelhas que foram imprescindíveis para a realização dos experimentos.

Aos funcionários **Marcela, Adelino, Roberto, Jairo** e **Pedro** pela ajuda quando necessária e pelos “bom-dias” e conversas alegres.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Genética do Desenvolvimento de Abelhas: **Rodrigo, Ana Durvalina, Tathy, Adriana, Aline Aleixo, Ivan, Alexandre, Carlos, Francis, Michelle Manfrini, profa. Dra. Ana Bonetti, Mônica, Paulo Emílio, Weyder, Michelle Prioli, Gisele, David, Sérgio, Rogério, Vanessa, Ana Paula, Amanda, Liliane, Gesline, Tiago** e muitos outros pelas discussões frutíferas e por proporcionarem um ambiente harmonioso, com uma convivência agradável durante o período do doutorado.

Gostaria de agradecer especialmente à **Juliana Martins** pelo auxílio no planejamento e execução rápida, e com esmero, de experimentos contidos nesta tese, e ainda, pela prontidão em sempre me ajudar, pela amizade e pelos sorvetes (ula-ula); à **Aline Mackert** pelas discussões, pelos trabalhos em conjunto e pela amizade. Muito obrigada por me ajudar em momentos difíceis; à **Karina** pela companhia de tantos anos no laboratório e discussões e pensamentos infinitos; **prof. Dr. Roberto Barchuk** pelas

idéias animadoras e discussões; ao **Esequiel** pela grande companhia e amizade; à **Fernanda** e **Érica** pelas conversas, amparos e momentos de alegria; à **Vera Lúcia** pelo carinho e auxílio constante; ao **Moisés** pelas discussões e execução de trabalhos em conjunto; ao pupilo **Patrick** que creio ter contribuído para sua iniciação científica.

À professora **Dra. Maria Helena Goldman** por ter fornecido o vetor pBIN-m-gfp5-ER, à professora **Dra. Isabel Ioko Ito** pela cepa de *Micrococcus luteus* e à professora **Dra. Virginie Cuvillier-Hot** pela cepa de *Serratia marcescens*.

Ao pessoal do *Bee Research Lab* (Beltsville-MD, USA): **prof. Dr. Jeff Pettis, Dawn, Érica Teixeira, Zina, Zach, Andy, profa. Dra. Judy, Michele, Bart, Nathan, Virginia, Samuel, Victor, Dorothee** e **Marc** por proporcionar minha estadia maravilhosa nos Estados Unidos, pelos momentos de alegria e pela colaboração na realização deste trabalho. *Thank you all!*

Aos meus familiares que sempre me apoiaram. Aos meus pais **Antonio** e **Lioneti** pelo incentivo, amparo nos momentos difíceis e ajuda constante. Ao meu irmão **Daniel** pela serenidade e por torcer por mim. À minha querida tia **Judith** por estar sempre torcendo por mim.

Ao meu querido **André Garraffoni** pelo amor, pela paciência e por me confortar em momentos difíceis.

Agradeço, enfim, a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente auxiliaram na execução da minha tese. Em especial, àquelas que estiveram do meu lado, se preocupando e torcendo por mim.

À **FAPESP**, à **FAEPA**, ao **USDA Bee Research Laboratory**, e **Pró-Reitoria de Pós-Graduação da USP** pelo auxílio financeiro que tornou viável a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	VII
Resumo	VIII
Abstract	IX
Introdução	1
Organização de uma colônia de <i>Apis mellifera</i>	2
Resposta imune em insetos	5
Resposta imune em <i>Apis mellifera</i>	11
Envolvimento de outras proteínas na imunidade de insetos	15
Objetivos	18
Objetivos específicos.....	19
Material e Métodos	21
1- Material biológico	22
1.1- Abelhas	22
1.2- Bactérias	23
2- Silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi)	24
2.1- Construção do RNA de fita dupla (dsRNA).....	24
2.2- Injeção de dsRNA em pupas e adultos.....	26
3- Infecção por bactérias	27
3.1- Injeção.....	27
3.1.1- Injeção de água- Injúria	27
3.1.2- Injeção com <i>Micrococcus luteus</i> - bactérias Gram-positivas.....	28
3.1.3- Injeção com <i>Serratia marcescens</i> - bactérias Gram-negativas	28
3.1.4- Injeção das bactérias Gram-negativas <i>Escherichia coli</i> , e das Gram-positivas <i>Paenibacillus larvae</i> em abelhas com silenciamento de <i>dorsal</i>	29
3.2- Bactéria no alimento.....	29
4- Alimentação diferencial	30
5- Purificação do RNA total e síntese de cDNA	31
6- Quantificação de transcritos	31
6.1- Real-time RT-PCR.....	33
6.2- RT-PCR semiquantitativa	35
7- Purificação de proteínas e quantificação de proteínas	35
8- Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	36
9- Western blot.....	36
10- Atividade da Fenoloxidase	36
11- Radioimunoensaio (RIA) para hormônio juvenil.....	37

12- Alinhamento de seqüências	37
13- Análise estatística	38
Resultados	39
1- Genes de resposta imune em abelhas infectadas por bactérias.....	40
1.1- Infecção por injeção	40
1.2- Infecção por alimentação.....	48
2- Silenciamento de <i>profenoloxidase (proPO)</i>	54
2.1- Silenciamento de <i>proPO</i> em adultos	54
2.2- Susceptibilidade de abelhas adultas tratadas com dsRNA de <i>proPO</i> seguida de infecção por bactéria	57
2.3- Silenciamento de <i>proPO</i> em pupas	59
2.4- Susceptibilidade de pupas tratadas com dsRNA de <i>proPO</i> à infecção por bactérias.....	61
2.5- Pigmentação da cutícula em pupas tratadas com dsRNA de <i>proPO</i>	63
3- Silenciamento de <i>dorsal 1-A, dorsal 1-B e dorsal 2</i>	65
3.1- Análise de seqüências e localização de <i>primers</i>	65
3.2- Silenciamento gênico e seu efeito após 5 horas de infecção por bactéria ...	69
3.3- Silenciamento gênico e seu efeito após 48 horas de infecção por bactéria .	73
4- Proteínas de estocagem em abelhas infectadas por bactérias	77
5- Imunidade em abelhas alimentadas com diferentes dietas.....	82
6- Imuno-senescência	87
6.1- Colônia típica.....	87
6.2- Colônia <i>single-cohort</i>	92
Discussão	102
Genes de resposta imune em abelhas infectadas por bactérias.....	103
Silenciamento de <i>profenoloxidase</i>	108
Silenciamento de <i>dorsal 1-A, dorsal 1-B e dorsal 2</i>	114
Proteínas de estocagem em abelhas infectadas por bactérias	118
Imunidade em abelhas alimentadas com diferentes dietas.....	121
Imuno-senescência	124
Conclusões	132
Referências Bibliográficas	135
Apêndice	160
Apêndice 1	161

Lista de abreviaturas e siglas

apoLp	Apolipoproteína (Lipoproteína)
<i>Dif</i>	<i>Dorsal-related immune factor</i>
<i>dl</i>	gene que codifica a proteína Dorsal
dsRNA	RNA de fita dupla
GFP	gene codificador da <i>Green Fluorescent Protein</i>
GNPB	<i>gram-negative binding protein</i>
HJ	hormônio juvenil
I κ B	<i>I-kappa-B</i> , inibidor de kappa B
<i>imd</i>	gene <i>immune deficiency</i>
IPT_ NF- κ B	domínio de transcrição do fator NF- κ B
JAK/STAT	<i>Janus Kinase/Signal Transduction and Activator of Transcription</i>
JNK	<i>C- Jun N-terminal kinase</i>
LSP	Lipopolissacarídeo
NF- κ B	fator nuclear-kappa B
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PGLC	peptideoglicanos
PGRP	<i>peptidoglycan recognition protein</i>
<i>proPO</i>	gene que codifica a proteína Profenoloxidase
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
Pw	pupa de olho e cutícula brancos
Rel	proteína Relish
RHD	<i>rel homology domain</i>
RNAi	RNA de interferência
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>

Resumo

LOURENÇO, A.P. **Genes codificadores dos peptídeos antimicrobianos e de outras proteínas envolvidas na resposta imune de *Apis mellifera***. 2007. 172 p. Tese de Doutorado – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Os insetos desenvolveram um sistema imune eficiente contra parasitas e patógenos, que compreende a resposta celular e a humoral. Os mecanismos celulares envolvem a fagocitose e a encapsulação pelos hemócitos, enquanto que as respostas humorais incluem a ativação da Profenoloxidase, e a síntese pelo corpo gorduroso dos peptídeos antimicrobianos, que são liberados na hemolinfa. Duas vias de sinalização intracelular, Toll e Imd, controlam a expressão dos genes codificadores dos peptídeos antimicrobianos. A análise do Genoma da abelha *Apis mellifera* permitiu a identificação dos genes dessas vias. No entanto, pouco se conhece do mecanismo de resposta imune nessas abelhas. Desta maneira, nos propusemos analisar a transcrição de genes efetores da resposta imune (*abaecina*, *hymenoptaecina*, *defensina*, *transferrina*, *profenoloxidase*), assim como os genes integrantes das vias de sinalização, tais como os genes de reconhecimento de microorganismos (*PGRP*, *GNBP*) e ainda, os de sinalização (*cactus*, *relish*, *dorsal 1-B*). Avaliamos também possíveis proteínas implicadas na resposta imune, como as proteínas de estocagem Vitelogenina, Hexamerina 70a, Lipoforina I/II e Lipoforina III. Finalmente, analisamos o efeito da nutrição e do envelhecimento sobre a imunidade em abelhas. Para análise da expressão dos genes das vias de sinalização, as abelhas foram infectadas com bactérias *Serratia marcescens* ou *Micrococcus luteus* por injeção ou via alimentação. A infecção com esses microorganismos provocou a transcrição de peptídeos antimicrobianos e de *transferrina* em altas quantidades após 3 e 12 horas de tratamento, além da alteração na quantidade de transcritos de outros genes. O papel dos genes *profenoloxidase* e *dorsal* na imunidade, descritos como codificadores de importantes proteínas em outros insetos, foi avaliado através da metodologia de silenciamento gênico por RNA de interferência. Observamos a diminuição da transcrição do gene alvo, mostrando a eficiência da metodologia. No entanto, a simples injeção de um RNA de fita dupla foi capaz de ativar o sistema imune de abelhas. Este efeito contribuiu para a dificuldade de atribuição do papel da Profenoloxidase na imunidade de abelhas. Contudo, os resultados de silenciamento de *dorsal* e suas isoformas, nos levaram a considerar que *dorsal 1-A* ou *dorsal 2* participam da via de sinalização intracelular para produção de peptídeos antimicrobianos, principalmente de *defensina*. Em relação às proteínas de estocagem, tanto a quantidade de transcritos quanto de proteínas diminuiu após infecção com bactérias, indicando que estas proteínas estão envolvidas de alguma forma no processo de imunidade em abelhas. Além disso, consumo de alimentos ricos em proteína aumentou os níveis de transcritos das proteínas de estocagem, o que muito provavelmente favorece a manutenção da capacidade de resposta imune de abelhas. O efeito do envelhecimento no declínio da imunidade foi analisado em abelhas nutridoras (novas) e forrageiras (velhas) de uma colônia típica. Além disso, foram utilizadas abelhas de uma colônia *single-cohort*, que eram de uma mesma idade, mas algumas eram nutridoras, enquanto outras eram forrageiras. Todas as abelhas, independentemente da idade ou comportamento, foram capazes de ativar o sistema imune após infecção pela bactéria *S. marcescens*. No entanto, as abelhas com o comportamento de forrageira, independentemente da idade, sempre foram mais susceptíveis a infecções que as nutridoras. Este fato se deve, muito provavelmente, às diferenças fisiológicas entre essas abelhas, que proporciona às nutridoras maior competência à sobrevivência.

Palavras-chave: *Apis mellifera*. Peptídeos antimicrobianos. Proteínas envolvidas na resposta imune. Imunidade.

Abstract

LOURENÇO, A.P. **Genes encoding antimicrobial peptides and immune-related proteins in *Apis mellifera***. 2007. 172 pp. Ph.D. Thesis – Genetics Department, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Insects have developed an efficient immune system against parasites and pathogens, which is comprised of both cellular and humoral responses. The cellular mechanisms involve phagocytosis and encapsulation by hemocytes, whereas the humoral responses include activation of prophenoloxidase and synthesis of antimicrobial peptides by the fat body, which are released into the hemolymph. Two signaling pathways, Toll and Imd, control the expression of genes encoding antimicrobial peptides. Genome-wide analyses of the honey bee, *Apis mellifera*, have identified predicted genes for these signaling pathways. However, immune response mechanisms in honey bees were not yet in depth studied. We analyzed the transcription of effector genes (*abaecin*, *hymenoptaecin*, *defensin*, *transferin*, *prophenoloxidase*), as well as other immune genes, such as pathogen recognition genes (*PGRP*, *GGBP*) and signaling genes (*cactus*, *relish*, *dorsal 1-B*). We also investigated the role of the storage proteins Vitellogenin, Hexamerin 70a, Lipophorin I/II and Lipophorin III in the honey bee immunity. Finally, we analyzed the effect of nutrition and aging on honey bee immunity. Gene expression of signaling pathway components was assessed in honey bees that had been infected with the bacteria *Serratia marcescens* or *Micrococcus luteus* through injection or oral challenge. Honey bees infected with these microorganisms had strong up-regulation of antimicrobial peptide genes and of *transferin*, and also other changes in transcript abundance after 3 and 12 hours of challenge. The roles of *prophenoloxidase* and *dorsal* in the immune response, described as genes encoding important proteins in other insects, were also investigated. In this case we used RNA interference (RNAi) to silence the expression of these genes. RNAi efficiently silenced the target genes. However, injection of double-stranded RNA in honey bees induced a reaction by the immune system. This made it difficult to determine the role of prophenoloxidase in honey bee immunity. Yet, silencing of *dorsal* and its isoforms led us to consider *dorsal 1-A* or *dorsal 2* as members of the signaling pathways that produce antimicrobial peptides, especially *defensin*. The abundance of storage proteins transcripts and proteins was lower in infected bees than in controls, giving evidence that these proteins participate in the immune process in honey bees. Moreover, protein consumption caused up-regulation of genes encoding storage proteins, which may favor the maintenance of the immune response capacity. The effect of aging on decline in immunity was analyzed in (young) nurse bees and (old) foragers from normal free-flying colony. We also examined bees from a single-cohort colony, in which all individuals were at the same age; but some were nursing, while others were foraging. All the bees, independent of age or behavior, were able to activate the immune system after infection with *S. marcescens*. However, foragers, independent of age, were always more susceptible to infections than were nurse bees. This is probably due to physiological differences between bees, which confers to the nurses more competence to survivorship.

Keywords: *Apis mellifera*. Antimicrobial peptides. Immune-related proteins. Immunity.

Organização de uma colônia de *Apis mellifera*

As abelhas *Apis mellifera* vivem em colônias compostas de milhares de indivíduos e pertencem a um grupo altamente social dentre os Hymenoptera (Winston, 1987). As colônias de insetos sociais são estruturadas de modo a possuírem características marcantes, como a divisão de trabalho, a diferenciação de castas e a sobreposição de gerações. Em uma colônia de abelhas *A. mellifera* são encontrados três tipos de indivíduos: os zangões, a rainha e as operárias, os quais exercem papéis distintos nessa sociedade. Os zangões, que se desenvolvem a partir de ovos não fertilizados, são os machos aos quais compete somente a atividade reprodutiva de se acasalar com a rainha. Dentre as fêmeas, que se desenvolvem a partir de ovos fertilizados, existem duas castas: da rainha e das operárias. A rainha é a única fêmea fértil capaz de ser fecundada e, além da função reprodutiva, é capaz de manter a organização social da colônia utilizando-se de feromônios por ela sintetizados. Esse controle por sinais químicos, sobre a colônia, também influencia na fisiologia das operárias fazendo com que permaneçam estéreis.

Em insetos sociais, o comportamento de cada indivíduo foi selecionado para promover o crescimento e a reprodução da colônia (Wilson, 1971). A divisão de trabalho em operárias *A. mellifera* está intimamente relacionada com as diferentes características morfológicas, fisiológicas e comportamentais de cada casta, típicas de idades específicas, em um processo denominado polietismo etário. As operárias geralmente realizam nas duas a três primeiras semanas de vida adulta atividades dentro da colônia como cuidar da cria, estocar a comida, e fazer a manutenção da colônia, e então, nas últimas semanas de sua vida, fazem a defesa da colônia e forrageiam (Winston, 1987). Apesar deste padrão bem estabelecido, a idade da realização de cada tarefa específica é extremamente flexível, e as abelhas podem acelerar, atrasar ou reverter esse padrão de comportamento (Robinson, 1992). A transição do comportamento de dentro da colônia para o de forrageamento é acompanhada por mudanças na dieta (Crailsheim *et al.*, 1992), pela redução da quantidade de lipídeos (Toth & Robinson, 2005), e pela redução de proteínas da hemolinfa (Crailsheim, 1986). O início do forrageamento também está

associado com aumento do hormônio juvenil (HJ) (Fluri *et al.*, 1982), o que provoca a inibição da síntese de Vitelogenina (Pinto *et al.*, 2000). Além disso, o forrageamento em abelhas pode ser ocasionado pela quantidade reduzida do estoque de nutrientes internos (Schulz *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 2007). A informação da quantidade dos nutrientes internos é interpretada pela via de sinalização da insulina, que está associada com o envelhecimento e o encurtamento da vida não só em *A. mellifera* (Corona *et al.*, 2007), como também em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (Finch & Ruvkun, 2001; Nijhout *et al.*, 2003).

Devido às características peculiares de sua história de vida, os insetos sociais são um excelente sistema para o estudo de envelhecimento (Keller & Jemielity, 2006). Recentemente, alguns trabalhos têm abordado a senescência em abelhas (Rueppell *et al.*, 2007a,b; Remolina *et al.*, 2007). A senescência é definida pelo declínio, com relação à idade, das funções fisiológicas, desempenho, sobrevivência ou reprodução (Finch, 1990). Apesar das abelhas forrageiras sofrerem grande risco ao saírem da colônia, existem evidências fortes de que a alta mortalidade destas abelhas é consequência, em grande parte, da deteriorização de fatores intrínsecos ao indivíduo, ou seja, da senescência de sua fisiologia (Remolina *et al.*, 2007). Sob uma perspectiva evolutiva, o envelhecimento em forrageiras tem sido interpretado como uma adaptação da colônia para economizar energia, uma vez que forrageiras sofrem altos riscos de mortalidade ao saírem da colônia, e o investimento coletivo na manutenção da forrageira deveria, assim, ser menor que das abelhas de dentro da colônia (Amdam *et al.*, 2004; Omholt & Amdam, 2004).

A organização da colônia e sua dinâmica são importantes características também para a imunidade social, ou seja, na cooperação dos membros em combater a transmissão de doenças. Apesar de poucos trabalhos abordarem a imunidade social, estudos recentes têm revisado os mecanismos contra a invasão de parasitas e proposto modelos de transmissão de patógenos em insetos sociais baseados na organização da colônia (Naug & Camazine, 2002 e referências por eles citadas; Cremer *et al.*, 2007).

Schmid-Hempel (1998) também mostra como a estrutura e a organização da colônia afetam na propagação de doenças. Como um exemplo, as interações entre os indivíduos por meio da trofaláxis e do cuidado com as crias aumentam a dispersão de patógenos. Além disso, este autor propõe modelos da dinâmica do parasita relacionada com a divisão do trabalho e o tempo de vida das operárias. Em um exemplo, o modelo de “esteira de rolagem” mostra a relação entre a transmissão de infecções e a dinâmica de um inseto social que apresenta polietismo etário. Neste modelo, os indivíduos passam por toda sua ontogenia e terminam como forrageiros. Se, por exemplo, esta “esteira” anda rapidamente, as operárias envelhecem mais rapidamente e forrageiam mais cedo. Sob este aspecto, a infecção é retida aos compartimentos mais externos, uma vez que o rápido movimento da “esteira” não permite a entrada da infecção, protegendo assim, os indivíduos que estão dentro da colônia, especialmente, a rainha.

Os insetos sociais são um alvo atrativo para os agentes infecciosos uma vez que apresentam uma alta densidade de indivíduos, com grande homogeneidade genética, além de viverem em um ambiente relativamente homeostático com a presença de estoques de alimento (Schmid-Hempel, 1998). Assim, estes insetos desenvolveram estratégias de grupo e também individuais no combate às doenças. Dentre as estratégias de grupo estão vários comportamentos, dentre eles o de comportamento higiênico. Este comportamento foi o primeiro a ser descrito em abelhas (Rothenbuhler, 1964) e é um exemplo clássico de defesa social, onde as operárias identificam e removem larvas infectadas dentre a cria sadia (Spivak & Reuter, 2001). Outros tipos de defesa incluem a construção da colônia com material antimicrobiano (Christe *et al.*, 2003), o crescimento da cria em local estéril (Burgett, 1997), o aquecimento da colônia em resposta à doença (Starks *et al.*, 2000) e a transferência de características imunes (Traniello *et al.*, 2002; Sadd *et al.*, 2005). Todavia, os membros de uma colônia também possuem defesas individuais como ocorre em outros insetos, incluindo a resposta imune contra agentes infecciosos (Casteels-Josson *et al.*, 1994; Evans, 2004; Evans *et al.*, 2006).

Resposta imune em insetos

A presença de um sistema imune eficiente em insetos certamente é, em parte, responsável pelo sucesso de sobrevivência e ocupação de vários nichos destes animais, que são freqüentemente expostos a micróbios e parasitas, mas que somente poucos invasores resultam em infecção. Os insetos possuem um mecanismo para identificação de patógenos bastante sensível e desenvolveram várias estratégias para se defenderem de ataques de micróbios, que entram em seu corpo através da comida, pelo ar, através do sistema traqueal, ou ainda por feridas no corpo. Diferentemente do que ocorre nos vertebrados, que possuem imunidade adaptativa baseada em células B e T, nos insetos não existe evidência de seleção clonal.

O mecanismo de resposta imune dos insetos, que não apresenta memória, é denominado de inato e compreende três meios de defesa principais, através: 1) da resposta humoral gerada por peptídeos antimicrobianos; 2) da resposta celular que resulta na fagocitose e encapsulação do invasor e 3) da reação da Fenoxidase que deposita pigmentos de melanina ao redor de ferimentos e objetos estranhos. Durante a infecção sistêmica, além dos peptídeos antimicrobianos, outras moléculas efetoras são induzidas e secretadas na hemolinfa, como as proteínas de resposta ao estresse, para a opsonização, que é o reconhecimento de corpo estranho para ser fagocitado, e de seqüestro de ferro (Tzou *et al.*, 2002).

O díptero *Drosophila melanogaster* é considerado o modelo de estudos do princípio da imunidade inata. A resposta que envolve tanto a defesa celular quanto a humoral é iniciada por receptores de reconhecimento (PRRs – *pattern recognition receptors*) que se ligam especificamente aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – *pathogen associated molecular patterns*) como lipopolissacarídeos (LPS) e peptídeoglicanos (PGLC), constituintes da parede de bactérias (Medzhitov & Janeway Jr., 2002). Esses PRRs podem proporcionar a morte de micróbios diretamente através de fagocitose, ou, indiretamente por provocar cascatas de serina proteases, as quais podem ativar reações de defesa imune como encapsulação melanótica ou iniciar as

vias de sinalização intracelular, que regulam a transcrição de genes de peptídeos antimicrobianos e outros genes efetores (Hoffmann *et al.*, 1996; Hoffmann & Reichhart, 2002).

A resposta celular primária é a caracterizada pela ação dos hemócitos. Existem diferentes populações de hemócitos em insetos que executam diversas reações de resposta imune, alguns deles são: os plasmócitos que fagocitam, os lamelócitos que encapsulam, e as células cristais que melanizam (Gillespie *et al.*, 1997). Os hemócitos estão sob sinais de estresse causados por um ferimento ou de infecção por bactérias, através de componentes da parede celular (LPS ou PGLC), como dito anteriormente. Um dos meios de defesa destas células é a coagulação da ferida, onde hemócitos e moléculas da hemolinfa interagem e formam um coágulo. O mecanismo de coagulação não é bem caracterizado em insetos, mas algumas moléculas já foram identificadas (Theopold *et al.*, 2002). Além disso, os hemócitos podem atacar organismos invasores (dentre segundos a minutos) e parar sua invasão, ou ainda, se o invasor for muito grande para ser fagocitado, ele é encapsulado (dentre minutos a horas) por nódulos ou cápsulas de organização celular (Gillespie *et al.*, 1997). Os hemócitos são a primeira linha de defesa, sendo que em *Armigeres subalbatus*, a fagocitose de bactérias por granulócitos ocorre em apenas cinco minutos (Hillyer *et al.*, 2003).

A melanização produz o pigmento preto que está localizado no coágulo da ferida ou ao redor de partículas estranhas na hemocele. A melanina cobre o invasor e, em seguida, previne ou retarda seu crescimento através de substâncias intermediárias altamente reativas e a tóxica quinona (Cerenius & Soderhäll, 2004). A principal enzima deste processo é a Fenoloxidase (monofenol, L-dopa:oxigênio oxidoreductase, EC 1.14.18.1) que converte tirosina em melanina por catalisar a oxidação de fenóis para quinonas. As quinonas, então, são polimerizadas em uma reação não enzimática para formar a melanina, cujo processo é importante também para esclerotização e pigmentação da cutícula (Mason, 1955, 1965). A Fenoloxidase está presente como um precursor, a Profenoloxidase (proPO), que é ativado através de proteólises por uma

cascata de serinas proteases associada com o sistema de ativação da proPO (Ashida & Brey, 1998).

Após a infecção na hemocele, como dito anteriormente, um conjunto de diferentes peptídeos é sintetizado principalmente no corpo gorduroso, podendo ocorrer síntese também em hemócitos (Dimarcq *et al.*, 1994), células intestinais (Daffre *et al.*, 1994), glândulas salivares (Kylsten *et al.*, 1992) e trato reprodutivo (Samakovlis *et al.*, 1991), e são importantes efetores na resposta humoral (Hetru *et al.*, 1998; Bulet *et al.*, 1999). Em poucas horas de infecção, esses peptídeos são sintetizados atingindo altas concentrações que são letais aos invasores (Hultmark, 2003). Os peptídeos são essencialmente ativos ao induzir perturbações na membrana celular de procaríotos ou fungos, levando ao extravasamento de solutos e geralmente à morte rápida destes microorganismos (Lehrer & Ganz, 1999).

Para a produção desses peptídeos, são conhecidos pelo menos duas vias de sinalização intracelular (Figura 1) que foram originalmente definidas pelos mutantes no gene *Toll* e *imd* (*immune deficiency*) em *Drosophila* (Lemaitre *et al.*, 1995). Trabalhos recentes têm caracterizado melhor essas vias, as quais envolvem três fatores de transcrição do tipo Rel/NF- κ B, o Dif, o Dorsal e o Relish, responsáveis pela ativação dos genes dos peptídeos antimicrobianos (Hultmark, 2003; Kim & Kim 2005).

Na via Toll, a sinalização do receptor de membrana codificado pelo gene *Toll* ativa dois fatores de transcrição, o Dif (*Dorsal-related immune factor*) e o Dorsal. Entre esses dois fatores, o Dif é mais importante para imunidade em *Drosophila*, enquanto Dorsal funciona principalmente no embrião determinando a polaridade dorso-ventral (Anderson & Nusslein-Volhard, 1984). Normalmente, Dif e Dorsal formam um complexo inativo com Cactus, um membro da família de I κ B, que são inibidores de NF- κ B. A sinalização de Toll resulta na fosforilação de Cactus, seguida de sua degradação. Dif e também Dorsal são, então, transportados para o núcleo, onde participam na ativação da transcrição de certos genes. Muitos outros produtos gênicos fazem a sinalização entre Toll e Dif, como por exemplo, Pelle e Tube (revisado em Hultmark, 2003).

Na outra via de sinalização (Imd), o fator tipo Rel/NF- κ B denominado Relish é ativado quando clivado em duas partes, segundos após a infecção. Relish é processado por uma rápida endoproteólise independente de proteossomo, gerando dois fragmentos: Rel-68, que contém o domínio de homologia Relish e é deslocado para o núcleo, e Rel-49, que inclui a região do tipo I κ B e permanece no citoplasma (Stöven *et al.*, 2000). A clivagem ocorre pelo reconhecimento do sítio de uma caspase, provavelmente após um sinal dependente de fosforilação (Stöven *et al.*, 2003). Mutantes de *Relish* não mostram nenhum efeito fenotípico nos hemócitos ou na resposta imune celular de *Drosophila*, mas eles são extremamente sensíveis à infecção por bactérias, pois uma única célula de *E. cloacae* é suficiente para matar essas moscas (Hedengren *et al.*, 1999), demonstrando, portanto, a importância da resposta humoral para a sobrevivência.

Como no caso da via Toll, a via Imd controla a transcrição de centenas de genes além daqueles codificadores dos peptídeos antimicrobianos. A função de muitos destes genes na defesa ainda precisa ser estabelecida (Irving *et al.*, 2001; De Gregorio *et al.*, 2002). Além disso, análises por *microarray* mostraram que a via Toll controla a maior parte dos genes induzidos por fungos e coopera com a via Imd no controle de genes implicados em várias reações imunes como coagulação, produção de peptídeos antimicrobianos, opsonização, seqüestro de ferro e fechamento de feridas (De Gregorio *et al.*, 2002).

Em *Drosophila* são conhecidos pelo menos 34 peptídeos antimicrobianos, que podem possuir a propriedade de matar bactéria Gram-positiva, Gram-negativa e fungo, ou ainda, serem especializados para um determinado grupo de micróbios. O peptídeo antifúngico, Drosomicina, é o principal produto resultante da ativação da via Toll, sugerindo que essa via é especializada em infecções causadas por fungos (Lemaitre *et al.*, 1997), uma vez que Drosomicina é induzida especificamente pelo fungo patógeno *Beauveria bassiana* e também pelo fato dos mutantes da via Toll serem bastante suscetíveis às infecções por *Beauveria*. No entanto, outros fungos induzem a produção de Cecropina, através da via de sinalização Imd, e são letais em mutantes de *Relish*

(Hedengren *et al.*, 1999). Além disso, Drosomicina é também induzida por *Micrococcus luteus*, sugerindo que a via Toll tenha papel importante na defesa contra bactérias Gram-positivas. Desse modo, parece que existe alguma especificidade na indução das duas vias (Hedengren-Olcott *et al.*, 2004), e a via Toll seria principalmente importante durante as infecções a fungos e bactérias Gram-positivas, e a via Imd seria, predominantemente, ativada por bactérias Gram-negativas.

Além das vias do Toll e Imd, outras vias (JNK e JAK/STAT) também parecem estar envolvidas na imunidade de insetos (Figura 1). A via Imd, além de ocasionar a ativação de Relish, também proporciona ativação de componentes da via de sinalização JNK (Boutros *et al.*, 2002), responsável pela ativação da expressão dos genes do citoesqueleto, e evidências recentes indicam que esta via pode providenciar tanto retroalimentação positiva quanto negativa na expressão de peptídeos antimicrobianos (Wojda *et al.*, 2004).

A via JAK/STAT, originalmente identificada através de seu papel na segmentação do embrião, tem três componentes celulares principais: o receptor Domeless, a quinase Janus (JAK) Hopscotch, e o fator de transcrição STAT (Lemaitre *et al.*, 1997). Esta via parece ser iniciada através de moléculas do tipo citocina em células da hemolinfa, e contribui para a imunidade através da indução dos fatores tipo complemento (por exemplo, proteína contendo tiol-éster – TEP) e da proliferação de hemócitos (Agaisse & Perrimon, 2004). Além disso, esta via regula a expressão de genes Turadot (Tot) que codificam fatores humorais induzidos por várias condições de estresse, especialmente por injúria (Ekengren & Hultmark, 2001; Ekengren *et al.*, 2001; Agaisse *et al.*, 2003). Em *Drosophila*, a proteína extracelular Upd promove a atividade fagocitária dos hemócitos e ainda ativa a via JAK/STAT através da ligação com o receptor Domeless no corpo gorduroso (Agaisse *et al.*, 2003). Esta via, ainda, participa da resposta antiviral em *Drosophila* (Dostert *et al.*, 2005), e em mamíferos, tem um papel na sinalização do interferon, e pode, deste modo, representar um mecanismo ancestral conservado no controle de infecções virais. Entretanto, o estímulo gerado para ativar a via JAK/STAT e a

natureza das moléculas antivirais, ainda precisam ser determinados (Bangham *et al.*, 2006; Lemaitre & Hoffmann, 2007).

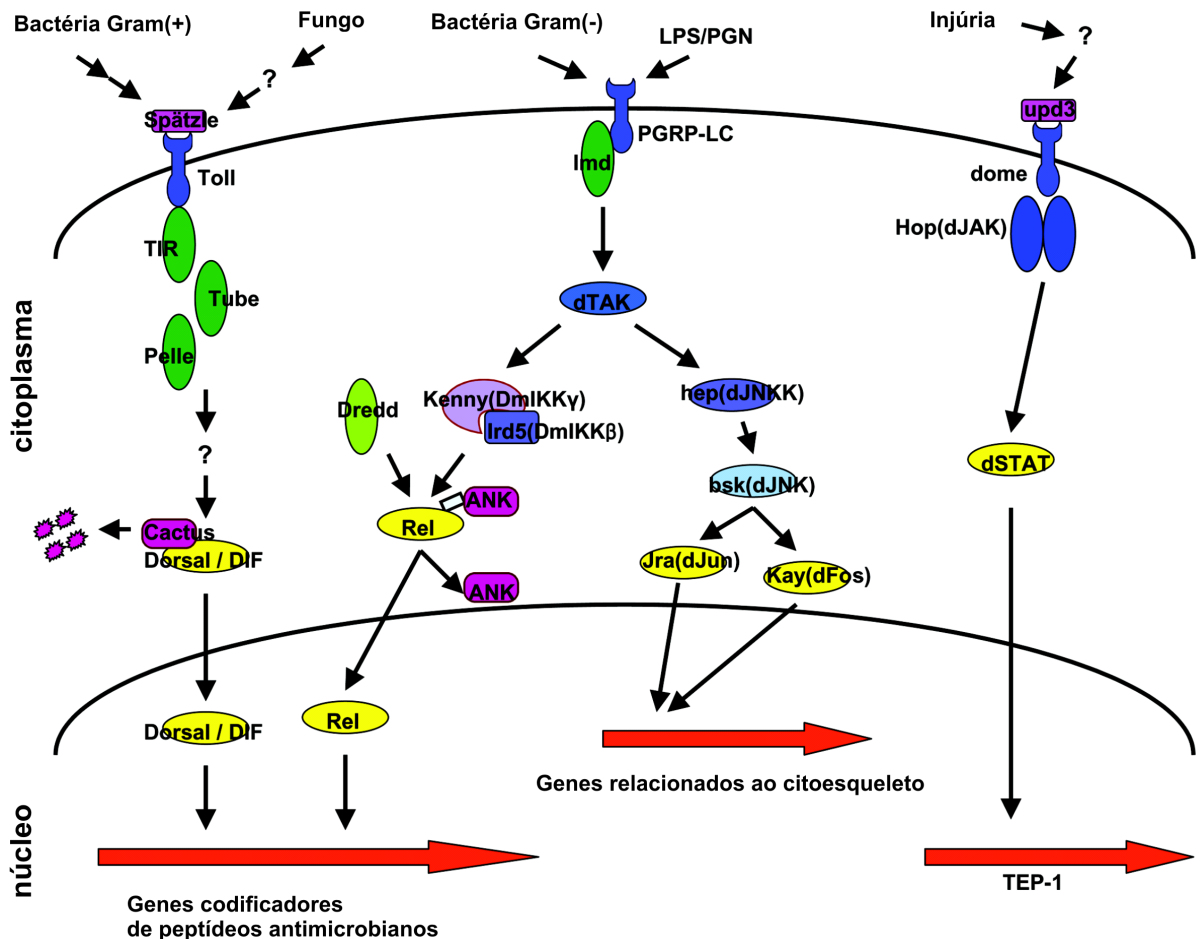


Figura 1- Vias de sinalização Toll, Imd e JAK-STAT que controlam a expressão de genes relacionados à resposta fisiológica de infecção em *Drosophila*. O Spätzle é processado por uma serina protease após infecção e se liga em Toll. Este, por sua vez, ativa uma cascata intracelular culminando com a degradação de Cactus e o deslocamento dos fatores de transcrição do tipo NF- κ B, Dorsal e Dif. A via Imd ramifica-se nos módulos de sinalização JNK e IKK (quinase I κ B). O Relish, fosforilado pelo complexo IKK, é clivado em uma forma menor e ativa, que se desloca para o núcleo. A via JNK leva à ativação de dAP1 (um homo- ou heterodímero de dJun e/or dFos) através das proteínas Hep a Bsk, que em *Drosophila* são dJNKK e dJNK. Além disso, o dímero STAT é deslocado para o núcleo como resultado da ativação da quinase JAK, através da citocina Domeless (Dome). Ilustração modificada de Kim & Kim (2005).

Resposta imune em *Apis mellifera*

Em *Apis mellifera*, como em outros insetos, a imunização ocorre por resposta humoral e celular. A defesa por meio da ativação da Fenoloxidase é pouco conhecida, mas o precursor desta enzima, a Profenoloxidase, já foi caracterizado e o gene foi clonado e seqüenciado (Zufelato *et al.*, 2004; Lourenço *et al.*, 2005). A análise do genoma de abelha (Lourenço *et al.*, 2005; Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) sugere que somente um gene para proPO está presente nestes insetos, ao contrário de outras espécies como em mosquitos que possuem até nove genes (*Anophles gambiae*- Christophides *et al.*, 2004) ou seis genes (*Aedes aegypti*- Taft *et al.*, 2001; Bartholomay *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005).

Na resposta de defesa humoral em abelhas são conhecidos os seguintes peptídeos presentes na hemolinfa: três Apidecinas (Casteels *et al.*, 1989), uma Abaecina (Casteels *et al.*, 1990), uma Hymenoptaecina (Casteels *et al.*, 1993) e duas Defensinas (Casteels-Josson *et al.*, 1994; Kludiny *et al.*, 2005). A Royalisina, um peptídeo presente na geléia real também foi isolado, e difere de uma das Defensinas somente por um aminoácido (Fujiwara *et al.*, 1990). Outros peptídeos isolados da geléia real são as quatro Geleínas que não possuem similaridades com outros peptídeos de abelhas (Fontana *et al.*, 2004).

As Apidaecinas são peptídeos curtos (18 aminoácidos) altamente ativos contra bactérias Gram-negativas, provavelmente por destruir a parede celular. Esse peptídeo é encontrado principalmente nas fases larvais e adultas, que parecem mais desprotegidas e é ativado quando as abelhas são imunizadas com bactérias patogênicas de plantas, sugerindo que esses insetos desenvolveram um mecanismo específico contra microorganismos presentes no ambiente em que eles vivem (Casteels *et al.*, 1989).

A Abaecina é um peptídeo de 34 aminoácidos com 34% de prolina e que possui domínios na seqüência similares à Diptericina encontrada em moscas. Apesar das similaridades encontradas entre as Apidaecinas, Abaecina e Diptericina A, as propriedades biológicas entre elas são bastante diferentes. A Abaecina é mais ativa

contra bactérias Gram-negativas e também Gram-positivas, enquanto que as Apidaecinas são mais efetivas contra as Gram-negativas e possuem uma ação mais intensa contra as bactérias do que a Abaecina (Casteels *et al.*, 1990).

A Hymenoptaecina é o maior peptídeo antimicrobiano conhecido em *Apis*, com 94 aminoácidos, que age contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Casteels *et al.*, 1993). As Defensinas são codificadas por dois genes: a *defensina1* que codifica a Royalisina e também a Defensina encontrada na hemolinfa, e a *defensina2* que codifica uma nova Defensina não caracterizada, cujo papel na fisiologia de abelha ainda precisa ser investigado. O peptídeo codificado pela *defensina1* consiste de 51 aminoácidos. Já o peptídeo codificado pela *defensina2* tem 43 aminoácidos e não contém uma extensão C-terminal encontrada nas outras defensinas de himenópteros (Klaudiny *et al.*, 2005).

A quantificação de transcritos para estes peptídeos tem sido feita em larvas após inóculo com vários tipos de bactérias (Evans, 2004; Evans & Lopez, 2004) e também em adultos com inóculo de *Escherichia coli* (Casteels-Josson *et al.*, 1993, 1994). A variação na transcrição dos peptídeos também foi usada para a avaliação da inibição do sistema imune da *A. mellifera* pela presença do ácaro *Varroa destructor*, um ectoparasita de abelha (Gregory *et al.*, 2005; Yang & Cox-Foster, 2005).

Apesar de se conhecer os peptídeos, pouco se sabe sobre as vias de sinalização intracelulares, em abelhas, para a produção de peptídeos contra microorganismos. Recentemente, com o advento do seqüenciamento completo do genoma de *A. mellifera* (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006), foram preditos alguns representantes das vias de sinalização intracelular Toll, Imd, JNK e JAK/STAT através de comparações àqueles já estudados em outros insetos, principalmente *Drosophila* (Figura 2; Evans *et al.*, 2006). As análises do genoma de *A. mellifera* mostraram que nesta espécie houve uma redução no número e na diversidade de genes implicados na resposta imune quando comparado ao genoma de *Drosophila* e *Anopheles*, o que levou Evans *et al.* (2006) sugerirem que este é um reflexo da capacidade da barreira social às doenças. Apesar da quantidade reduzida de genes da resposta imune, o grupo básico de

moléculas que define o sistema imune de insetos foi encontrado em abelhas, incluindo os componentes das vias de sinalização intracelular, que são chaves nos processos de imunidade e desenvolvimento (Figura 2; Evans *et al.*, 2006).

Anteriormente ao seqüenciamento do genoma de abelha, o gene *dorsal*, que participa da via Toll, foi isolado e seqüenciado em *A. mellifera*, apresentando-se em duas isoformas: *dl* (ou *dorsal 1-A*) e *dlB* (ou *dorsal 1-B*) (Fan, 2001). Recentemente, após a análise do genoma, um novo gene ortólogo codificador de Dorsal, chamado *dorsal 2*, foi predito em *A. mellifera* (Evans *et al.*, 2006). Experimentos envolvendo infecções bacterianas em larvas de abelhas mostraram que a proteína Dorsal estava presente no núcleo das células quando as abelhas foram imunizadas com bactéria Gram-positiva (*Micrococcus luteus*) e, contrariamente, não foi transportada para o núcleo quando houve infecção com bactéria Gram-negativa (*E. coli*) (Fan, 2001). Esses resultados, somados à existência, em *A. mellifera*, de muitos genes das vias intracelulares também encontrados em *Drosophila*, mostram a possibilidade da existência de um mesmo mecanismo de funcionamento das vias de sinalização entre estes dois organismos.

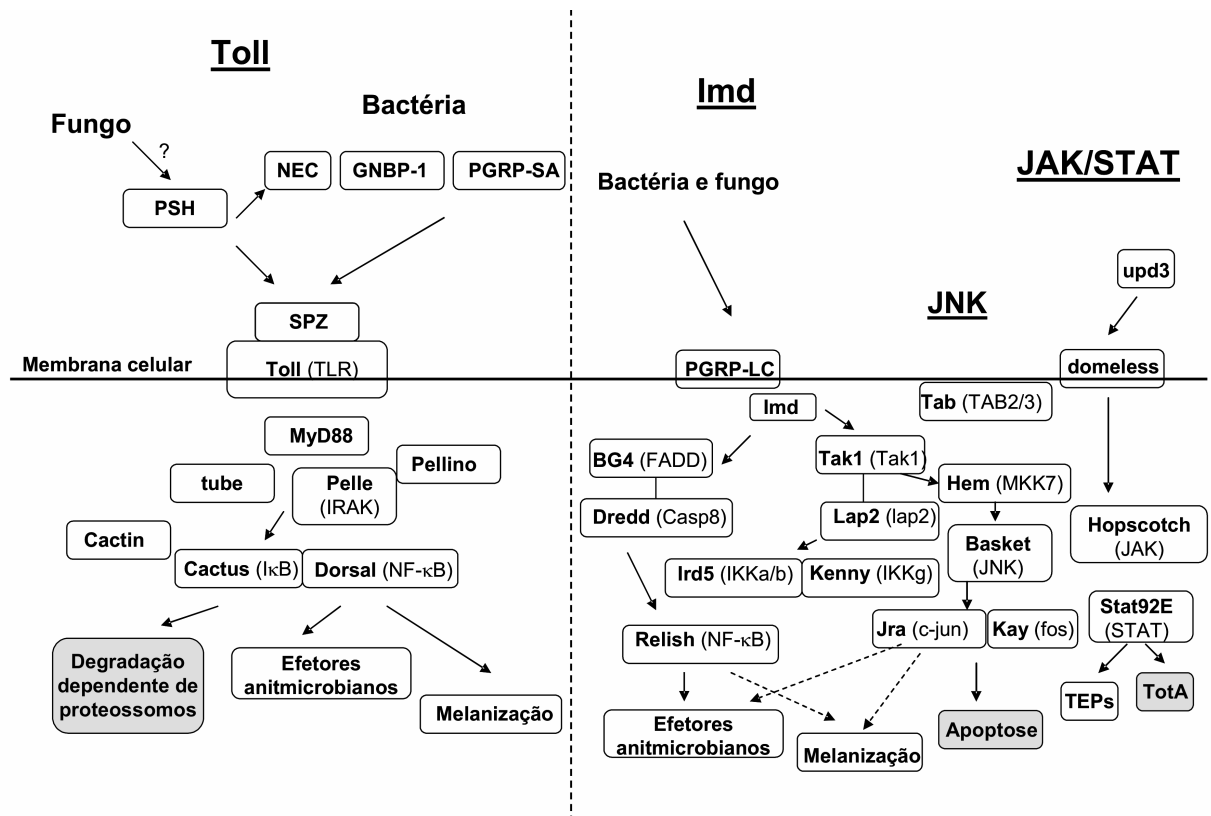


Figura 2- Membros candidatos das vias Toll, Imd, JNK e JAK/STAT em abelha *Apis mellifera*. Os nomes foram dados segundo conhecimento destas vias em *Drosophila*. O possível funcionamento destas vias, baseado no que se conhece em *Drosophila*, está descrito na Figura 1. Em cinza estão representadas as proteínas cujos genes ortólogos não foram encontrados em *A. mellifera* (TotA-gene Turadot) ou não foram estudados (genes de apoptose ou para a degradação dependente de proteossomos) no trabalho de Evans *et al.* (2006). Ilustração modificada de Evans *et al.* (2006).

Envolvimento de outras proteínas na imunidade de insetos

Além da ativação das vias intracelulares de sinalização para produção de peptídeos, a fagocitose por hemócitos e a melanização pela Profenoloxidase, outras proteínas, como Transferrina e proteínas de estocagem, também participam direta ou indiretamente para a imunidade em insetos.

A Transferrina é uma proteína transportadora de ferro, e é capaz de se ligar a dois íons de ferro, que são um dos elementos essenciais para todos os organismos podendo ser tóxico pela habilidade de produzir radicais livres na presença de oxigênio (Nichol *et al.*, 2002). Recentemente, foi estabelecida a participação da Transferrina na resposta imune de insetos infectados com microorganismos, através do seqüestro de ferro (Yoshiga *et al.*, 1997; Ratledge & Dover, 2000; Nichol *et al.*, 2002). Além disso, sabe-se que o gene codificador da Transferrina de insetos é induzido após infecção por microorganismos (Yoshiga *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2003, Valles & Pereira, 2005). Além do seqüestro de ferro pela Transferrina, deixando-o indisponível para patógenos invasores, a região promotora do gene codificador desta proteína possui seqüências de sítios ligadores NF- κ B consistente com o aumento de transcritos de *transferrina* após infecção (Harizanova *et al.*, 2005). Parte da atividade antimicrobiana da Transferrina (Lactoferrina) tem sido atribuída pela geração de peptídeos a partir da proteína intacta em mamíferos (Farnaud & Evans, 2003). Estes fragmentos proteolíticos também foram encontrados em mosquitos (Harizanova *et al.*, 2005). Em *A. mellifera* este gene foi identificado e caracterizado, e sabe-se que é ativado após 6 horas de infecção com bactérias *E. coli* (Do Nascimento *et al.*, 2004; Kucharski & Maleszka, 2003).

Algumas proteínas de estocagem também já foram relacionadas com a imunidade em insetos. A Vitelogenina de *A. mellifera* é a principal proteína de estocagem em fêmeas servindo como reserva de nutrientes, e em zangões e operárias não poedeiras, como carregadora de lipídeos (Wheller & Kawooya, 1990; Barchuk *et al.*, 2002). Além disso, uma quantidade significativa de Vitelogenina está presente em larvas de ambos os sexos, o que sugere que esta proteína sirva para outras funções além de crescimento do ovócito

e suprimento de energia para o embrião (Guidugli *et al.*, 2005). Esta proteína de estocagem é, também, considerada importante na imunidade e longevidade de abelhas por ser carregadora de zinco e, por isso, ser uma proteína que protege contra o estresse oxidativo e apoptose em diversas linhas celulares (Amdam *et al.*, 2004; 2005; Seehuus *et al.*, 2006). Existe ainda uma relação entre a quantidade de hemócitos funcionais e níveis de hormônio juvenil. Amdam *et al.* (2004) sugeriram que a diminuição do número de hemócitos em abelhas velhas (forrageiras) seria causada pela diminuição dos títulos de zinco que é mediado pela queda de vitelogenina devido às altas taxas de hormônio juvenil (Pinto *et al.*, 2000).

A Hexamerina 70A é um tipo de Hexamerina, uma proteína de estocagem. As Hexamerinas são sintetizadas e secretadas pelo corpo gorduroso em larvas e atingem concentrações bastante altas um pouco antes da metamorfose. Em insetos holometábolos (como em abelhas), estas proteínas são recapturadas pelo corpo gorduroso durante a muda de larva para pupa e, parcialmente, estocadas em grânulos protéicos, assim como na hemolinfa da pupa. Nos adultos, esta reserva desaparece, uma vez que os aminoácidos são incorporados e usados para formação de novos tecidos e proteínas. Algumas Hexamerinas também têm a função de ligantes, de transporte (revisado em Telfer & Kunkel, 1991), de modulação do hormônio juvenil (Zhou *et al.*, 2007) e, além disso, estão implicadas na imunidade de insetos (Beresford *et al.*, 1997).

As Lipoforinas são proteínas participantes do metabolismo de lipídeos, e, ainda, componentes do coágulo que se forma em resposta ao ferimento, podendo também inibir a adesão celular (Coodin & Caveney 1992; Mandato *et al.*, 1996). As Lipoforinas também são capazes de reconhecer e inativar lipopolissacarídeo (LPS - componente da parede celular de bactéria) (Ma *et al.*, 2006). Dentre as Lipoforinas de insetos (apoLp-I, II e III), apoLp-I tem ~240 kDa, apoLp-II tem ~80 kDa e apoLp-III tem ~18 kDa. As duas primeiras são proteínas ligadoras de lipídeos, enquanto que a última pode ser encontrada livre de lipídeos na hemolinfa, porém, para agir como ativador da resposta imune, ela deve estar na conformação de ligação a lipídeo (revisado em Weers & Ryan, 2006). Estudos com

Galleria mellonella mostraram que a injeção de apoLp-III aumenta a atividade bactericida, a atividade da Lisozima e estimula a fagocitose por plasmatócitos (Wiesner *et al.*, 1997). Recentemente, estudos com *Hyphantria cunea* demonstraram que apoLp-III é capaz de induzir a expressão de peptídeos antimicrobianos e de ligar-se à membrana de *E. coli* (Kim *et al.*, 2004).

Na resposta imune, antes mesmo da resposta humoral, a coagulação ocorre para fechar feridas e não deixar que microorganismos entrem na hemocele (Theopold *et al.*, 2002; 2004). A Lipoforina é considerada o principal pró-coagulante (Duvic & Brehelin, 1998), e além dela, a Profenoxidase participa deste processo (Bidla *et al.*, 2005), assim como a Hexamerina (tipo Arylforina) (Li *et al.*, 2002).

Devido a grande importância da existência do sistema imune inato para a sobrevivência dos insetos e o pouco conhecimento das estratégias desenvolvidas pela abelha *A. mellifera*, um organismo altamente social, nos propusemos estudar a resposta imune dessas abelhas. Esse trabalho visa um melhor entendimento da ativação dos peptídeos antimicrobianos, sua relação com vias de sinalização intracelulares e ainda a participação de outros genes no processo de imunização.

Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi investigar os principais mecanismos de resposta imune humoral baseada na produção de peptídeos antimicrobianos e outras moléculas efetoras, na reação da Fenoloxidase e, ainda, no envolvimento de proteínas de estocagem na imunidade de *Apis mellifera* inoculada com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Além disso, nos propusemos estabelecer a relação do processo de envelhecimento com o declínio da imunidade nestas abelhas.

Objetivos específicos

- Identificar, por meio de transcrição gênica, a participação de genes ortólogos dos grupos de sinalização, reconhecimento de microorganismos e efetores das vias de sinalização intracelular Toll e Imd descritas em *Drosophila*, na resposta imune de *Apis mellifera* infectadas com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, através de dois meios de infecção: por injeção ou via oral.
- Avaliar o papel do gene codificador da enzima Profenoloxidase na resposta imune, assim como na pigmentação cuticular, de *A. mellifera* através do uso da técnica de silenciamento gênico por RNA de interferência.
- Identificar a importância do gene ortólogo e/ou isoforma de *dorsal*, possível fator de transcrição da via de sinalização intracelular de Toll em *A. mellifera*, através do uso de RNA de interferência seguido de infecção por bactéria Gram-positiva ou Gram-negativa. E, por conseguinte, a relação deste fator de transcrição com a ativação dos genes codificadores dos peptídeos antimicrobianos Defensina e Abaecina.
- Verificar a ativação na transcrição e/ou pós-transcrição dos genes relacionados com a resposta imune de *A. mellifera*, como os codificadores da Vitelogenina, da

Lipoforina e da Hexamerina, uma vez que estas proteínas de estocagem parecem ser importantes na resposta imune de insetos.

- Avaliar a alimentação diferencial, com restrição protéica, como influência na produção de proteínas de estocagem e sua relação com a imunidade de *A. mellifera*.
- Relacionar o aspecto de envelhecimento com o declínio da imunidade em *A. mellifera*, através do estudo de características fisiológicas como a quantidade da proteína Vitelogenina, os títulos de hormônio juvenil e expressão de genes da via de insulina de abelhas com comportamentos diferentes, independente da idade cronológica.

Material e Métodos

1- Material biológico

1.1- Abelhas

Nos experimentos foram utilizadas abelhas *Apis mellifera* africanizadas do apiário experimental do Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Exceto para os experimentos de silenciamento de *dorsal*, em que foram utilizadas abelhas *Apis mellifera ligustica* do apiário experimental do *USDA - Bee Research Laboratory*, Beltsville, MD, Estados Unidos.

Na maioria dos experimentos foram utilizadas abelhas sem manipulação da colônia, ou seja, foram coletadas abelhas de uma colônia típica. Destas colônias foram retiradas abelhas de idades e/ou comportamentos diferentes, como pupas de olho e cutícula brancos (Pw), e adultos como as recém-emergidas, nutridoras e forrageiras. As pupas foram retiradas diretamente do quadro com crias. As recém-emergidas, de até 24 horas, foram coletadas de quadros com pupas velhas deixados em estufas para a emergência das abelhas, ou ainda, foram coletadas diretamente da colônia. As abelhas nutridoras foram consideradas aquelas que após serem marcadas quando recém-emergidas, foram deixadas na colônia por sete dias e, então, foram coletadas. As abelhas forrageiras foram coletadas na entrada da colônia, carregando pólen nas corbículas.

Foram utilizadas também, abelhas de uma colônia manipulada chamada *single-cohort*. Para a montagem desta colônia foram utilizadas cerca de 3000 abelhas recém-emergidas, onde 1000 abelhas de colônias diferentes foram marcadas com um ponto de tinta no tórax durante três dias consecutivos. As abelhas foram colocadas em uma pequena caixa contendo um quadro com alimento, cria jovem e uma rainha. Estas abelhas receberam alimento suplementar, xarope (50% açúcar em água) e pólen coletado de colônias diluído em xarope (30% pólen e 70% xarope). Abelhas de 6-8 e 21-23 dias de idade foram coletadas de acordo com o comportamento: nutridoras que estavam dentro da caixa e forrageiras na entrada da caixa com pólen nas corbículas.

Para que abelhas recém-emergidas não alterassem o comportamento das abelhas, já estabelecido quando novas (6-8 dias de idade), os quadros com pupas mais velhas foram trocados por um quadro com alimento e cria jovem, até a coleta das abelhas com 21-23 dias de idade, desta maneira, as únicas abelhas adultas desta colônia eram aquelas marcadas e de uma mesma idade.

Das abelhas coletadas tirou-se hemolinfa e, posteriormente, separou-se o abdômen do tórax e cabeça, e em seguida, retirou-se o intestino (somente das abelhas adultas) através do uso de pinças. A hemolinfa foi retirada com uso de um microcapilar de vidro inserido em um pequeno corte da parte dorsal do abdômen. O abdômen das pupas (com intestino) ou dos adultos (sem intestino) foi estocado em 500 µl ou 1 ml de reagente Trizol (Trizol[®] Reagent, Life Technologies) para posterior purificação do RNA total e proteína.

1.2- Bactérias

Neste trabalho foram utilizadas bactérias Gram-positivas: *Micrococcus luteus* (cepa ATCC 9341, gentilmente cedida pela profa. Dra. Isabel Ioko Ito- FCFRP-USP) e *Paenibacillus larvae* (cepa 260014, USDA- Bee Research Laboratory, Beltsville-MD, Estados Unidos), causadora da doença de cria pútrida americana em abelhas; e bactérias Gram-negativas: *Serratia marcescens* (cepa gentilmente cedida pela Dra. Virginie Cuvillier-Hot) e *Escherichia coli* (células competentes DH10β).

As bactérias *S. marcescens* e *M. luteus* cresceram em meio nutritivo Luria-Bertani durante cerca de 14 horas a 37°C sob agitação de 180 rpm. A quantificação da suspensão de bactérias foi feita em espectrofotômetro Cecil 3000 utilizando-se 600 nm como comprimento de onda para leitura. Considerou-se que uma unidade de absorbância neste comprimento de onda correspondia a 10⁵ bactérias/µl. Após leitura, as bactérias foram diluídas em água Milli-Q autoclavada para a concentração desejada.

Esporos de *P. larvae* foram plaqueados em meio ágar *brain-heart*. Após 3 dias as bactérias foram tiradas da placa e diluídas em 500 µl de água livre de nuclease. A

bactéria *E. coli* DH10 β cresceu por duas horas em meio líquido S.O.C. (*Super Optimal Catabolite*, composto por triptona de bactéria, extrato de levedura, cloreto de sódio e cloreto de potássio - Invitrogen) a 37°C sob agitação de 180 rpm, e, posteriormente, centrifugada por 3000 g por cinco min para formação do *pellet*. Este *pellet* foi lavado com água e posteriormente diluído em 500 μ l de água livre de nuclease.

2- Silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi)

2.1- Construção do RNA de fita dupla (dsRNA)

A metodologia de RNAi foi usada para silenciamento de *profenoloxidase*, e de *dorsal* e suas isoformas. Os *primers* usados para a construção do dsRNA variaram de 261 a 500 pares de base (pb) e às suas seqüências foi adicionada uma região do promotor T7 (Tabela I). A região usada para construção do dsRNA de profenoloxidase (dsRNA de proPO) incluiu o domínio tiol-éster, típico de Profenoloxidases. Para a construção do dsRNA de *dorsal* e suas isoformas, foram escolhidas regiões distintas de cada gene (*dorsal 1* e *dorsal 2*) e isoforma (*dorsal 1-A* e *dorsal 1-B*), para que o dsRNA tivesse alvo específico. A especificidade do dsRNA foi checada através de procura do trecho correspondente à amplificação dos *primers* no banco de dados do genoma de *A. mellifera*. Para a fabricação do dsRNA controle, foi utilizado um gene exógeno à abelha, o *green fluorescence protein (GFP)*. Para a síntese deste dsRNA, utilizou-se *primers* desenhados a partir de uma construção de GFP modificada (m-gfp5-ER) inserida dentro de um vetor (pBIN-m-gfp5-ER; Siemering *et al.*, 1996), gentilmente cedido pela professora Dra. Maria Helena Goldman.

O dsRNA foi preparado como descrito em Amdam *et al.*, 2003. Primeiramente, amplificam-se as fitas de DNA utilizando-se os *primers* com as regiões do T7, e cDNA ou clones contendo as regiões a serem amplificadas. As condições de PCR para a *proPO* foram: 45 ciclos de 94°C (30 seg), 57°C (30 seg), 72°C (30 seg), e 72°C (7 min). Para *dorsal* (genes e isoformas) e *GFP*, as condições de PCR foram: 45 ciclos de 94°C (30

seg), 60°C (45 seg), 72°C (45 seg), e 72°C (7 min). O produto de PCR foi, então, purificado utilizando-se o *kit* de purificação QIAquick™PCR (QIAGEN). Posteriormente, as fitas sense e antisense foram fabricadas a partir do DNA gerado na PCR com a utilização do *kit* de produção de RNAi (RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7/SP6, Promega) segundo instruções do fabricante. O dsRNA foi purificado com Trizol LS® (Invitrogen) para líquidos e diluído em água livre de nuclease.

O dsRNA de proPO foi utilizado nas quantidades de 5, 10 e 20 µg, assim como o dsRNA de GFP para este experimento. Diversas combinações de diferentes dsRNA foram utilizadas para o silenciamento de *dorsal*: dsRNA de dl1a (*dorsal 1-A*), dsRNA de dl1b (*dorsal -1B*), dsRNA de dl2 (*dorsal 2*), e combinações entre estes dsRNA: dsRNA de dl1a e dl1b; dsRNA de dl1a e dl2; dsRNA de dl1b e dl2; e dsRNA de dl1a, 1b e 2. Em todos os casos, a quantidade injetada foi de 5 µg de dsRNA.

Tabela I - Seqüências sense e antisense dos primers para silenciamento de *profenoloxidase*, *dorsal 1-A*, *dorsal 1-B* e *dorsal 2*. GFP foi usada como controle. A seqüência sublinhada corresponde à seqüência do T7, como parte do protocolo utilizado para a síntese do dsRNA. Seqüências desses genes estão depositadas no GenBank ou o GB foi utilizado a partir da anotação do genoma (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006; <http://annotation.hgsc.bcm.tmc.edu/HoneyBee/>- acesso restrito). Para adquirir seqüência com acesso permitido: <http://racerx00.tamu.edu/downloadFASTA.html>, usar *the Official Gene Set Release 1* e selecionar CDS como tipo de seqüência.

Gene	Número de acesso GenBank	Primer	Tamanho do amplicon (sem seqüência do T7)
<i>GFP (green fluorescence protein)</i> (controle)	U87974	Sense- 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGA</u> AGTGGAGAGGGTGAAGGTGA3' Antisense- 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGA</u> GGTAAAAGGACAGGGCCATC3'	500 pb
<i>profenoloxidase</i>	AY242387	Sense- 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGA</u> CTAGATTTACTCACTTGAACC3' Antisense- 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGA</u> CACAATAACTTGAGGCATCC3'	468 pb
<i>dorsal 1-A</i>	AY268030	Sense- 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGA</u> CAACAACCATCAATCAGAACG3'	449 pb

		Antisense- 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGA</u> TCCCGCGTTGGTTTATACAT3'	
<i>dorsal 1-B</i>	AY268031	Sense- 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGA</u> TTGGTTCGATTATTCTGAAGTGA3' Antisense- 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGA</u> CGGATACGTTTCGGTGGTAA3'	444 pb
<i>dorsal 2</i>	GB18032-RA	Sense- 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGA</u> TTCTGAAGAACCGGAATTTGA3' Antisense- 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGA</u> CAGCGTTTTCCAACAAATGA3'	261 pb

2.2- Injeção de dsRNA em pupas e adultos

O processo de RNAi foi inicializado através de injeção de dsRNA em pupas de olhos e cutícula brancos (Pw) ou adultos de abelhas. Uma micro-seringa Hamilton (1701LT) com agulha G30 (Becton Dickinson) foi utilizada para as injeções de 2 µl de solução entre o quinto e sexto segmentos do abdômen.

As abelhas recém-emergidas foram utilizadas somente nos experimentos de silenciamento de *proPO*. Os adultos foram injetados com 2 µl de dsRNA de *proPO* (10 ou 20 µg), 2 µl de dsRNA de GFP (10 ou 20 µg), ou 2 µl de água livre de nuclease. Em seguida à injeção com dsRNA ou água, as abelhas foram colocadas separadamente em pequenas caixas de madeira (descrição em Cremonez *et al.*, 1998). Após três dias, o silenciamento do gene alvo nas abelhas foi verificado através da quantificação de transcritos de *proPO* por real-time RT-PCR, e pela atividade da Fenoloxidase na hemolinfa.

Para o silenciamento de *proPO*, as pupas Pw foram injetadas com 2 µl de dsRNA de *proPO* (5, 10 ou 20 µg), 2 µl de dsRNA de GFP (5, 10 ou 20 µg), ou 2 µl de água livre de nuclease. Já para o silenciamento de *dorsal*, as pupas foram injetadas com 2 µl de dsRNA para *dorsal* e suas isoformas (5 µg), 2 µl de dsRNA de GFP (5 µg), ou 2 µl de água livre de nuclease. As pupas injetadas com dsRNA ou água foram mantidas em placas de Petri dentro de uma estufa a 34°C e 80% de umidade relativa. As pupas do experimento de dsRNA de *proPO* desenvolveram-se dentro da estufa por sete dias e a

pigmentação da cutícula foi observada durante este período. No sétimo dia de tratamento, as amostras foram coletadas para quantificação dos transcritos de *proPO* por real-time RT-PCR para se verificar silenciamento. As pupas injetadas com dsRNA para o silenciamento de *dorsal* permaneceram por três dias na estufa, e foram infectadas com bactérias no terceiro dia e permaneceram em estufa por 5 ou 48 horas até a coleta das amostras.

Os controles para se verificar a especificidade de silenciamento de *proPO* foram feitos utilizando-se amostras com silenciamento de *esterase do tipo homônio juvenil (jhe-like)* e *lacase (lac)*, gentilmente cedidas, respectivamente, pela doutoranda Aline Mackert dos Santos (FMRP-USP) e pelo mestrando Moysés Elias Neto (FFCLRP-USP), ambos do Laboratório de Biologia e Genética do Desenvolvimento de Abelhas. Rapidamente, o silenciamento de *jhe-like* foi feito injetando-se 1 µg de dsRNA de *jhe-like* em operárias recém-emergidas. As coletas foram feitas após seis dias de permanência das abelhas em caixinhas de madeira e estufa, como descritos anteriormente. O silenciamento de *lacase* foi feito injetando-se 6 µg de dsRNA de *lacase* em pupas de olhos e cutículas brancos (Pw), e as coletas foram feitas após oito dias de injeção.

3- Infecção por bactérias

3.1- Injeção

3.1.1- Injeção de água- Injúria

Para verificarmos efeito da injeção (injúria) nos experimentos de genes da resposta imune e de proteínas de estocagem, abelhas recém-emergidas receberam 1 µl de água Milli-Q autoclavada e amostras foram coletadas com 0 horas (sem injeção), 3 e 12 horas após injeção. Coletou-se hemolinfa e abdômen sem intestino; foram feitas três amostras a cada coleta, sendo que cada amostra representou quatro indivíduos.

3.1.2- Injeção de *Micrococcus luteus* - bactérias Gram-positivas

Nos experimentos para avaliação de genes da resposta imune e de proteínas de estocagem, abelhas recém-emergidas receberam injeção de 1 µl de uma solução 7×10^3 bactérias/µl. Foram feitas coletas de hemolinfa e abdômen sem intestino de abelhas com 0 horas (sem injeção), 3 e 12 horas após injeção. Na última coleta (12 horas), grande parte das abelhas estava morta. Foram feitas três amostras, sempre de abelhas vivas, a cada coleta sendo que cada amostra representou quatro indivíduos.

3.1.3- Injeção de *Serratia marcescens*- bactérias Gram-negativas

Nos experimentos de avaliação genes da resposta imune e de proteínas de estocagem, abelhas recém-emergidas receberam 1 µl de uma solução $5,58 \times 10^3$ bactérias/µl. As coletas foram feitas com 0 horas (sem injeção de bactérias) e após 3 e 12 horas. Nesta última coleta cerca de 50% das abelhas já estavam mortas. Este experimento foi realizado duas vezes. Em todos experimentos foram feitas três amostras a cada coleta sendo que cada amostra representou quatro indivíduos.

A bactéria *S. marcescens* também foi usada para infectar pupas injetadas com dsRNA de proPO e seus controles. A suspensão de bactérias (1 µl), sem diluição, foi injetada em pupas oito dias após elas receberem injeção com dsRNA ou água livre de nuclease. O efeito da infecção foi observado após seis horas de tratamento.

Estas mesmas bactérias foram utilizadas nos experimentos de imuno-senescência. Neste caso, as abelhas receberam 1 µl injeção de uma solução 10^3 bactérias/µl. Foram mantidas em estufa dentro de caixinhas de madeira, como descrito anteriormente, com alimento (pólen 30% e açúcar 70%) e água por 5 horas. Da colônia típica, foram feitas oito amostras de cada grupo infectado (recém-emergida, nutridora e forrageira), e seis ou oito amostras para cada grupo (nutridora e forrageira) da colônia *single-cohort*.

3.1.4- Injeção das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, e das Gram-positivas *Paenibacillus larvae* em abelhas com silenciamento de *dorsal*

As bactérias *E. coli* e *P. larvae* foram utilizadas para infecção, por injeção, de pupas tratadas com dsRNA. Após a injeção com dsRNA, as pupas ficaram por três dias em estufa e, então, foram infectadas. As bactérias suspensas em água foram usadas para infecção que foi feita mergulhando-se um alfinete entomológico nesta solução e picando o abdômen da abelha. Para ambas inoculações, 15 abelhas foram infectadas e o grupo controle não recebeu qualquer tipo de tratamento. Após 5 ou 48 horas, e oito a nove pupas foram coletadas individualmente para posterior análise.

3.2- Bactéria no alimento

Para infecção por alimentação nos experimentos de genes de resposta imune, abelhas recém-emergidas foram colocadas em caixinhas de madeira contendo alimento feito de pólen (30%) e açúcar (70%), e uma solução de água com bactéria *Serratia marcescens* ou *Micrococcus luteus* em uma concentração de 10^2 bactérias/ μ l. As abelhas controles receberam o alimento de pólen e açúcar, e água sem bactéria. As coletas foram feitas após 6, 12, 48 e 72 horas. Coletou-se hemolinfa e abdômen sem intestino e foram feitas duas (48 e 72 horas) ou três (6 e 12 horas) amostras a cada coleta sendo que cada amostra foi representativa de dois (6 e 12 horas) ou três (48 e 72 horas) indivíduos.

A susceptibilidade de abelhas adultas injetadas com dsRNA de proPO foi analisada após infecção de *S. marcescens* em abelhas previamente injetadas com dsRNA de proPO ou água livre de nuclease. As injeções de dsRNA de proPO, dsRNA de GFP ou água foram feitas imediatamente após emergência, e as abelhas foram alimentadas com bactérias do terceiro ao oitavo dia de vida adulta. Durante os oito dias, as abelhas foram mantidas em estufa dentro de caixinhas de madeira, a 34°C e 80% de umidade relativa, onde receberam uma dieta com 30% de pólen e 70% de açúcar, e água contendo bactéria (10^2 bactérias/ μ l em uma suspensão de 1% de açúcar). As abelhas

mortas foram contadas e removidas diariamente, para posterior construção da curva de sobrevivência Cox (descrito no item *Análise estatística*).

Nos experimentos envolvendo diferentes tipos de alimentação e infecção via ingestão, abelhas recém-emergidas foram colocadas em caixinhas de madeira contendo, cada uma, diferentes tipos de alimentos (descritos no item *Alimentação diferencial*) e uma solução de água com bactéria *S. marcescens* em uma concentração de 10^2 bactérias/ μl por quatro dias e 10^3 bactérias/ μl por dois dias. As abelhas controles receberam água sem bactéria. As coletas de hemolinfa e abdômen sem intestino (em 500 μl de Trizol) foram feitas após seis dias. Foram coletadas 12 abelhas de cada grupo, sendo que quatro formaram um *pool*. Assim, cada grupo foi representado por três amostras contendo 12 abelhas no total.

Para a avaliação de sobrevivência das abelhas provenientes da colônia típica ou da *single-cohort*, dos experimentos de imuno-senescência, cerca de 30 as abelhas de cada grupo (recém-emergidas, nutridoras e forrageiras) foram alimentadas com uma solução de 10^2 bactérias/ μl de *S. marcescens* e mantidas em caixinhas por 8 a 10 dias. A alimentação com bactéria foi feita apenas nos dois ou três primeiros dias. Diariamente, as abelhas mortas foram retiradas e computadas para posterior construção do gráfico de sobrevivência (Kaplan-Meier, descrito no item *Análise estatística*).

4- Alimentação diferencial

Para os experimentos de imunidade em abelhas alimentadas com diferentes dietas, abelhas recém-emergidas foram mantidas em estufa e divididas em grupos com três tipos de alimentação diferentes: xarope (50% de açúcar em água), *beebread* (30% de pólen coletado das colônias em 70% de xarope) e geléia real (30% de geléia real em 70% de xarope). Destas abelhas um grupo recebeu água com a bactéria *S. marcescens* (como descrito anteriormente) e o outro grupo recebeu somente água.

5- Purificação do RNA total e síntese de cDNA

O RNA total de todos experimentos foi isolado utilizando-se 1 ml ou 500 µl de reagente Trizol e o protocolo de extração utilizado foi o recomendado pelo fabricante. No experimento de silenciamento de *proPO*, para que o RNA ficasse mais puro, sem diminuir muito a quantidade, à metodologia do Trizol foi adicionada a extração por colunas. Rapidamente, após a centrifugação da mistura de Trizol com o clorofórmio, segundo instruções do fabricante, adicionou-se etanol 70% ao sobrenadante. Desta mistura o RNA total foi purificado utilizando-se o RNeasy® Mini Kit (Qiagen), segundo instruções do fabricante. Em alguns experimentos, a fase contendo proteína (fase rosa do Trizol, depois do sobrenadante, contendo o RNA, ter sido retirado) foi estocada a -80°C para posterior purificação de proteína. O RNA obtido foi ressuspenso em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% para evitar degradação. O RNA total foi tratado com DNase da Invitrogen (1 µl de DNase diluída 10 vezes em água DEPC 0,1%) por 40 min a 37°C e 15 min a 70°C para inativação da enzima. Após tratamento com DNase, o RNA foi quantificado em espectrofotômetro GeneQuant RNA/DNA Calculator ou NanoDrop (ND-1000). Considerou-se que uma unidade de absorvância neste comprimento de onda correspondia a 40 µg/ml de RNA. Quando necessário, as amostras foram armazenadas a -80°C.

RNA total (1 a 3 µg) e oligo-dT₍₁₂₋₁₈₎ foram usados para a síntese do cDNA através da metodologia da SuperScript II (Life Technologies). Exceto para o experimento de silenciamento de *dorsal*, onde utilizou-se cerca de 8 µl de RNA total para a síntese de cDNA.

6- Quantificação de transcritos

A quantificação de RNA mensageiro de diversos genes envolvidos na resposta imune de abelhas foi feita por real-time RT-PCR ou RT-PCR semiquantitativa. Para estas metodologias foram usados *primers* desenhados sobre a seqüência de peptídeos antimicrobianos e de outros genes relacionados à imunidade (Tabela II). Os *primers*

foram desenhados para amplificação de fragmentos de até aproximadamente 150 pares de bases para o uso em real-time RT-PCR.

Tabela II - Seqüências *sense* e *antisense* dos *primers* dos genes endógenos (E), de peptídeos (P) e de outros genes relacionados à resposta imune tais como genes efetores (EF), de sinalização intracelular (S), de reconhecimento de patógenos (RP), de proteínas de estocagem (PE) e da via de sinalização da insulina (SI). As seqüências desses genes estão depositadas no GenBank ou o GB foi utilizado a partir da anotação do genoma (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006).

Gene	Categoria (função do gene)	Número de acesso GenBank ou GB	Primer	Tamanho do amplicon
<i>actina</i>	E	AB023025	Sense- 5'TGCCAACACTGTCCTTTCTG3' Antisense- 5'AGAATTGACCCACCAATCCA3'	156 pb
<i>actina</i> (usada nos experimentos de silenciamento dorsal)	E	AB023025	Sense- 5'TTGTATGCCAACACTGTCCTTT3' Antisense- 5'TGGCGCGATGATCTTAATTT3'	120 pb
<i>ribosomal protein 49</i> (<i>rp49</i>)	E	AF441189	Sense- 5'CGTCATATGTTGCCAACTGGT3' Antisense- 5'TTGAGCACGTTCAACAATGG3'	150 pb
<i>abaecina</i>	P	U15954	Sense- 5'GCACTACTCGCCACGATATG3' Antisense- 5'GGCCATTTAATTTTCGGATTG3'	125 pb
<i>abaecina</i> (usada nos experimentos de silenciamento dorsal)	P	AF442147	Sense- 5'CAGCATTTCGCATACGTACCA3' Antisense- 5'GACCAGGAAACGTTGGAAAC3'	69 pb
<i>defensina-1</i> (referido como <i>defensina</i> no texto)	P	U15955	Sense- 5'CTGCACCTGTTGAGGATGAA3' Antisense- 5'GCGCAAGCACTGTCATTAAC3'	127 pb
<i>defensina-1</i> (usada nos experimentos de silenciamento dorsal)	P	U15955	Sense- 5'TGCGCTGCTAACTGTCTCAG3' Antisense- 5'AATGGCACTTAACCGAAACG3'	119 pb
<i>hymenoptaecina</i>	P	U15956	Sense- 5'GTCGTCCATCCTTGGACATT3' Antisense- 5'TTTCCCAAACCTCGAATCCTG3'	134 pb
<i>profenoloxidase</i> (<i>proPO</i>)	EF	AY242387	Sense- 5'AGATGGCATGCATTTGTTGA3' Antisense- 5'TTGC GTT GTT GATTGGTTGT3'	131 pb
<i>transferrina</i> (<i>trf</i>)	EF	AY336529	Sense- 5'GATGGCAAAGGAGACGTAGC3' Antisense- 5'GTTCCAGTCCCAAGTTGCAT3'	144 pb

<i>dorsal -1A</i> (<i>dl 1-A</i>)	S	AY268030	Sense- 5'TTGTATCCGATGGCAACAAC3' Antisense- 5'TGAGGTGATGGTTGTGATTGA3'	140 pb
<i>dorsal-1B</i> (<i>dl 1-B</i>)	S	AY268031	Sense- 5'TGGAAGGAGATGAAACACCA3' Antisense- 5'TCTTTCCATCTTCCACAGGA3'	144 pb
<i>cactus-2 (IkB)</i> (referido como <i>cactus</i> no texto)	S	GB13520-RA	Sense- 5'ACGCCAGAGAAGGATTAGCA3' Antisense- 5'CCGTCTGATATGCGGTTTTTC3'	144 pb
<i>relish</i>	S	GB13742-RA	Sense- 5'GGAGCTGATCCAAATCGAAC3' Antisense- 5'AGTGGCATCCATCCATCATT3'	146 pb
<i>PGRP-S3</i> (referido como <i>PGRP</i> no texto)	S	GB17879-RA	Sense- 5'ATACGAAGGTTGTGGCTGGA3' Antisense- 5'TGTGCAGCATTTAGCATTTTG3'	129 pb
<i>GNBP-1</i> (referido como <i>GNBP</i> no texto)	S	GB19961-RA	Sense- 5'GTGGATGGCAAAGAATTTGG3' Antisense- 5'TCCCATCAGGAAATACACGA3'	148 pb
<i>lipoforina I/II</i> (<i>lp I</i>)	PE	XM_392490	Sense- 5'AGCGAAGAGGATCGCAGATA3' Antisense- 5'AACCCTTCGTTCTCCTTTTC3'	149 pb
<i>lipoforina III</i> (<i>lp III</i>)	PE	GB20117-RA	Sense- 5'TCTGACAAAGCTGCGAAATC3' Antisense- 5'- AGTTGCGGCAGTTTGAAGTT-3'	138 pb
<i>vitelogenina</i> (<i>vg</i>)	PE	AJ517411	Sense- 5'GCAGAATACATGGACGGTGT3' Antisense- 5'GAACAGTCTTCGGAAGCTTG3'	146 pb
<i>hexamerina 70a</i> (<i>hex 70a</i>)	PE	GB15552-RA	Sense- 5'GCTGGTATCTGAATCACGATT3' Antisense- 5'CACGATAATCCGGCAATTG3'	148 pb
<i>bombyxina</i>	SI	GB10174-RA	Sense- 5'GGAGAGGATGATTATATGGCATT3' Antisense- 5'CCTTTAGAGTTTCTTCGAAATCGT3'	107 pb
<i>peptídeo do tipo</i> <i>insulina</i>	SI	GB17332-RA	Sense- 5'TGCAAGGGTCGTGGATAACAAC3' Antisense- 5'TCAAGCTGAGCATAGCTGCA3'	119 pb

6.1- Real-time RT-PCR

O cDNA diluído 5 ou 10 vezes foi usado para análise por real-time RT-PCR. A detecção da amplificação foi feita com o uso de SYBR® Green I Dye (Applied Biosystems) e do aparelho ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System (SDS) (Applied Biosystems). Para isto, utilizou-se 12,5 µl do SYBR Green PCR Master Mix; 1 µl de cada

primer 10 μ M; 1 μ l de cDNA (diluído 10 vezes); 9,5 μ l de água Milli-Q autoclavada. Cada amostra foi amplificada duas ou três vezes e a qualidade da amplificação foi analisada pela curva de dissociação. Na quantificação de transcritos nos experimentos de silenciamento de *dorsal* utilizou-se a metodologia de SYBR® Green I Dye, mas a real-time PCR foi feita com componentes separados: 0,6 U de Taq com seu tampão 10x (Roche Applied Science); 0,8 mM dNTP mix; 4 μ M de cada *primer*; 2 mM Rox (Invitrogen); 0,04 μ l de SYBR® Green I Dye (10.000x concentrado em DMSO- Molecular Probes - Invitrogen); 1 μ l de cDNA (diluído 5 vezes) para um volume de reação de 20 μ l.

A quantificação dos transcritos do gene alvo foi calculada a partir da diferença dos valores de Ct (*threshold PCR cycle*) em relação aos transcritos dos genes endógenos, *actina* ou *rp49*, de acordo com instruções do *User Bulletin #2* (Applied Biosystem). Primeiramente são feitas as médias dos Ct das duas ou três leituras de cada amostra, tanto do gene alvo quanto do gene endógeno. De cada amostra, subtrai-se o valor da média de $Ct_{\text{gene alvo}}$ do $Ct_{\text{gene endógeno}}$, obtendo-se o ΔCt . Posteriormente escolhe-se um ΔCt que corresponda a um calibrador e normalizam-se todos valores subtraindo pelo ΔCt escolhido. Obtemos então, o $\Delta \Delta Ct$. Finalmente, o valor final de quantificação relativa é dado pelo $2^{-\Delta \Delta Ct}$, onde o calibrador ou amostra padrão escolhida é igual a um.

Esta metodologia foi também utilizada nos experimentos de silenciamento de *proPO* e *dorsal* (genes e isoformas) para se verificar a diminuição de transcritos nas abelhas injetadas com dsRNA e seus respectivos controles. Para isto foram desenhados *primers* específicos, para os genes usados para no silenciamento, em uma região fora da seqüência utilizada para a construção do dsRNA. Os *primers* estão descritos na Tabela III.

Tabela III - Seqüências *sense* e *antisense* dos *primers* utilizados na verificação de silenciamento por RNA de interferência.

Gene	Número de acesso GenBank ou GB	Primer	Tamanho do amplicon
<i>profenoxidase</i>	AY242387	Sense- 5'AGATGGCATGCATTTGTTGA3' Antisense- 5'TTGCGTTGTTGATTGGTTGT3'	131 pb
<i>dorsal -1A</i>	AY268030	Sense- 5'ACAGGCAGAAGCTGAGAAGC3' Antisense- 5'TTGCCATCGGATACAAGGAT3'	143 pb
<i>dorsal 1-B</i>	AY268031	Sense- 5'AGGCCTGCTTTCTGGTCTTT3' Antisense- 5'CGCGGAAATTTCCGGAGTAAC3'	122 pb
<i>dorsal 2</i>	GB18032-RA	Sense- 5'- TCGTTAAAACGAAAGAAACGA3' Antisense- 5'TCCGACTGAAGAACATTCAAA3'	126 pb

6.2- RT-PCR semiquantitativa

Para quantificação por RT-PCR semiquantitativa, o cDNA foi diluído 10 vezes e a PCR foi padronizada de acordo com as concentrações das amostras e especificações dos *primers*. Os genes analisados por esta metodologia foram: *PGRP* (*PGRP-S3*), *GGBP* (*GGBP-1*), *cactus* (*cactus-2*) e *relish*. As PCRs foram feitas com 25 ciclos de 94°C por 30 seg; 60°C por 30 seg; 72°C por 30 seg. Para as análises utilizamos *rp49* como controle endógeno. O produto da PCR foi visualizado após eletroferese em gel de agarose 1% em tampão TBE (tris-borato-EDTA), e corado com brometo de etídio. As intensidades das bandas foram medidas através de densitometria pelo programa Kodak 1D Image Analysis.

7- Purificação de proteínas e quantificação de proteínas

As proteínas foram purificadas do reagente Trizol após a purificação do RNA total. O protocolo de extração utilizado foi o recomendado pelo fabricante. O *pellet* de proteína foi ressuspensão em SDS 1%. A concentração de proteína nas amostras foi determinada com o uso de ácido bicinonínico de acordo com a metodologia de Smith *et al.* (1985).

Após um intervalo de 30 min a 37°C, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 562 nm. As proteínas foram utilizadas em gel de SDS-PAGE ou Western blot.

8- Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Tanto para a análise qualitativa do perfil protéico quanto para posterior análise por Western blot, as proteínas da hemolinfa ou proteínas purificadas do abdômen utilizando-se reagente Trizol, foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 7,5%, segundo Laemmli (1970). Para análise de perfil protéico foi usado para os géis 1 µl de hemolinfa diluída 10 vezes, e 5 µg de proteína para Western blot. Os géis de perfil protéico foram impregnados com nitrato de prata, de acordo com o método proposto por Caetano-Anollés & Gresshoff (1994).

9- Western blot

As proteínas (5 µg) depois de separadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 7,5% foram transferidas para membranas de PVDF (Immun-Blot™ PVDF Membrane for Protein Blotting). Seguiu-se, então, a marcação com anticorpo primário contra proteínas do ovo de *A. mellifera* desenvolvido em coelho (Bitondi & Simões, 1996) diluído 1:2500 ou contra Hexamerina 70a na diluição de 1:3000. O anticorpo secundário diluído 1:12000 (anti-rabbit IgG) usado, assim como o sistema de detecção, foi do *kit* ECL™ Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences).

10- Atividade da Fenoloxidase

A atividade da Fenoloxidase foi quantificada em hemolinfa de operárias adultas injetadas com 10 µg de dsRNA de proPO e seus controles injetados com água livre de nuclease. Os experimentos foram feitos a partir de uma típica mistura de reação contendo 2 µl de hemolinfa; 0,01 M de cacodilato de sódio pH 7,0; 0,2 U de tripsina e 20 mM de dopamina em um volume final de 100 µl. Primeiramente foram misturados a

hemolinfa, o tampão cacodilato e a tripsina, e após 10 minutos adicionou-se a dopamina. A absorvância foi medida a 490 nm durante 60 minutos.

11- Radioimunoensaio (RIA) para hormônio juvenil

A quantificação de hormônio juvenil nas abelhas da colônia *single-cohort* foi feita através da metodologia de RIA, utilizando-se o método de extração do hormônio juvenil a partir da hemolinfa (Huang *et al.*, 1994). Rapidamente, 2-3 µl de hemolinfa foram colocados em 500 µl de acetonitrila em tubos de vidro, misturadas e centrifugadas (7500 rpm a 4°C por 3 minutos). Ao sobrenadante foi adicionado 1 ml de NaCl 0,9% e 1 ml de hexano. Esta mistura foi cuidadosamente agitada e mantida em gelo por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (7500 rpm a 4°C por 5 minutos) e tiveram o sobrenadante (fase hexano) transferido para novos tubos, e o procedimento foi repetido duas vezes. Assim, 3 ml de hexano mais o hormônio juvenil presente no tubo foram secos utilizando-se centrifugação a vácuo (*SpeedVac*). O resíduo foi, então, dissolvido em 75 µl de tolueno, e antes de começar o radioimunoensaio as amostras foram secas.

Para a construção da curva padrão, foram usados 0,5; 1; 2; 5; 10; 50 e 100 µl de solução de hormônio juvenil III (HJ III; 100 ng/ml de etanol), e secos. Aos tubos das amostras e da curva padrão, foram acrescentados 50 µl de solução *tracer* (solução de ³H-HJ III com atividade de 6500 cpm por 50 µl de tampão fosfato 0,1 M; pH 7,2 e 0,02% de azida sódica). O HJ III foi usado como um ligante não-radioativo. O procedimento de RIA foi feito seguindo-se o protocolo estabelecido por Goodman *et al.* (1990). Os títulos de hormônio juvenil foram expressos como HJ III (pg/µl de hemolinfa)

12- Alinhamento de seqüências

Para as análises de Dorsal, tanto as seqüências de nucleotídeos quanto às de proteínas adquiridas em bancos de dados foram alinhadas utilizando-se o algoritmo de alinhamento múltiplo Clustal W (1.83).

13- Análise estatística

O teste utilizado nas análises de quantificação de transcritos foi Anova-One-Way seguido do teste de Student-Newman-Keuls ou Tukey para as comparações aos pares com o uso do programa MedCalc 8.2.1.0, JMP 3.2.6 ou SigmaStat 2.0. Nas amostras de injeção as comparações foram feitas entre as coletas (0, 3 e 12h) de cada gene. Nas amostras de infecção por alimentação, as análises foram feitas entre os grupos (controle, Sm e MI, que eram comparáveis) por coleta (6, 12, 48 e 72h). O mesmo procedimento foi adotado em experimentos em que as coletas foram simultâneas, como as análises das amostras Si (sem injeção), H₂O (injeção com água), Sm (injeção com *S. marcescens*) e MI (injeção com *M. luteus*) com relação aos transcritos de *defensina* e proteínas de estocagem. Com relação aos experimentos de imuno-senescência, os testes foram feitos comparando-se o tratamento e o controle de cada grupo de abelhas.

No experimento de silenciamento de *proPO*, os níveis de expressão de abelhas individuais injetadas com dsRNA de *proPO* foram analisados utilizando-se um teste estatístico numérico no Matlab 6.5. Neste teste, as médias e desvios da distribuição do controle foram usados para simular uma distribuição normal. Cada distribuição foi representada por mil valores e os valores individuais de expressão das abelhas injetadas com dsRNA de *proPO* foram comparados à distribuição da simulação do controle. Uma abelha injetada com dsRNA de *proPO* foi, desta maneira, considerada com diminuição significativa de transcritos de 5% ($p < 0,05$) se seu valor de expressão foi igual ou menor que 5% dos valores obtidos da distribuição do controle. Teste do qui-quadrado ($p < 0,05$, Sigma Stat 3.1) foi usado pra se comparar o número de abelhas com melanização da hemolinfa do grupo tratado com o grupo controle.

Para análise e construção das curvas de sobrevivência foi utilizado método de Kaplan-Meier do programa MedCalc 8.2.1.0., exceto para as análises de sobrevivência nos experimentos de silenciamento de *profenoxidase* em que se aplicou o teste de sobrevivência Cox do programa Statistica 6.0.

Resultados

1- Genes de resposta imune em abelhas infectadas por bactérias

A análise de expressão de genes preditos como participantes da via de sinalização intracelular Toll e Imd em *A. mellifera* foi feita a partir do estudo em abelhas infectadas com bactérias do tipo Gram-positiva representada por *Micrococcus luteus* e Gram-negativa, por *Serratia marcescens*. Para tal, foram realizadas duas estratégias de infecção: por injeção das bactérias diretamente na hemocele e pela alimentação, em que as bactérias atravessam o aparelho digestório atingindo a hemocele. Nestes experimentos foram avaliadas três categorias de genes: os codificadores de proteínas efetoras (peptídeos antimicrobianos, *transferrina*, *profenoloxidase*) de sinalização intracelular (*dorsal 1-B*, *cactus* e *relish*) e de reconhecimento de microorganismos (*PGRP* e *GNBP*).

1.1- Infecção por injeção

Foram feitos três experimentos com injeção: 1- injeção com água, ou seja, injúria; 2- injeção com *M. luteus*; e 3- injeção com *S. marcescens*. Em todos os experimentos foram coletadas amostras após 3 e 12 horas e estas comparadas às amostras de 0 horas, sendo o controle sem injeção.

Abelhas recém-emergidas receberam injeção de água para verificarmos o efeito da injúria na expressão de genes relacionados à resposta imune. A injúria foi capaz de aumentar a quantidade de transcritos dos peptídeos. A expressão de *abaecina* e *defensina* aumentou após 3 e 12 horas (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$), já a expressão de *hymenoptaecina* foi maior somente após 12 horas de injúria (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$) (Figura 3A). O aumento de expressão após 12 horas com relação à 0 horas foi de cerca de: 52,5 vezes para *abaecina*, 10,3 para *hymenoptaecina* e 117,9 para *defensina* (Tabela IV).

Em abelhas injetadas com a bactéria Gram-positiva *M. luteus*, foi observado aumento na quantidade de transcritos de todos os peptídeos após 12 horas de tratamento, e aumento de expressão de *abaecina* e *defensina* após 3 horas (ANOVA;

$p < 0,05$; $n=3$). A quantidade de transcritos de *abaecina* foi cerca de 88,7 vezes maior em 12 horas (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$), de *hymenoptaecina* foi de 18,6 vezes (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$) e *defensina*, 92,7 vezes (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$) (Figura 3B, Tabela IV).

O efeito da injeção de uma bactéria Gram-negativa *S. marcescens* foi analisado através da expressão dos genes dos peptídeos Abaecina, Hymenoptaecina e Defensina, quando analisados separadamente. Os genes destes peptídeos antimicrobianos apresentaram maior expressão após 3 e 12 horas de infecção (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$) (Figura 3C). O número de vezes de aumento de expressão após 12 horas foi de cerca de: 433,5 para *abaecina*, 187,2 para *hymenoptaecina* e 427 para *defensina* (Tabela IV).

Entre os outros genes efetores nas amostras de abelhas que receberam somente injeção de água, os níveis transcritos da *profenoloxidase* não alteraram (ANOVA; $p=0,516$; $n=2$), mas houve aumento de expressão da *transferrina* (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$) em abelhas com 12 horas de injúria. O fator de transcrição *dorsal 1-B* também teve maior transcrição após 12 horas (ANOVA; $p < 0,05$; $n=2$) (Figura 4A).

Em abelhas infectadas com *M. luteus*, os níveis de transcritos de *transferrina* aumentaram com este tipo de tratamento (12 horas após tratamento, ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$), mas nenhuma alteração significativa foi observada para os níveis de transcritos de *dorsal 1-B* (ANOVA; $p=0,329$; $n=2$) e *profenoloxidase* (ANOVA; $p=0,127$; $n=2$) (Figura 4B).

A análise destes mesmos genes, em abelhas injetadas com *S. marcescens*, mostrou o mesmo perfil observado com a infecção por *M. luteus*, ou seja, houve aumento somente na quantidade de transcritos da *transferrina* (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$), enquanto que os níveis de transcritos de *dorsal 1-B* e *profenoloxidase* não apresentaram alteração significativa, apesar dos níveis de transcritos do gene desta enzima se apresentarem menor após infecção com *S. marcescens* (Figura 4C).

Com relação aos outros genes de sinalização (*cactus* e *relish*) e de reconhecimento de microorganismos (*PGRP* e *GNBP*), somente os níveis de transcritos de *cactus* foram maiores em 3 e 12 horas em abelhas que sofreram injúria (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$) (Figura 5A).

Quando estes mesmos genes foram analisados em abelhas com infecção por *M. luteus*, observou-se que a quantidade de transcritos de *GNBP*, *cactus* e *relish* aumentou (ANOVA; $p < 0,05$; $n=2$). Este aumento foi em abelhas com 3 horas (*GNBP* e *cactus*) e 12 horas (*GNBP*, *cactus* e *relish*) de tratamento (Figura 5B).

Em abelhas infectadas com bactérias *S. marcescens*, ocorreu regulação positiva somente dos genes *cactus* (após 3 e 12 horas) e *relish* (após 12 horas) (ANOVA; $p < 0,05$; $n=2$) (Figura 5C).

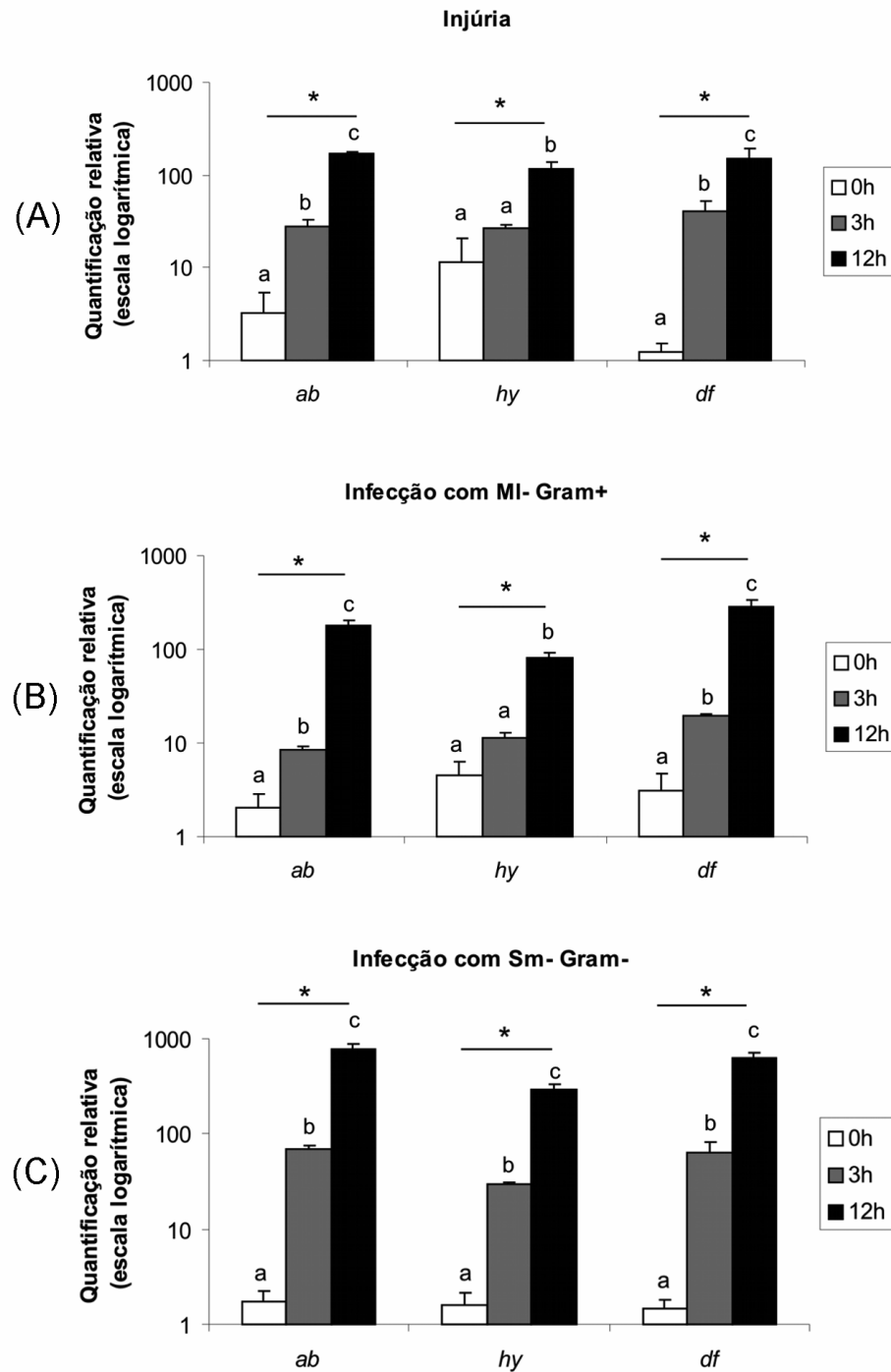


Figura 3- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de *abaecina* (*ab*), *hymenoptaecina* (*hy*) e *defensina* (*df*) em abelhas *Apis mellifera* recém-emergidas injetadas com água **(A)**, injetadas com *Micrococcus luteus* – Gram-positiva **(B)** e injetadas com *Serratia marcescens* – Gram-negativa **(C)**. Foi usada *actina* como controle endógeno. O gráfico foi gerado a partir de quantificação de três amostras (n=3). Cada amostra representa quatro indivíduos. Gráfico: média + erro padrão. Asterisco: representa grupo com expressão significativamente diferente ($p < 0,05$) entre as coletas (0, 3 e 12h). Letras: diferenças estatísticas entre as coletas ($p < 0,05$).

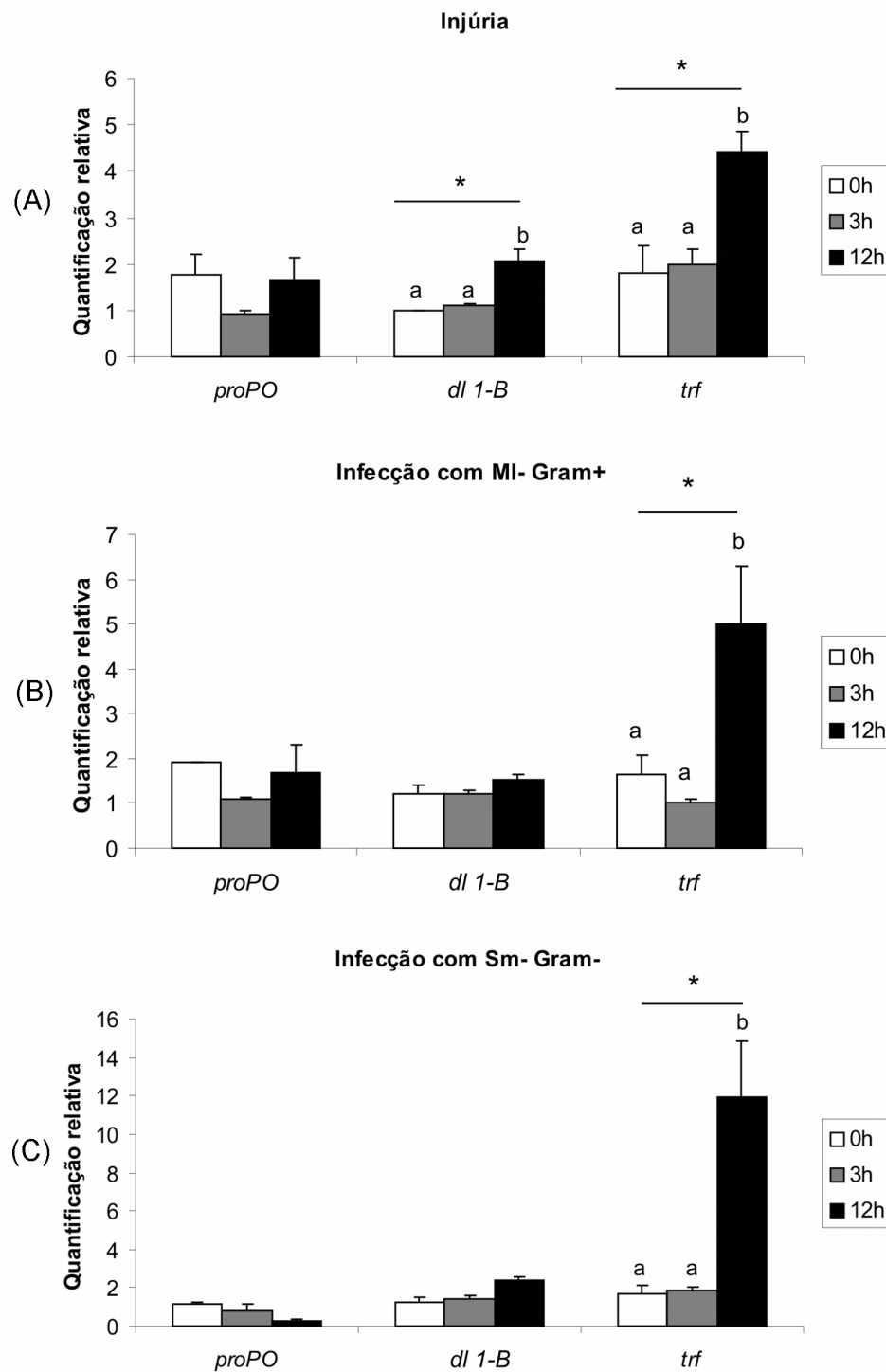


Figura 4- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de *profenoxidase* (*proPO*), *dorsal 1-B* (*dl 1-B*) e *transferrina* (*trf*) em abelhas *Apis mellifera* recém-emergidas injetadas com água (A), injetadas com *Micrococcus luteus* – Gram-positiva (B) e injetadas com *Serratia marcescens* – Gram-negativa (C). Foi usada *actina* como controle endógeno. O gráfico foi gerado a partir de quantificação de duas ou três amostras (n=2 ou 3). Cada amostra representa quatro indivíduos. Gráfico: média + erro padrão. Asterisco: representa grupo com expressão significativamente diferente ($p < 0,05$) entre as coletas (0, 3 e 12h). Letras: diferenças estatísticas entre as coletas ($p < 0,05$).

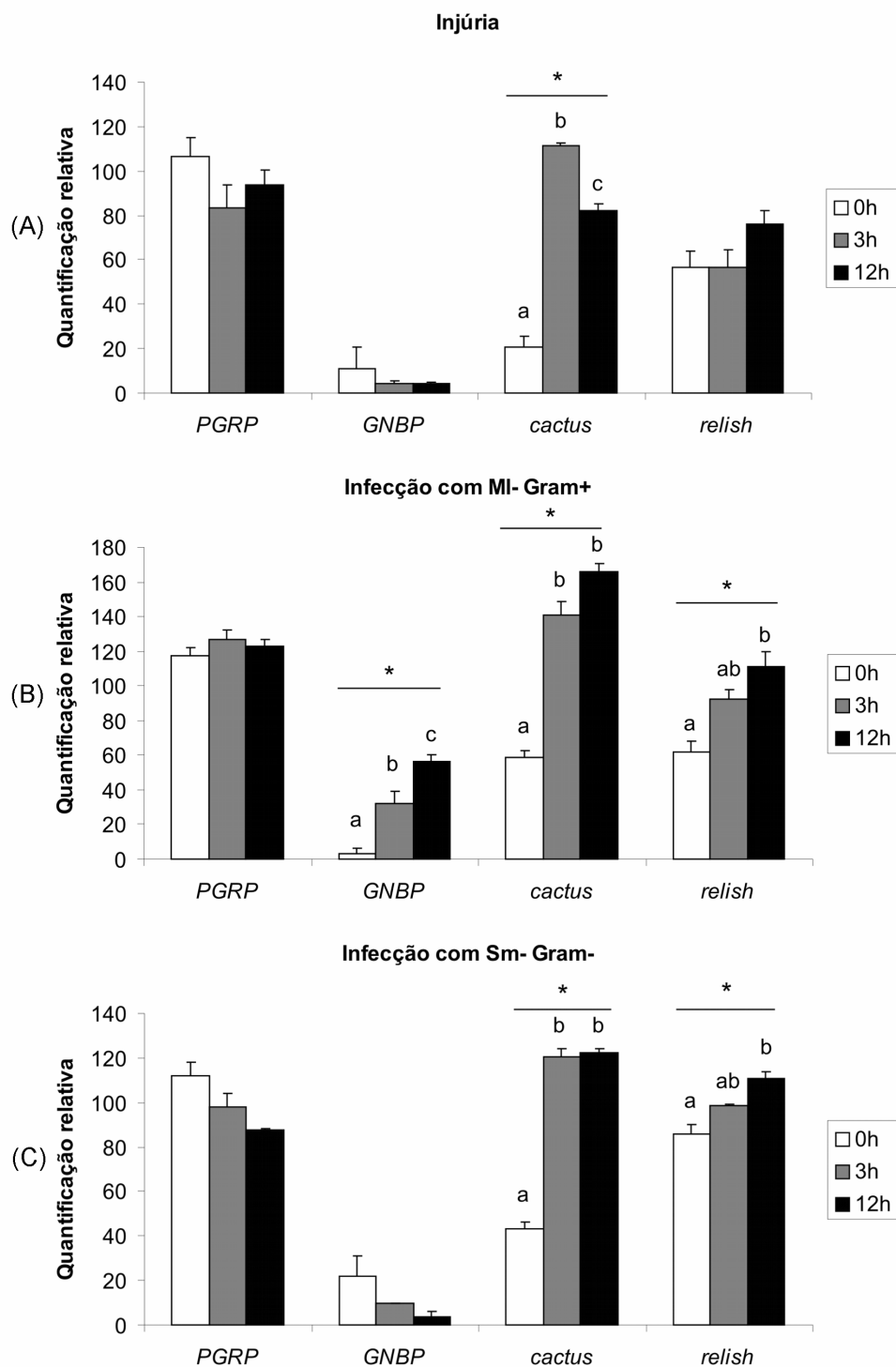


Figura 5- Quantidade relativa por RT-PCR semiquantitativa de transcritos de *PGRP*, *GGBP*, *cactus* e *relish* em abelhas *Apis mellifera* recém-emergidas injetadas com água (A), injetadas com *Micrococcus luteus* – Gram-positiva (B) e injetadas com *Serratia marcescens* – Gram-negativa (C). Foi usado *rp49* como controle endógeno. O gráfico foi gerado a partir de densitometria da imagem no gel das bandas das duas amostras de cada coleta (0h, 3h e 12h). Cada amostra representa quatro indivíduos. Gráfico: média + erro padrão. Asterisco: representa grupo com expressão significamente diferente ($p < 0,05$) entre as coletas (0, 3 e 12h). Letras: diferenças estatísticas entre as coletas ($p < 0,05$).

Como os experimentos de injeção de água e de bactérias foram feitos separadamente e em períodos distintos, as abelhas controles (0 horas) apresentaram variação na quantidade de transcritos dos genes aqui analisados (Figura 3-5), muito provavelmente por diferenças nas linhagens ou condições distintas das colônias. Assim, para se avaliar alteração na expressão gênica de abelhas infectadas, foi feita uma comparação entre as amostras de 3 e 12 horas com seu respectivo controle de 0 horas. Na Tabela IV tem-se, assim, uma comparação entre os tratamentos (injúria, *M. luteus* e *S. marcescens*) com relação ao aumento de transcrição dos genes. O número de vezes do aumento de expressão dos genes foi calculado a partir das médias de expressão gênica de abelhas tratadas após 3 e 12 horas com relação a 0 horas. Em 12 horas de tratamento foi o período que se pôde observar maior aumento na quantidade de transcritos. Este aumento de transcrição pôde ser claramente constatado para os peptídeos, sendo que os tratamentos com bactérias proporcionaram, de maneira geral, maior aumento de transcrição dos genes *abaecina*, *hymenoptaecina* e *defensina*, com relação às abelhas que sofreram somente injúria. A quantidade de transcritos do gene *PGRP* e *proPO* não alterou significativamente em nenhum dos tratamentos. Em relação ao gene da *transferrina*, os tratamentos com bactéria também provocaram maior aumento na transcrição após 12 horas, quando comparado com os resultados da injúria. Neste caso, a infecção com *S. marcescens* provocou maior resposta da abelha ao ativar a transcrição de *transferrina*. A quantidade de transcritos de *cactus*, apesar do aumento de transcrição nos três tipos de tratamento, foi maior em abelhas injetadas com água somente. O gene *GNBP* apresentou aumento em transcrição somente após tratamento com bactéria Gram-positiva (*M. luteus*). Já a quantidade de transcritos de *relish* foi maior em abelhas tratadas com os dois tipos bactérias.

Tabela IV- Quantidade de transcritos após tratamento (abelhas injetadas com água – injúria, *M. luteus* – MI ou *S. marcescens* – Sm). Os números representam a expressão, em vezes, após 3 e 12 horas do tratamento relacionado com o grupo de abelhas não injetadas (0 horas). Para os cálculos foram utilizados os valores das médias. Em destaque: grupos que tiveram aumento significativo na quantidade de transcritos (ANOVA; $p < 0,05$). Genes: *abaecina* (*ab*), *hymenoptaecina* (*hy*), *defensina* (*df*), *profenoloxidase* (*proPO*), *dorsal 1-B* (*dl1-B*), *transferrina* (*trf*), *PGRP*, *GNBP*, *cactus* e *relish*.

Tratamento	<i>ab</i>	<i>hy</i>	<i>df</i>	<i>proPO</i>	<i>dl1-B</i>	<i>trf</i>	<i>PGRP</i>	<i>GNBP</i>	<i>cactus</i>	<i>relish</i>
Injúria-3h	8,7	2,3	33,0	0,5	1,1	1,1	0,8	0,4	5,3	1,0
MI- 3h	4,0	2,5	6,6	0,6	1,0	0,6	1,1	9,3	2,4	1,5
Sm- 3h	38,5	18,4	43,3	0,7	1,2	1,2	0,9	0,4	2,8	1,1
Injúria- 12h	52,5	10,3	117,9	0,9	2,1	2,5	0,9	0,4	3,9	1,3
MI- 12h	88,7	18,6	92,7	0,9	1,3	3,0	1,0	16,3	2,8	1,8
Sm- 12h	433,5	187,2	427,0	0,2	1,9	7,1	0,8	0,1	2,8	1,3

1.2- Infecção por alimentação

Bactérias Gram-positivas *M. luteus* ou bactérias Gram-negativas *S. marcescens* foram adicionadas ao alimento de abelhas recém-emergidas a fim de se promover infecção eliminando, assim, o fator injúria. As coletas das amostras foram feitas após 6, 12, 48 e 72 horas de tratamento.

As análises estatísticas foram feitas dentro de cada período de coleta após a infecção. Entretanto, pouco se pôde observar com relação à alteração de transcritos dos peptídeos nas abelhas que foram alimentadas com bactérias (Figura 6A-C).

Nas primeiras horas de infecção, 6 e 12 horas, parece haver aumento na quantidade de transcritos dos peptídeos, mas somente os níveis de transcritos de *defensina* aumentaram significativamente após 6 horas de tratamento tanto com *M. luteus* quanto com *S. marcescens* (ANOVA; $p < 0,05$; $n=2$) (Figura 6B). Neste caso, o tratamento com bactéria Gram-positiva (MI) causou maior transcrição da *defensina* que tratamento com bactéria Gram-negativa (Sm).

De maneira geral, observou-se uma diminuição na quantidade de transcritos de peptídeos em 48 e 72 horas quando comparados os tratamentos com o controle (Figura 6 A-C). No entanto, foi observada também uma grande variação entre as amostras, fato que poderia explicar uma diferença não significativa entre tratamento e controle (ANOVA; 48 horas: $p=0,446$; 72 horas: $p=0,604$; $n=2$).

A análise de outros genes envolvidos em resposta imune, como *profenoxidase*, *dorsal 1-B* e *transferrina*, revelou que nenhum dos genes teve alteração significativa na quantidade de transcritos ($p > 0,1$; ANOVA; $n=2$) (Figura 7A-C). Apesar das alterações não serem significativas, parece haver aumento nos níveis de transcritos de *profenoxidase* e *transferrina* em 6 horas de tratamento. No entanto, os níveis de transcritos de *profenoxidase* diminuíram bastante em abelhas que foram expostas às bactérias por mais tempo, como 48 horas (Figura 7A). O perfil de expressão de *dorsal 1-B* também mudou em abelhas contaminadas por mais tempo, já que com 6 horas a quantidade de transcritos diminuiu e com 12 horas, aumentou (Figura 7B).

Os transcritos dos genes da via sinalização intracelular *PGRP*, *GNBP*, *cactus* e *relish* também foram quantificados (Figura 8A-C). Somente *PGRP* apresentou diferença após 12 horas de tratamento (ANOVA, $p < 0,05$, $n=2$) com uma diminuição nos níveis de transcritos em abelhas alimentadas tanto com *M. luteus* quanto com *S. marcescens* (Figura 8A). Porém, os genes *GNBP*, *cactus*, e *relish* merecem maior atenção. De maneira geral, os níveis de transcritos de *GNBP* parecem diminuir com a infecção por bactéria, independentemente do tipo de organismo usado para tratamento (Figura 8B). Os níveis de transcritos de *cactus* parecem aumentar nas primeiras horas de tratamento com bactéria, mas somente a Gram-positiva (*M. luteus*) (Figura 8C). Em quase todas as coletas, os níveis de transcritos de *relish* diminuíram após tratamento com qualquer uma das bactérias (Figura 8D). No entanto, a variação entre as amostras fez com que as diferenças observadas na quantidade de transcritos destes genes não fossem estatisticamente significantes.

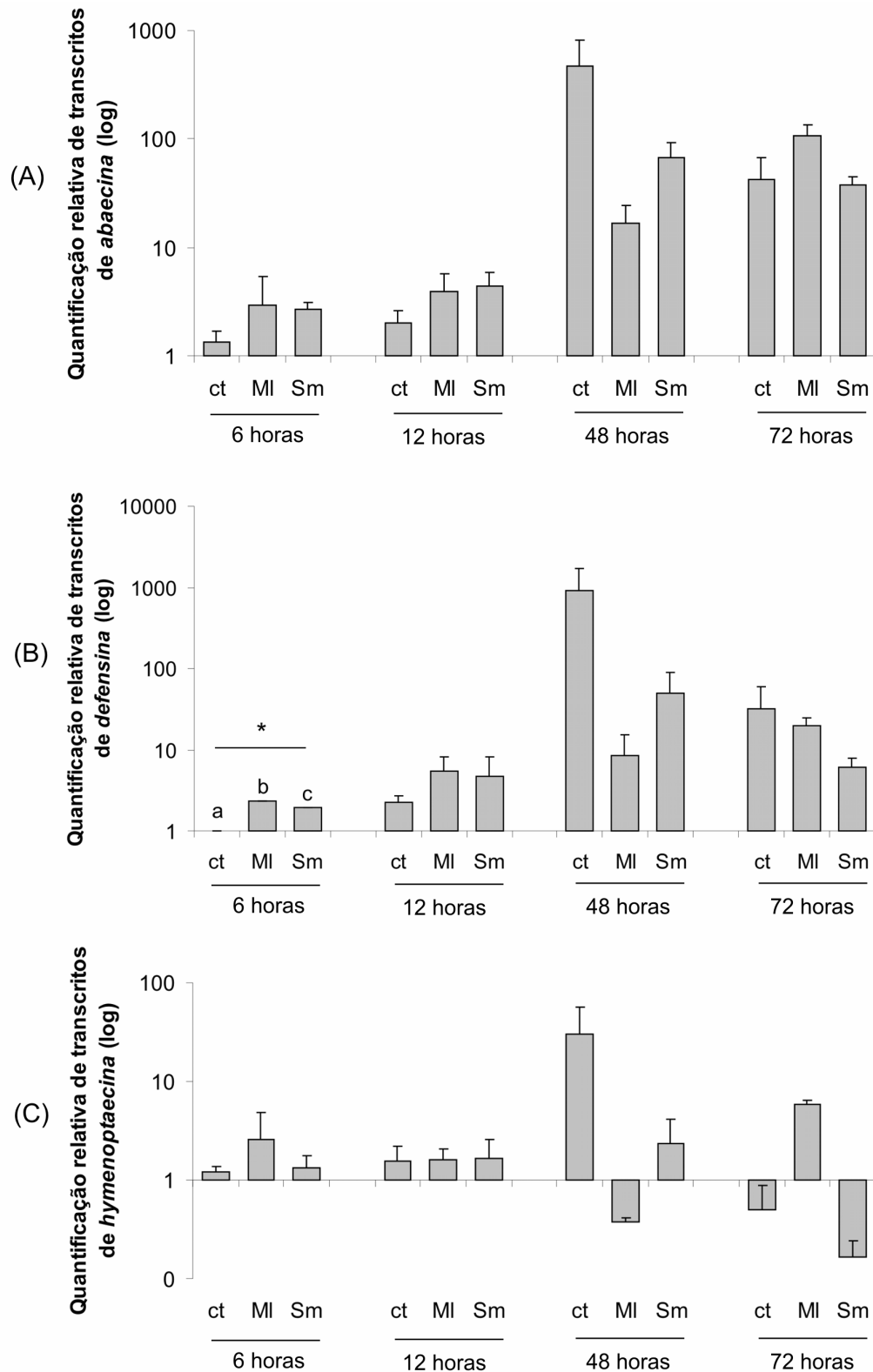


Figura 6- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de **(A)** *abaecina*, **(B)** *defensina* e **(C)** *hymenoptaecina* em abelhas *Apis mellifera* alimentadas com *Micrococcus luteus* (MI) ou *Serratia marcescens* (Sm). O controle recebeu água sem bactérias (ct). Foi usado *rp49* como controle endógeno. Coletas após tratamento: 6, 12, 48 e 72 horas. Os gráficos foram gerados a partir de quantificação de duas amostras (n=2). Cada amostra representa 2-3 indivíduos. Gráfico: média + erro padrão. Letras: diferenças estatísticas entre os grupos – ct, MI e Sm – (p<0,05).

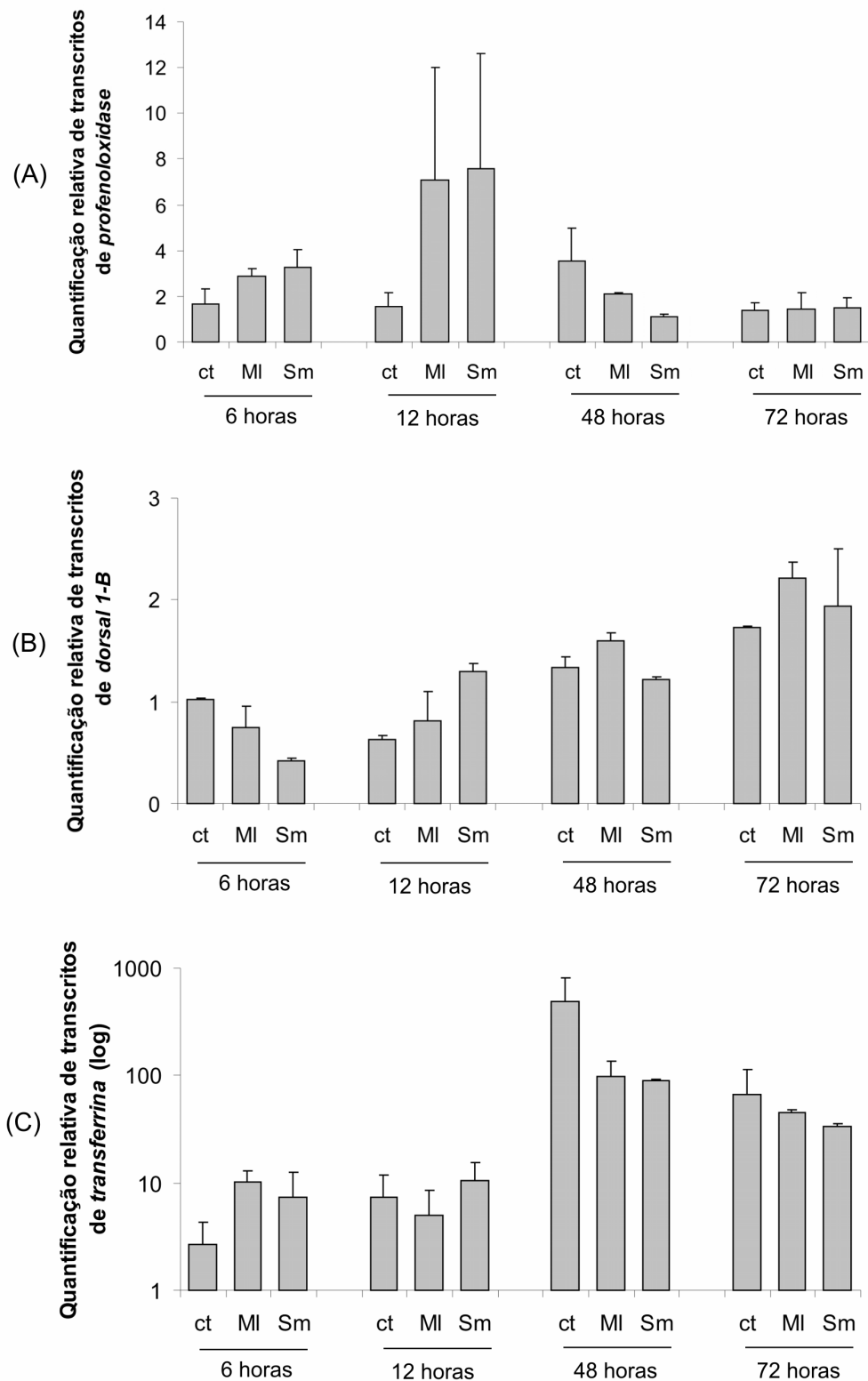


Figura 7- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de **(A)** *profenoloxidase*, **(B)** *dorsal 1-B* e **(C)** *transferrina* em abelhas *Apis mellifera* alimentadas com *Micrococcus luteus* (MI) ou com *Serratia marcescens* (Sm). O controle recebeu água sem bactérias (ct). Foi usado *rp49* como controle endógeno. Coletas após tratamento: 6, 12, 48 e 72 horas. Os gráficos foram gerados a partir de quantificação de duas amostras (n=2). Cada amostra representa 2-3 indivíduos. Gráfico: média + erro padrão.

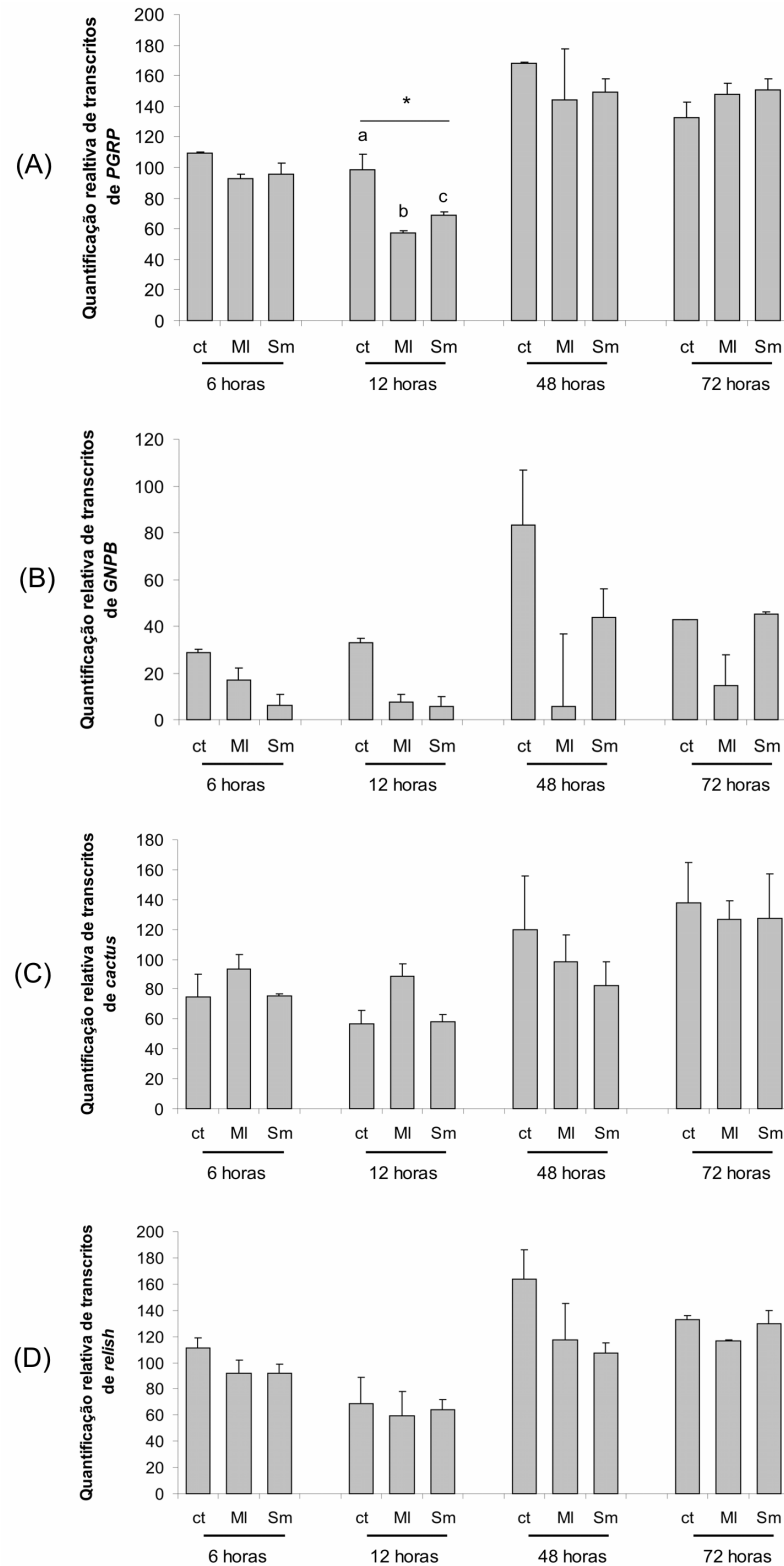


Figura 8- Quantidade relativa por RT-PCR semiquantitativa de transcritos de **(A)** *PGRP*, **(B)** *GNPB*, **(C)** *cactus* e **(D)** *relish* em abelhas *Apis mellifera* alimentadas com *Serratia marcescens* (Sm) ou com *Micrococcus luteus* (MI). O controle recebeu água sem bactérias (ct). Foi usado *rp49* como controle endógeno. Os gráficos foram gerados a partir de densitometria da imagem no gel das bandas das duas amostras de cada coleta. Cada amostra representa 2-3 indivíduos. Gráfico: média + erro padrão.

Na Tabela V estão representados os resultados de aumento expressão de todos os genes analisados após infecção por via oral da bactéria *S. marcescens* e da *M. luteus*, em número de vezes após 6, 12, 48 e 72 horas com relação ao controle (não infectado). Observou-se, assim, que realmente houve um aumento na quantidade de transcritos da *defensina* em 6 e 12 horas, seguido de uma diminuição em 48 e 72 horas. Os níveis de transcritos de *PGRP* também foram maiores, mas somente nas coletas de 72 horas tanto para infecção com *S. marcescens* quanto com *M. luteus*. Já os níveis de transcritos de *GNBP* foram maiores para infecção com *S. marcescens* depois de 72 horas de tratamento. A maior diminuição nos níveis de transcritos de *cactus* e de *relish* foi observada em abelhas que se alimentaram de *S. marcescens* (48 horas).

Tabela V- Aumento de expressão, em vezes, entre tratamento (abelhas alimentadas com *M. luteus* - MI ou *S. marcescens* - Sm) e controle (abelha alimentada com água sem bactéria) após 6, 12, 48 e 72 horas. Genes: *abaecina* (*ab*), *hymenoptaecina* (*hy*), *defensina* (*df*), *profenoloxidase* (*proPO*), *dorsal 1-B* (*dl 1-B*), *transferrina* (*trf*), *PGRP*, *GNBP*, *cactus* e *relish*. Em destaque: grupos que tiveram alteração significativa na quantidade de transcritos (ANOVA; $p < 0,05$).

Tratamento	<i>ab</i>	<i>hy</i>	<i>df</i>	<i>proPO</i>	<i>dl1-B</i>	<i>trf</i>	<i>PGRP</i>	<i>GNBP</i>	<i>cactus</i>	<i>relish</i>
MI- 6h	0,3	2,2	2,3	1,7	0,7	1,2	0,8	0,6	1,2	0,8
Sm- 6h	0,2	1,1	1,9	1,9	0,4	0,8	0,9	0,2	1,0	0,8
MI- 12h	2,0	1,0	2,4	4,6	1,3	0,7	0,6	0,2	1,5	0,9
Sm- 12h	2,2	1,1	2,0	4,9	2,1	1,4	0,7	0,2	1,0	0,9
MI- 48h	0,04	0,01	0,008	0,04	1,2	0,2	0,9	0,1	1,1	0,9
Sm-48h	0,1	0,08	0,05	0,07	0,9	0,2	0,7	0,2	0,6	0,6
MI- 72h	2,5	11,8	0,6	1,1	1,3	0,7	1,1	0,3	0,9	0,9
Sm- 72h	0,9	0,3	0,2	1,1	1,1	0,5	1,1	1,0	0,9	1,0

2- Silenciamento de *profenoloxidase (proPO)*

2.1- Silenciamento de *proPO* em adultos

No terceiro dia após a injeção de dsRNA de *proPO* em abelhas recém-emergidas, o RNA total foi isolado e purificado de abdômens individuais e usado para quantificação de RNA mensageiro de *proPO* por real-time RT-PCR. Os níveis de transcritos deste gene foram significativamente menores em sete abelhas (43,75%; $p < 0,05$; $n = 16$) injetadas com 10 μg de dsRNA de *proPO*, e em dez abelhas (62,5%; $p < 0,05$; $n = 16$) injetadas com 20 μg de dsRNA de *proPO*, quando comparadas com abelhas controles injetadas com água (Figura 9A). Desta maneira, a diminuição de expressão de *proPO* foi bem sucedida e é dependente da dose de dsRNA de *proPO* injetada. Como a injeção de uma dose de 20 μg levou a uma maior mortalidade (61-80%) que injeção com 10 μg de dsRNA de *proPO* (20%), nós optamos em realizar os experimentos subseqüentes em abelhas adultas utilizando-se a menor dose. Com esta dose, a redução da atividade da Fenoloxidase também foi significativa, sendo que nove de quinze abelhas injetadas com 10 μg de dsRNA de *proPO* (60%; $p < 0,05$) mostraram menor atividade da Fenoloxidase que em controles injetados com água (Figura 9B).

Para confirmar a especificidade do silenciamento da *proPO*, nós realizamos experimentos comparando o efeito de outros dsRNA na expressão de *proPO*. Para isto, foram feitos dois grupos controles injetados com dsRNA: dsRNA de um gene não encontrado em abelhas (dsRNA de GFP) e de um gene de Esterase de abelhas (dsRNA de JHE) (Figura 9C). Além disso, injetamos também um grupo de abelhas com salina de inseto (Ringer). Podemos observar que não houve redução de transcritos da *proPO* nas abelhas que receberam injeção com outro tipo de dsRNA, e sim um significativo aumento de transcritos deste gene nos tratamentos com dsRNA (Figura 9C). O número pequeno de amostras no experimento realizado com o grupo adicional de dsRNA de GFP dificultou a visualização do silenciamento de *proPO*, mas na Figura 9D podemos observar que existe uma redução significativa de 40% ($n = 5$) das abelhas injetadas com dsRNA de

proPO quando comparadas ao controle injetado com água. Entretanto, quando usamos o grupo injetado com dsRNA de GFP como controle, não observamos silenciamento de *proPO*, mesmo existindo uma tendência à redução nas amostras injetadas com dsRNA de proPO. Isto se deve ao fato de que as abelhas injetadas com dsRNA de GFP apresentaram grande variação. Observamos com estes resultados que a injeção de qualquer dsRNA causa aumento nos níveis de transcritos de proPO. Todavia, de maneira geral, somente injeção com dsRNA de proPO causou redução significativa na quantidade de transcritos de proPO, confirmando, assim, sua especificidade.

Estes resultados, que mostram a redução nos níveis de transcritos de proPO e da atividade enzimática em abelhas injetadas com dsRNA de proPO, possibilitaram o uso deste protocolo para o teste de função deste gene na resposta imune de adultos.

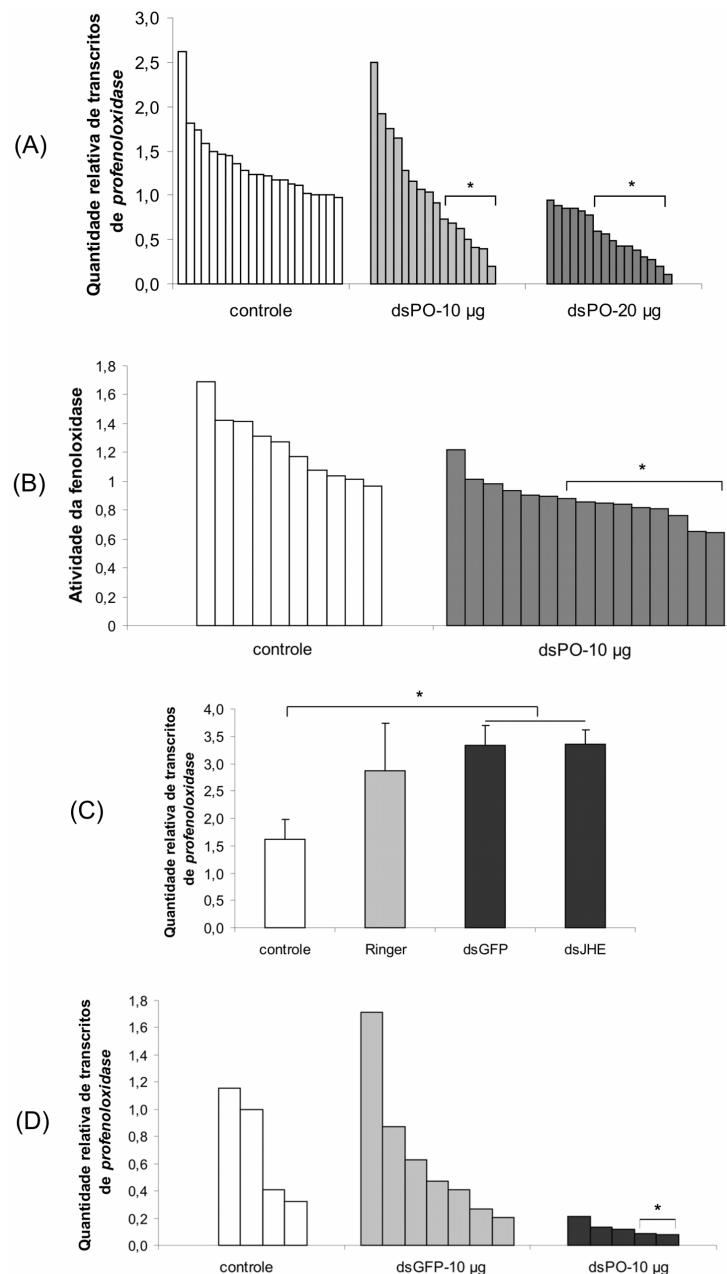


Figura 9- **(A)** Quantidade relativa de transcritos de *profenoloxidase* em abelhas adultas injetadas com 10 ou 20 µg de dsRNA de proPO (dsPO), ou água (controle). **(B)** Atividade da Fenoloxidase em abelhas injetadas com 10 µg dsRNA em comparação com controle. **(C)** Quantidade relativa de transcritos de *profenoloxidase* em abelhas adultas injetadas com 1 µg of dsRNA (dsRNA de GFP- dsGFP- ou dsRNA de JHE- dsJHE) ou com salina de inseto (Ringer), ou água (controle). **(D)** Quantidade relativa de transcritos de *profenoloxidase* em abelhas adultas injetadas com 10 µg de dsRNA de GFP (dsGFP), proPO (dsPO), ou água (controle). Injeção de dsRNA foi feita em abelhas recém-emergidas, e transcritos de *profenoloxidase* e a atividade da Fenoloxidase foram medidos após três dias de injeção (em **A** e **B**), ou após seis dias (em **C**). Asteriscos em **A** e **B** representam significativa redução nos transcritos de *profenoloxidase* e da atividade da Fenoloxidase ($p < 0,05$). Em **C**, o asterisco representa aumento significativo na quantidade de transcritos de *profenoloxidase*.

2.2- Susceptibilidade de abelhas adultas tratadas com dsRNA de proPO seguida de infecção por bactéria

A importância do gene codificador da proPO em resposta à infecção bacteriana foi avaliada em abelhas recém-emergidas injetadas com 10 µg de dsRNA de proPO, e subsequentemente alimentadas com suspensão de bactérias *S. marcescens* do terceiro ao oitavo dia de vida adulta. A susceptibilidade à infecção foi, então, analisada através do monitoramento da sobrevivência das abelhas. A curva de sobrevivência, dos grupos injetados com dsRNA de proPO ou água, foi construída a partir de dois experimentos independentes, sendo que no total, 38 abelhas foram injetadas com dsRNA de proPO e infectadas, e 57 abelhas foram injetadas com água e infectadas (Figura 10A). A sobrevivência do grupo controle foi significativamente alto quando comparado ao grupo injetado com dsRNA de proPO (Cox's $F_{62,54} = 1,61$, $p = 0,037$). Aparentemente, o efeito da injeção foi significativamente mais severo em abelhas com silenciamento de *proPO* que no grupo controle. Para verificarmos se a redução em sobrevivência foi de fato uma consequência da diminuição na quantidade de RNAm de *proPO*, nós fizemos o mesmo experimento de sobrevivência testando o efeito de dsRNA de GFP na sobrevivência de abelhas adultas infectadas. Neste caso, a sobrevivência de abelhas injetadas com dsRNA de proPO não diferiu significativamente daquelas injetadas com dsRNA de GFP (Cox's $F_{32,42} = 1,20$, $p = 0,9262$; Figura 10B). Estes resultados mostram que um dsRNA não específico foi tão prejudicial à sobrevivência quanto o dsRNA específico para *proPO*, e, desta maneira, a diminuição de sobrevivência em abelhas injetadas com dsRNA de proPO pode não ser atribuída ao silenciamento de *proPO*.

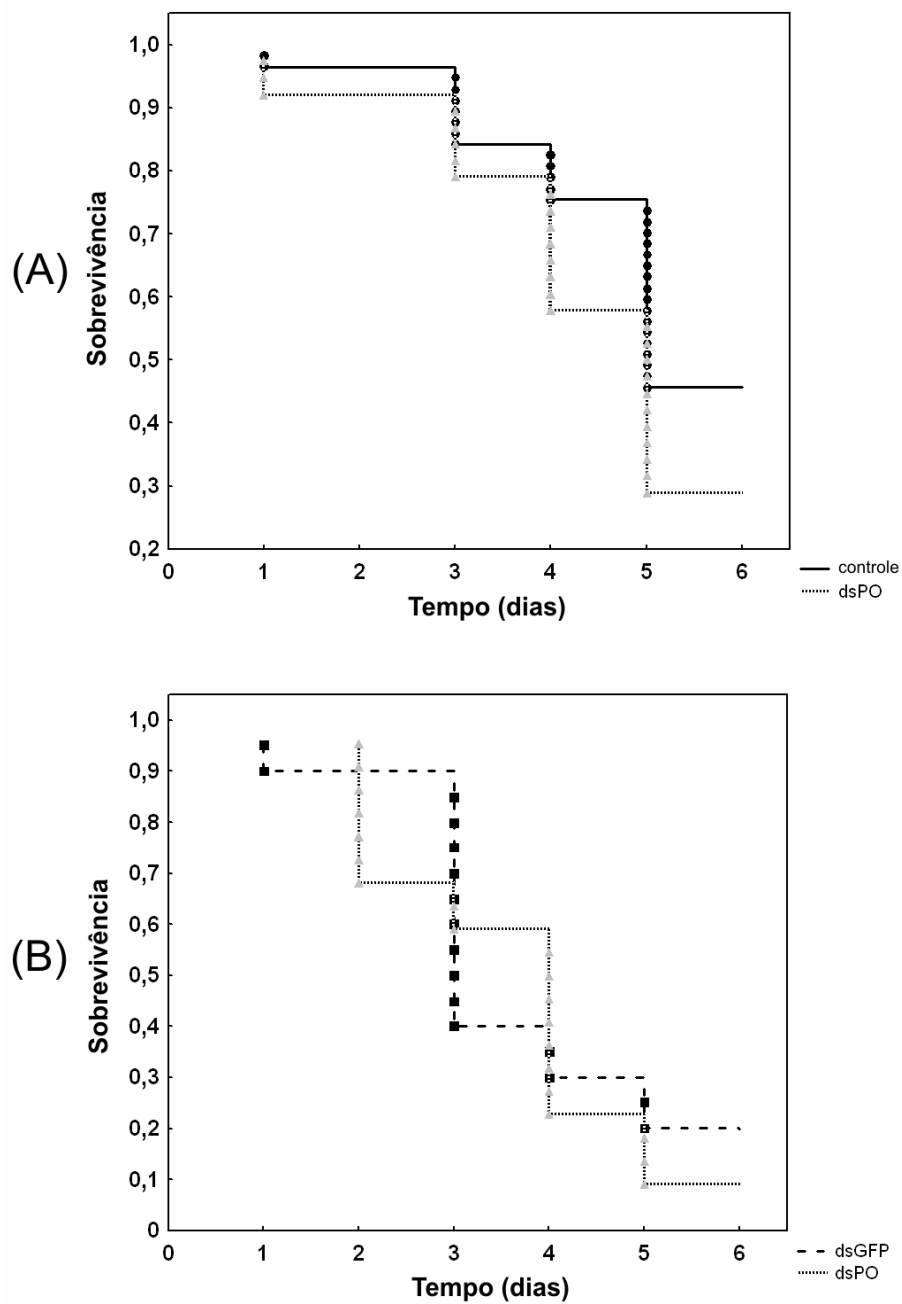


Figura 10- Curvas de sobrevivência de abelhas adultas tratadas com dsRNA e infectadas com *Serratia marcescens*. **(A)** Porcentagem de sobrevivência de abelhas infectadas após três dias de injeção com dsRNA de proPO (dsPO, n=38) ou água (controle, n=57). **(B)** Porcentagem de sobrevivência de abelhas infectadas após três dias de injeção com dsRNA de proPO (dsPO, n=22) ou dsRNA de GFP (dsGFP, n=20). As abelhas foram infectadas através da ingestão de *S. marcescens*. Os experimentos duraram seis dias.

2.3- Silenciamento de *proPO* em pupas

As pupas Pw no sétimo dia após injeção de 20 µg de dsRNA de *proPO* mostraram significativa redução (47,06%; $p < 0,05$; $n = 17$) dos níveis de transcritos de *proPO* (Figura 11A). Este efeito foi bastante específico, uma vez que a injeção com dsRNA de GFP ou dsRNA de um gene encontrado em abelhas, a *lacase*, não afetou os níveis de transcritos de *proPO* (Figura 11B) apesar de parecer que ocorre um aumento nos níveis de transcritos deste gene quando destas abelhas injetadas com dsRNA quando comparadas aos controles. Além disso, somente abelhas injetadas com dsRNA de *proPO* apresentaram diminuição significativa na quantidade dos transcritos de *proPO* quando comparadas àquelas que foram injetadas com dsRNA de GFP, apresentando 87,5% ($n = 8$) de sucesso no silenciamento (Figura 11C). Podemos observar, ainda, que somente uma abelha apresentou redução significativa da quantidade de transcritos de *proPO* quando foi feita a comparação do grupo injetado com dsRNA de *proPO* ao controle injetado com água. Este fato reforça os resultados encontrados em adultos de que a injeção com dsRNA de GFP causa aumento na transcrição de *proPO*, apesar de não ser significativo. Como verificamos o silenciamento de *proPO* em abelhas injetadas com dsRNA de *proPO* com relação ao controle injetado com água ou injetado com dsRNA de GFP, nos propusemos investigar a função do gene *proPO* na resposta imune e pigmentação de cutícula em pupas com silenciamento de *proPO*.

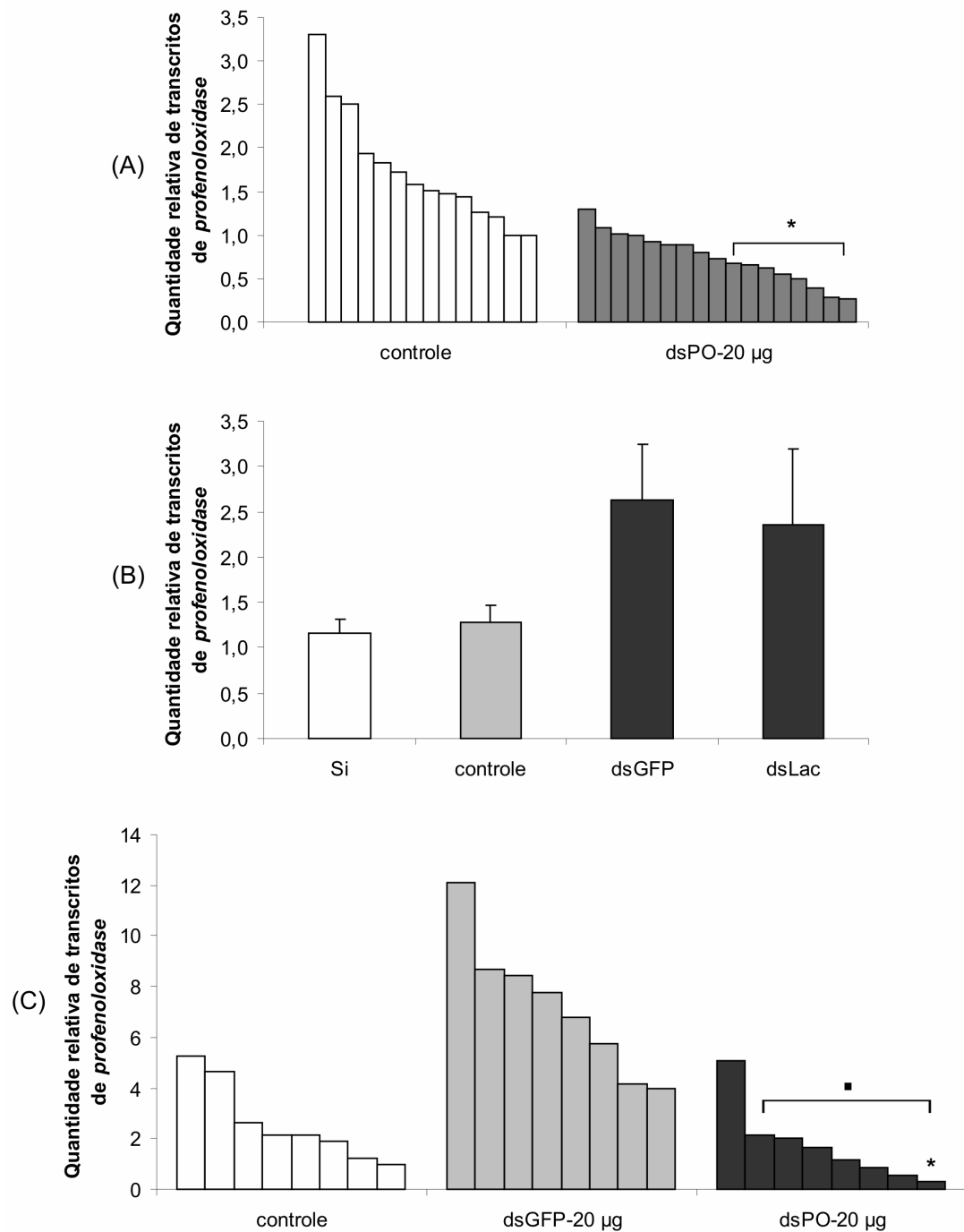


Figura 11- (A) Quantidade relativa de transcritos de *profenoloxidase* em pupas após sete dias de injeção de dsRNA de proPO (dsPO-20 µg) ou água (controle). (B) Quantidade relativa de transcritos de *profenoloxidase* em pupas após oito dias de injeção com dsRNA de Lac (dsLac) ou dsRNA de GFP (dsGFP-6 µg) ou água (controle). Si: sem injeção. (C) Quantidade relativa de transcritos de *profenoloxidase* em pupas após sete dias de injeção de dsRNA de proPO (dsPO), dsRNA de GFP (dsGFP) (dsRNA-20 µg) ou água (controle). As injeções foram feitas em pupas do primeiro dia do estágio pupal (Pw). Asteriscos indicam redução significativa na quantidade de transcritos de *profenoloxidase* quando usado como controle o grupo injetado com água, e o quadrado indica redução significativa na quantidade de transcritos de *proPO* quando o grupo injetado com dsRNA de GFP foi usado como controle ($p < 0,05$).

2.4- Susceptibilidade de pupas tratadas com dsRNA de proPO à infecção por bactérias

A susceptibilidade à infecção foi avaliada em pupas injetadas com 20 µg dsRNA de proPO através da ocorrência, ou não, de melanização da hemolinfa. Uma alta porcentagem, 91,3% (n=23), de pupas injetadas com dsRNA de proPO mostraram hemolinfa sem presença de melanização em resposta à infecção por *S. marcescens*. No entanto, somente 48% (n=25) dos controles (injetados com água) mostraram melanização da hemolinfa. Esta diferença foi altamente significativa ($\chi^2=8,54$; $p=0,003$) (Figura 12A).

Este experimento foi repetido usando-se dsRNA de GFP como um controle alternativo ao de injeção com água. Na Figura 12B pode-se observar que 70% (n=10) das pupas injetadas com água responderam a infecção por bactérias ao apresentar a hemolinfa melanizada. Como esperado, a resposta por melanização foi muito baixa em pupas injetadas com dsRNA de proPO (20%; n=10), mas, surpreendentemente, o mesmo ocorreu em pupas injetadas com dsRNA de GFP (11%; n=9). A incapacidade das abelhas injetadas com dsRNA de proPO em responder à infecção seria consequência da participação da Fenoloxidase na melanização da hemolinfa em resposta a infecção por bactéria. No entanto, pupas injetadas com dsRNA de GFP também não apresentaram hemolinfa melanizada, indicando que esta resposta não é específica.

Nós, então, consideramos que a alta dose de dsRNA (20µg) poderia ser muito prejudicial, não permitindo a resposta imune através da melanização. Assim, repetimos este experimento usando doses mais baixas de dsRNA (5 e 10 µg). Porém, resultados semelhantes foram obtidos, ou seja, a melanização da hemolinfa foi observada em abelhas controles injetadas com água, mas não em abelhas tratadas com dsRNA, tanto dsRNA de proPO quanto dsRNA de GFP (Figura 12C).

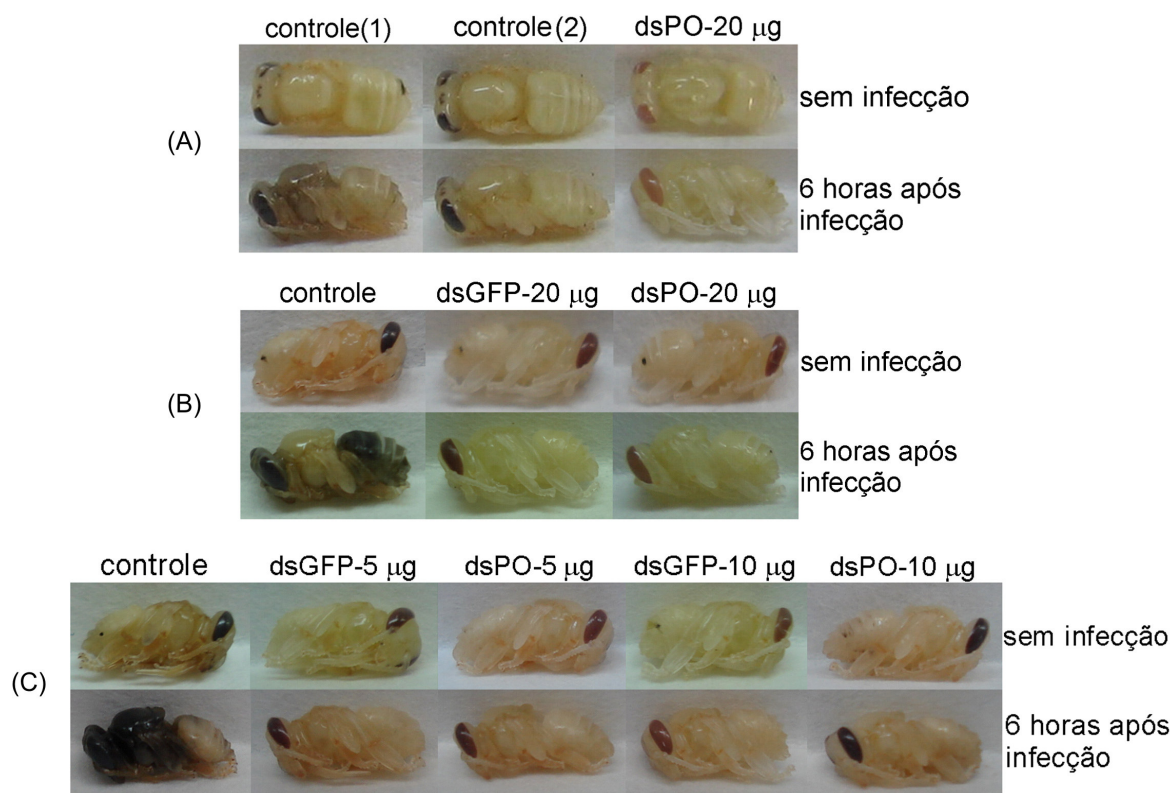


Figura 12- Inibição da melanização da hemolinfa em resposta a infecção com *S. marcescens* em pupas com proPO silenciado. Pupas do primeiro estágio pupal (Pw) foram injetadas com água ou dsRNA, e no oitavo dia foram infectadas com *S. marcescens*. O escurecimento da hemolinfa foi observado seis horas após infecção. **(A)** Pupa injetada com água (controle) ou dsRNA de proPO (dsPO-20 µg). A melanização da hemolinfa é observada através da cutícula corporal da pupa controle 1, evidenciando a resposta à infecção, embora algumas pupas (pupa controle 2, como exemplo) não produziram melanina em resposta à infecção (48%; n=25). A melanização da hemolinfa foi inibida em pupas injetadas com 20 µg e, posteriormente, infectadas (91,3%; n=23). Ao se comparar a pupa controle 2, pode-se observar que o grau de melanização da hemolinfa não se alterou em seis horas de infecção, mostrando que a melanização do controle 1 não é devido à melanização cuticular, mas da hemolinfa. As pupas desta figura representam dois experimentos independentes. **(B)** Pupa injetada com água (controle), dsRNA de GFP (dsGFP-20 µg) ou dsRNA de proPO (dsPO-20 µg). Somente a pupa controle apresentou melanização da hemolinfa após 6 horas de infecção (70%; n=10). A melanização foi inibida após infecção por bactéria em abelhas injetadas com dsRNA de GFP-20 µg (11%; n=9) e dsRNA de proPO-20 µg (20%; n=10). **(C)** Pupa injetada com água (controle), dsRNA de GFP (dsGFP-5 ou 10 µg) ou dsRNA de proPO (dsPO-5 ou 10 µg). Somente pupa controle mostrou melanização da hemolinfa em seis horas de infecção (70%; n=10), uma vez que injeção com dsRNA de GFP ou proPO resultou em 11% (n=9 para cada grupo; 10 µg de dsRNA) ou 22% (n=9 para cada grupo; 5 µg de dsRNA) de hemolinfa melanizada.

2.5- Pigmentação da cutícula em pupas tratadas com dsRNA de proPO

A importância da Fenoloxidase na pigmentação da cutícula durante o desenvolvimento pupal, foi investigado em abelhas injetadas com dsRNA de proPO em comparação com controles injetados com água, em dois experimentos independentes. As injeções foram ministradas anteriormente ao início da pigmentação da cutícula, em pupas Pw. A presença de pigmentos foi observada sete dias mais tarde. Nós observamos a inibição na pigmentação corporal em todas pupas injetadas com dsRNA de proPO (n=36) no momento em que os pigmentos da cutícula são claramente evidentes em controles injetados com água (n=37) (Figura 13A). Além disso, pupas injetadas com dsRNA de proPO não emergiram como adultos, diferentemente das pupas controles. Existem duas possibilidades para se explicar este resultado. Primeiramente, como a pigmentação é um passo crítico na diferenciação da cutícula pupal, o silenciamento do gene *proPO* aparentemente interfere neste processo, impedindo a emergência das pupas. Uma outra possibilidade seria que dsRNA de proPO impede o desenvolvimento, e por consequência, o processo normal de pigmentação. Para distinguirmos as duas alternativas, nós repetimos o experimento e adicionamos um grupo de abelhas injetadas com dsRNA de GFP ao grupo das abelhas controles injetadas com água. Como observado em pupas injetadas com dsRNA de proPO, as pupas injetadas com dsRNA de GFP também apresentaram atraso no desenvolvimento (Figura 13B). Além disso, o mesmo fenótipo foi observado em abelhas que receberam quantidades reduzidas de dsRNA, tanto dsRNA de proPO quanto dsRNA de GFP, para se reduzir o efeito colateral (Figura 13C).

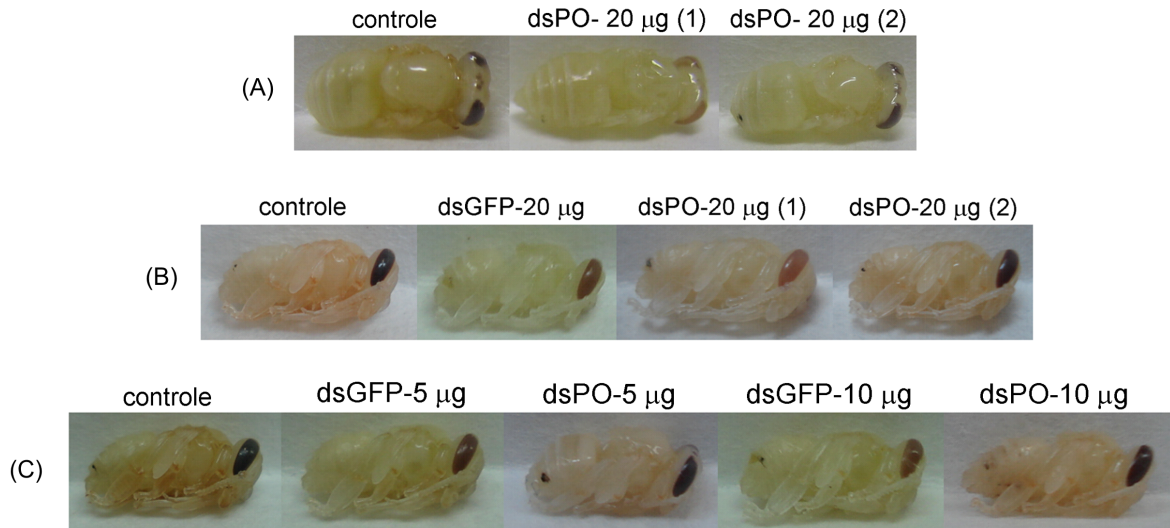


Figura 13- Inibição da pigmentação da cutícula em pupas de abelhas injetadas com dsRNA. Pupas no primeiro estágio pupal (Pw) foram injetadas e a presença de pigmentos foi investigada no sétimo dia. Exemplos de pupas **(A)** injetadas com água (controle) ou dsRNA de proPO (dsPO-20 µg); **(B)** injetadas com água (controle) ou dsRNA de GFP (dsGFP-20 µg) ou dsRNA de proPO (dsPO-20 µg); **(C)** injetadas com água (controle) ou dsRNA de GFP (dsGFP-5 ou 10 µg) ou dsRNA de proPO (dsPO-5 ou 10 µg). A inibição da pigmentação da cutícula é evidente em pupas tratadas com dsRNA (dsRNA de GFP ou dsRNA de proPO), enquanto que o padrão normal de pigmentação é observado em pupas tratadas com água. As pupas injetadas com dsRNA mostraram pigmentação normal dos olhos (olhos morrom-escuros) como o exemplo 2 em **(A)**, ou olhos pouco pigmentados (olhos rosa) como o exemplo 1 em **(A)**, sugerindo que pelo menos em algumas pupas (de olhos claros), a injeção com dsRNA desacelera o desenvolvimento.

3- Silenciamento de *dorsal 1-A*, *dorsal 1-B* e *dorsal 2*

3.1- Análise de seqüências e localização de *primers*

Existem dois genes (*dorsal 1* e *2*) e duas isoformas originadas por *splicing* alternativo (*dorsal 1-A* e *dorsal 1-B*) para Dorsal em *A. mellifera*. Todos eles apresentam os domínios conservados de Relish (*rel homology domain- RHD*) e de transcrição do fator NF- κ B (*domain of the transcription factor NF- κ B and related transcription factors-IPT_NF- κ B*). Estes domínios, localizados na região amino-terminal, são altamente conservados entre as proteínas preditas codificadas pelos genes *dorsal 1-A*, *dorsal 1-B* e *dorsal 2* (Figura 14).

A importância de Dorsal como fator de transcrição de peptídeos antimicrobianos em abelhas foi avaliada através da metodologia de RNAi. Para o silenciamento de *dorsal*, dsRNA de dois genes, *dorsal 1* e *dorsal 2* (dl2), e duas isoformas de *dorsal 1*, *dorsal 1-A* (dla) e *dorsal 1-B* (dlb), foram sintetizados a partir de regiões distintas a cada isoforma (Figura 15). No entanto, como a similaridade entre *dorsal 1-A* e *dorsal 2* é muito grande, existem trechos dentro do dsRNA construído para *dorsal-2* com alta similaridade entre os dois genes (Figura 16). Combinações entre os diferentes dsRNAs foram feitas e pupas de olho branco (Pw) foram injetadas com 5 μ g de dsRNA. Após três dias, dois grupos de Pw foram infectados com *P. larvae* ou *E. coli*. As amostras foram coletadas após 5 ou 48 horas para posterior análise.


```

dl 1-A -----
dl 2 -----
dl 1-B GTTGAAAATGCATGCGTATTAAAAAATACAGAAATATTTAAAGATAAACTCGATTGGTTTC

dl 1-A -----
dl 2 -----
dl 1-B GATTATTCTGAAGTGAGTAAATGGGTACAAAAAGGACAAATATGCTCTCAAAGAGAAGGAA
      |
      v

dl 1-A ---GAAAGGATATCTCCTTACGGATATCCAATTGGAAGTGGAGGATCCTTCCATCCTTG
dl 2 ---GAAGTAATAGCTCCATTGAATGTTCCTCAGTCGGATATAAAGAATTGTTTCCATTG
dl 1-B AATGAAAATAGATTTAAAAATTGAAGTGACAGAAGATTGTAATAAGCTTTCAATGATTTA
      ***. . .: * . . .: * . * * : : * * * : . . . . * * : . * .

dl 1-A TATCCGATGGCAACAACCTTCTCCCAATCGCAATCTACTATACAAAACGTTGAGGCCACAA
dl 2 CGCGCCTTGAAATCATTTCTGAAGAACCGGAATTTGATATTCAAACATAAGAGAAGAA
dl 1-B TTAACACAAGTAGCAGAATTAGATCAAAATTTATGCCGATACACATGCAAAGTTAGTGCAG
      * : . * * . . . : * : : * * * : . * * : * * : * * : . . * .
      |
      v

dl 1-A GTATCG-----CCAGATCGTACATCGCCAATGGAGTACAGATTATACAA
dl 2 ATATCG-----CCAATAG-----AAAACAA
dl 1-B GCAGCATTGAAACAGAATACAACCGATCAATCTATGGATATTGATGTTGCGATAATCAA
      . * * . * * . . * * . . * * . * * . * * . * * . * * . * * .

dl 1-A TCCAGCACTT-----
dl 2 TCCAACGCTT-----
dl 1-B ACTTATACTAGTTTACAAATGGCTATGAAAAATCCTATTGAATTTACCGATTTATCGAAC
      : * : . . * * :

dl 1-A -----ATTC AATCACAAC---CATCACCTCAA
dl 2 -----ATTCAGTCACCTCGACCATCACCTCAA
dl 1-B GAGAGAAAGTATGAAGATGTGTGTACTAAAAACAGATACTAATCAATCTTGTCTCTTCT
      * : * : * : . . * * * * * * * * :

dl 1-A TATCCATCAACAAGCAGTCATATCTTACAACAACCATCAATCAGAACGTATACACAACAA
dl 2 TATCCATTGACAACCGGTGACG-----CACAAAGTATCAACCGATGTGCGTCCAAAAGAC
dl 1-B CCACCAGTGACTACGAAAAGAGATGGAACGCAGGAACGGAAAGAAAGATTACCGCCTTTA
      . : * * * . * * * * . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
      |
      v

dl 1-A CAATTTCCATATGTACATGACACGTTACAAT-----
dl 2 CAATCTTCATATATTC AAGATATAACAGAAAT-----
dl 1-B CCACCGAAACGTATCCGGAAGATGCCTTCTATGCCTCTTTTACCTCGTCTATATCCTGT
      * . * . * . * * * * . * * . : . : * *
      |
      v

dl 1-A ---ACAGCCGCAAGAACAATTAACGTTAAGCAAAGTAACATCAAACATACAGGAAGATT
dl 2 ---ACAACCTGAAGAACAGTTAATGTAAAACAAAATATCAGATCATGTTACGAAAG---ATT
dl 1-B CATACTACACCAGATTTCTTTCATGGAAGCACCAAATAAACTTTACCTCTTACCTAGT
      * * : . * . * . . . : * * : * : . . . . * * * * * * * * : * : * . . * * * *

dl 1-A TCAATCGTTGAACAATGCTGTAGGT-----GAAATGGAAGCGACA
dl 2 TCATTTGTTGGAAAACGCTGTAA-----
dl 1-B ACTTTAACTAAAAACTCGAAAC AAGGATTATTTCAAATTTATTTGCAAAAAAAGTAAAA
      : * : * . * * * * . . . . . .
      |
      v

dl 1-A AATGTTACAAATATTTAAGTATGGACAACACGCAGTATAATCTTGATTTGAGTCTTCCT
dl 2 -----
dl 1-B AAAGATAAAGACATAATTTAAATGTACCTAAAGAAAGTACTCAATCTTTGACTACTACA

dl 1-A CAACTTGATTGACAGAACTCGCCGATCTTGATATTAGTCTTCTGAAAATCTATCCAGT
dl 2 -----
dl 1-B GGAAACGTTTCATATTTGACAACAATAATACATCAAATAATTCACAATTACAAATTC

dl 1-A GGATTATCAATTTAGATTCTACCAAGCCGGAACAAGTAAAGGAATAAACGCAGAACCA
dl 2 -----
dl 1-B AGAGCTAGTCTAGTAAGTACTACTAGCGTAAAACTACTTAGATTGGAAGGAGATGAAACA

dl 1-A AGCAATATTGAAGAAAGTAATAACATGACCGATAGTTTACAAGAATTGCTAATAACACT
dl 2 -----
dl 1-B CCACCGTATGGAATGGAATTAACAGAAGCTGAACATTATGCATTATATACTGCTATGGCG

dl 1-A ATTCAG-----GAATTATATACTTTAAATAATATGTATAAACCAACCGGGAG
dl 2 -----
dl 1-B CCGCACGCAACTGCTTCTGAATTTGATGAAATGCTTTCTTATTATAGTCTGTGGAAGAT
      |
      v

```

Figura 15- Alinhamento múltiplo das seqüências de nucleotídeos de *dorsal 1-A* (dl 1-A), *dorsal 1-B* (dl 1-B) e *dorsal 2* (dl2). Foi usado Clustal W (1.83) para construção do alinhamento. (*) nucleotídeos idênticos, (:) e (.) nucleotídeos similares. Em destaque estão seqüências dos primers (5'→3') para construção do dsRNA. Em vermelho: dl 1-A, verde: dl 1-B e azul: dl 2.

```

dl 2      ATCAT TTCTGAAGAACCGGAATTGATATTCAAACATAAGAGAAGAAATATCGCCA---
dl 1-A    ACAACTTCTCCACAATCGCAATCTACTATACAAAACGTTGAGGCCACAAGTATCGCCAGAT
          * * **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          ----->

dl 2      -----ATAGA-----AAACAATCCAACGCTTATTCAGTCACCTCGACCA
dl 1-A    CGTACATCGCCAATGGAGTACAGATTATACAATCCAGCACTTATCAATCA--CAACCA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

dl 2      TCACCTCAATATCCATTGACAAACGGTGACGC-----ACAAGTATCAACCGATGTGCGT
dl 1-A    TCACCTCAATATCCATCAACAAGCAGTCATATCTTACAACAACCATCAATCAGAACGAT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

dl 2      CCAAAGACCAATCTTCATATATCAAGATATAACAGAAATACAACCTGAAGAACAGTTA
dl 1-A    ACACAACAACAATTCCATATGTACATGACACGTTACAATACAGCCGCAGAAACAATTA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

dl 2      ATGTAAACAAAATATCAGATCA-TGTTACGAAGA-TTTCATTTGTTGGAAAACGCTGGT
dl 1-A    ACGTTAAGCAAAGTAACATCAAACATACCGAAGAATTTCAATCGTTGAACAATGCTGTA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          <-----

```

Figura 16- Alinhamento múltiplo das seqüências de nucleotídeos de *dorsal 1-A* (dl 1-A) e *dorsal 2* (dl2). Foi usado Clustal W (1.83) para construção do alinhamento. (*) nucleotídeos idênticos, (:) e (.) nucleotídeos similares. Em azul estão seqüências dos *primers* (5'→3') para construção do dsRNA de dl2.

3.2- Silenciamento gênico e seu efeito após 5 horas de infecção por bactéria

A análise do silenciamento, ou seja, redução dos níveis de transcritos de *dorsal* foi feita em abelhas injetadas com dsRNA ou água, mas não infectadas, ou seja, controles, afim de que o fator da infecção não prejudicasse esta análise.

Através de real-time RT-PCR pôde-se observar redução da quantidade de transcritos de *dorsal 1-A* em abelhas que receberam injeção de dsRNA de *dla* quando comparadas com controle injetado com dsRNA de GFP (ANOVA, $p < 0,05$; Figura 17A). No entanto, nenhuma alteração significativa foi observada para a quantidade de transcritos de *dlb* em nenhum dos grupos injetados com dsRNA (Figura 17B). Já abelhas que receberam dsRNA de *dl2*, *dla+2*, *dlb+2* e *dla+b+2* apresentaram redução nos níveis de transcritos de *dl2* quando comparado ao controle injetado com água somente (Figura 17C).

Como Dorsal é uma proteína do tipo Relish/NF- κ B e pode atuar como fator de transcrição dos peptídeos antimicrobianos, os genes da *abaecina* e da *defensina* foram usados para verificar a sua regulação após silenciamento e infecção com dois tipos de bactérias (*P. larvae* e *E. coli*). De maneira geral, a injeção com dsRNA de GFP provocou grande aumento na quantidade destes transcritos, por isso, esse controle foi escolhido para a comparação com os outros grupos injetados com dsRNA (Figuras 18 e 19). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na quantidade de transcritos de *abaecina* com relação aos controles injetados com dsRNA de GFP (Figura 18). No entanto, em abelhas que foram silenciadas com dsRNA de *dla+2* e *dla+b+2* apresentaram quantidade significativamente menor de transcritos de *defensina* após 5 horas de infecção com *P. larvae* (Figura 19), sugerindo que o silenciamento de *dorsal* pode prejudicar a ativação da *defensina* em abelhas infectadas.

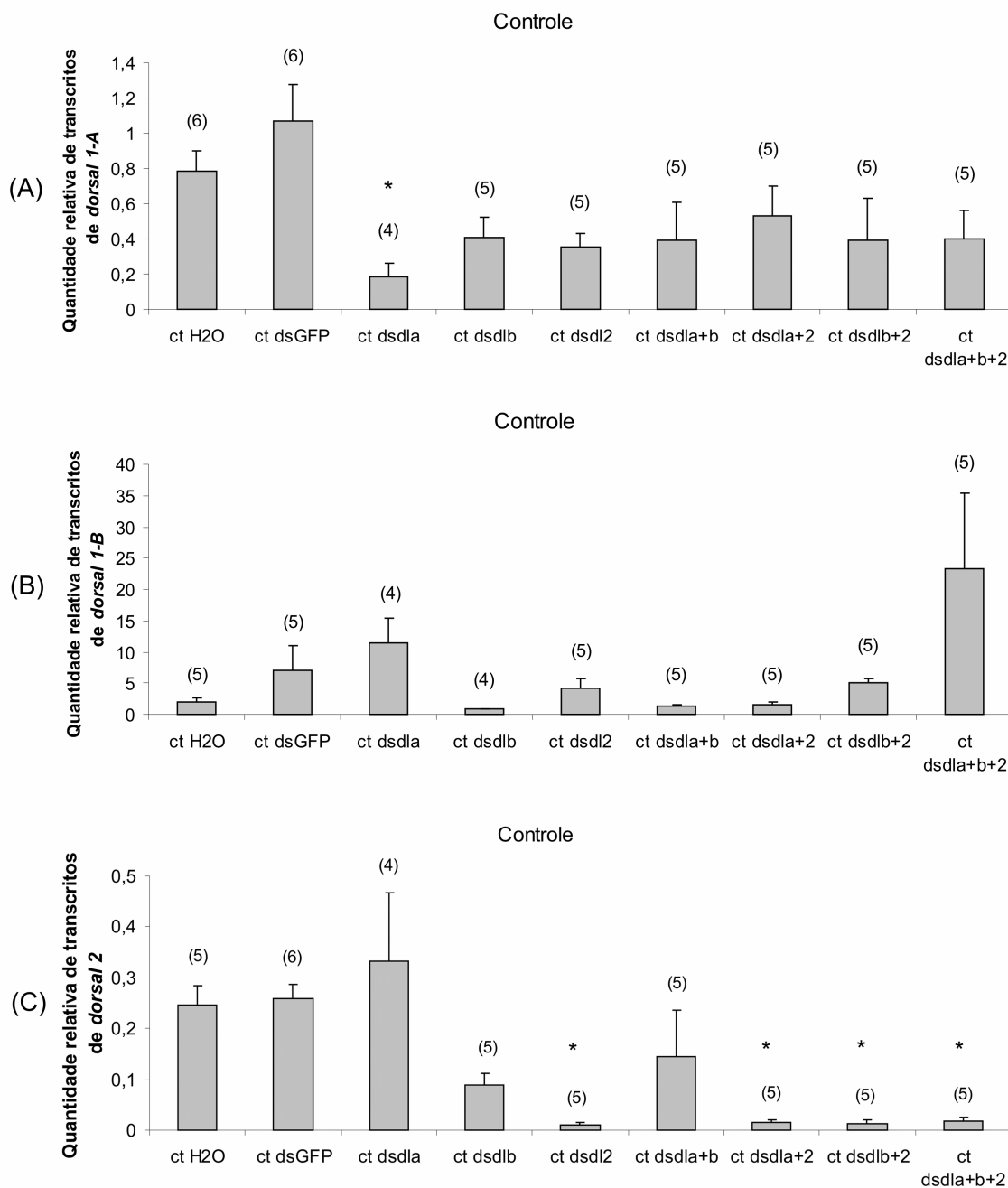


Figura 17- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de **(A) dorsal 1-A**, **(B) dorsal 1-B** e **(C) dorsal 2** de abelhas *Apis mellifera* após três dias de injeção com dsRNA mais cinco horas correspondentes aos grupos infectados. Pupas de olho branco (Pw) foram injetadas com dsRNA de dorsal (dsdla, dsdlb, dsdl2, dsdla+b, dsdla+2, dsdlb+2 ou dsdla+b+2), controle com dsRNA de GFP, ou com água livre de nuclease (H2O). Estas abelhas são controles (ct), ou seja, não receberam qualquer tipo de injeção com bactérias. Foi usada *actina* como controle endógeno. Gráfico: média + erro padrão da quantificação de amostras individuais (número de amostras indicado acima de cada coluna). Asteriscos indicam redução significativa de transcritos ($p < 0,05$).

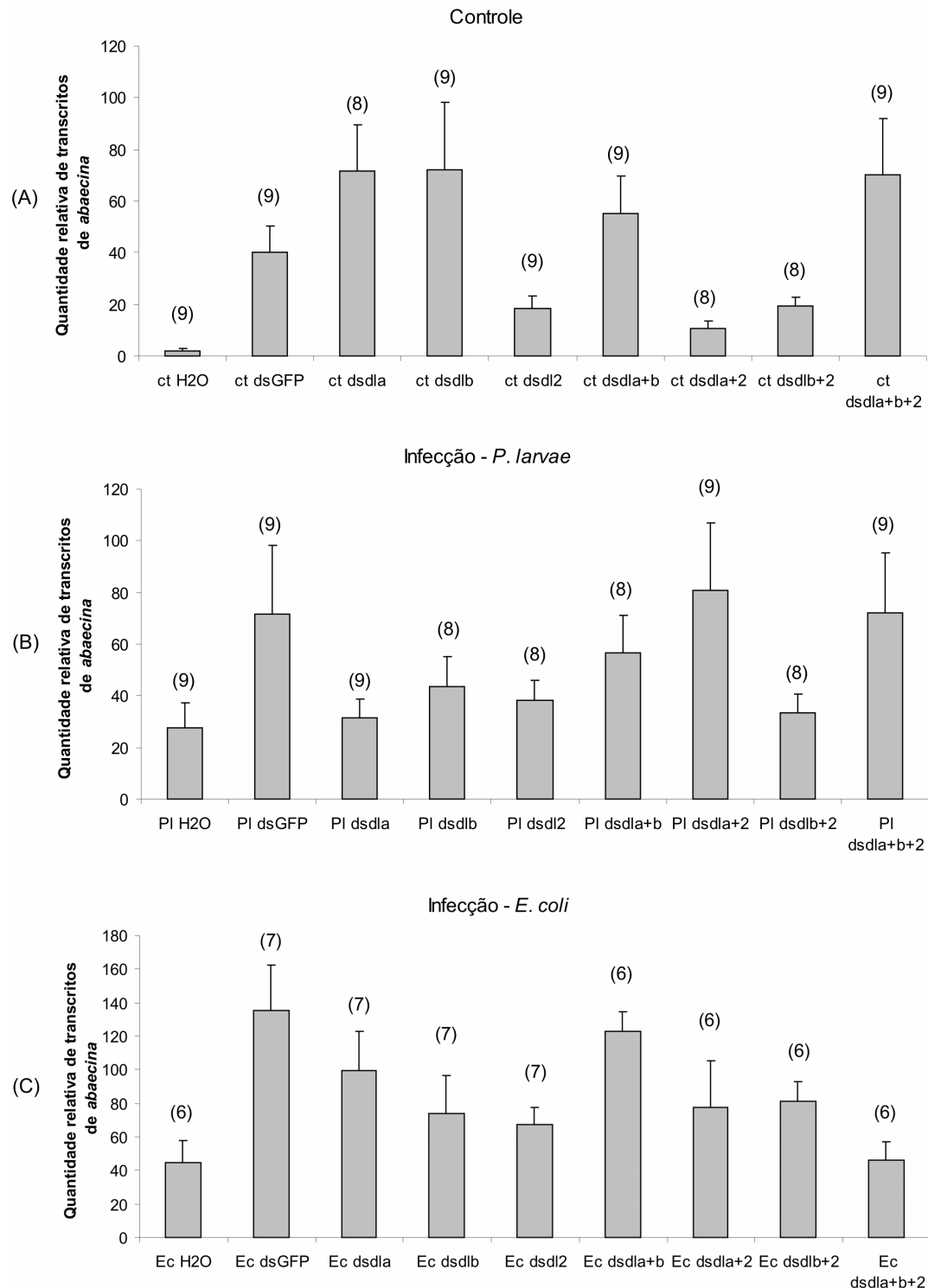


Figura 18- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de *abaecina* de abelhas *Apis mellifera*. Pupas de olho branco (Pw) foram injetadas com dsRNA de dorsal (dsdla, dsdlb, dsdl2, dsdla+b, dsdla+2, dsdlb+2 ou dsdla+b+2), com dsRNA de GFP, ou com água livre de nuclease (H2O). Estas abelhas foram infectadas com bactérias *Paenibacillus larvae* (PI), *Escherichia coli* (Ec) ou não foram infectadas (ct) três dias após o tratamento com dsRNA. As coletas foram feitas após cinco horas de infecção. Foi usada *actina* como controle endógeno. Gráfico: média + erro padrão da quantificação de amostras individuais (número de amostras indicado acima de cada coluna).

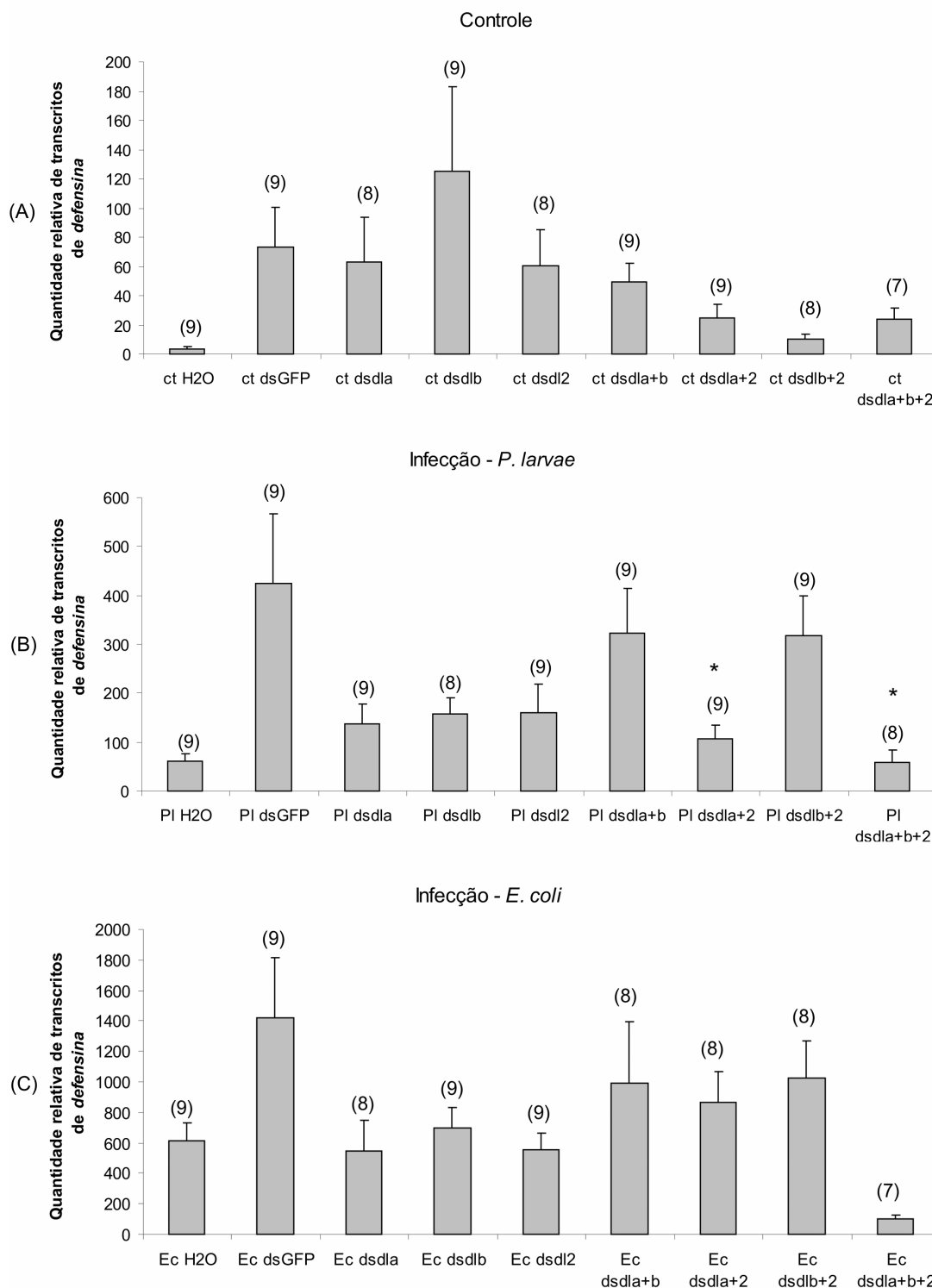


Figura 19- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de *defensina* de abelhas *Apis mellifera*. Pupas de olho branco (Pw) foram injetadas com dsRNA de dorsal (dsdla, dsdlb, dsdl2, dsdla+b, dsdla+2, dsdlb+2 ou dsdla+b+2), com dsRNA de GFP, ou com água livre de nuclease (H2O). Estas abelhas foram infectadas com bactérias *Paenibacillus larvae* (PI), *Escherichia coli* (Ec) ou não foram infectadas (ct) três dias após o tratamento com dsRNA. As coletas foram feitas após cinco horas de infecção. Foi usada *actina* como controle endógeno. Gráfico: média + erro padrão da quantificação de amostras individuais (número de amostras indicado acima de cada coluna). Asteriscos indicam redução significativa de transcritos ($p < 0,05$).

3.3- Silenciamento gênico e seu efeito após 48 horas de infecção por bactéria

O silenciamento de *dorsal* também foi avaliado após três dias de injeção com dsRNA seguido de 48 horas correspondentes ao tempo de infecção dos grupos injetados com as bactérias *P. larvae* e *E. coli*. Assim como as análises anteriores para se verificar o silenciamento, somente o grupo sem infecção (controle) foi usado.

Pôde-se observar que, neste período, o silenciamento de *dorsal 1-A*, *dorsal 1-B* e *dorsal 2* foi bastante efetivo (Figura 20A-C). A injeção em pupas de dsRNA de *dla*, *dl2*, *dla+b*, *dla+2* e *dla+b+2* provocou redução significativa nos níveis dos transcritos de *dorsal 1-A* (ANOVA, $p < 0,05$; Figura 20A). A injeção de dsRNA de *dl2* muito provavelmente também ocasionou o silenciamento, mesmo que parcial, de *dorsal 1-A*, pois a região de construção do dsRNA de *dl2* possui regiões muito similares ao gene *dorsal 1-A*, apresentando uma região de similaridade de até 20 nucleotídeos (Figura 16). A redução na quantidade de transcritos de *dorsal 1-B* foi observada em abelhas injetadas com *dlb+2* e *dla+b+2* (ANOVA, $p < 0,05$; Figura 20B). A quantidade de transcritos de *dorsal 2*, por sua vez, mostrou-se significativamente menor em abelhas injetadas com dsRNA de *dl2*, *dla+2*, *dlb+2* e *dla+b+2* (ANOVA, $p < 0,05$; Figura 20C). Estes resultados mostram que após um período maior após injeção de dsRNA (cinco dias no total) foi mais eficiente no silenciamento gênico que em abelhas coletadas após três dias de injeção de dsRNA. No entanto, ao se analisar a transcrição de peptídeos antimicrobianos, nem a quantidade de transcritos de *abaecina* e nem de *defensina* diminuiu significativamente em nenhuma das infecções bacterianas seguidas do silenciamento (Figura 21 e 22).

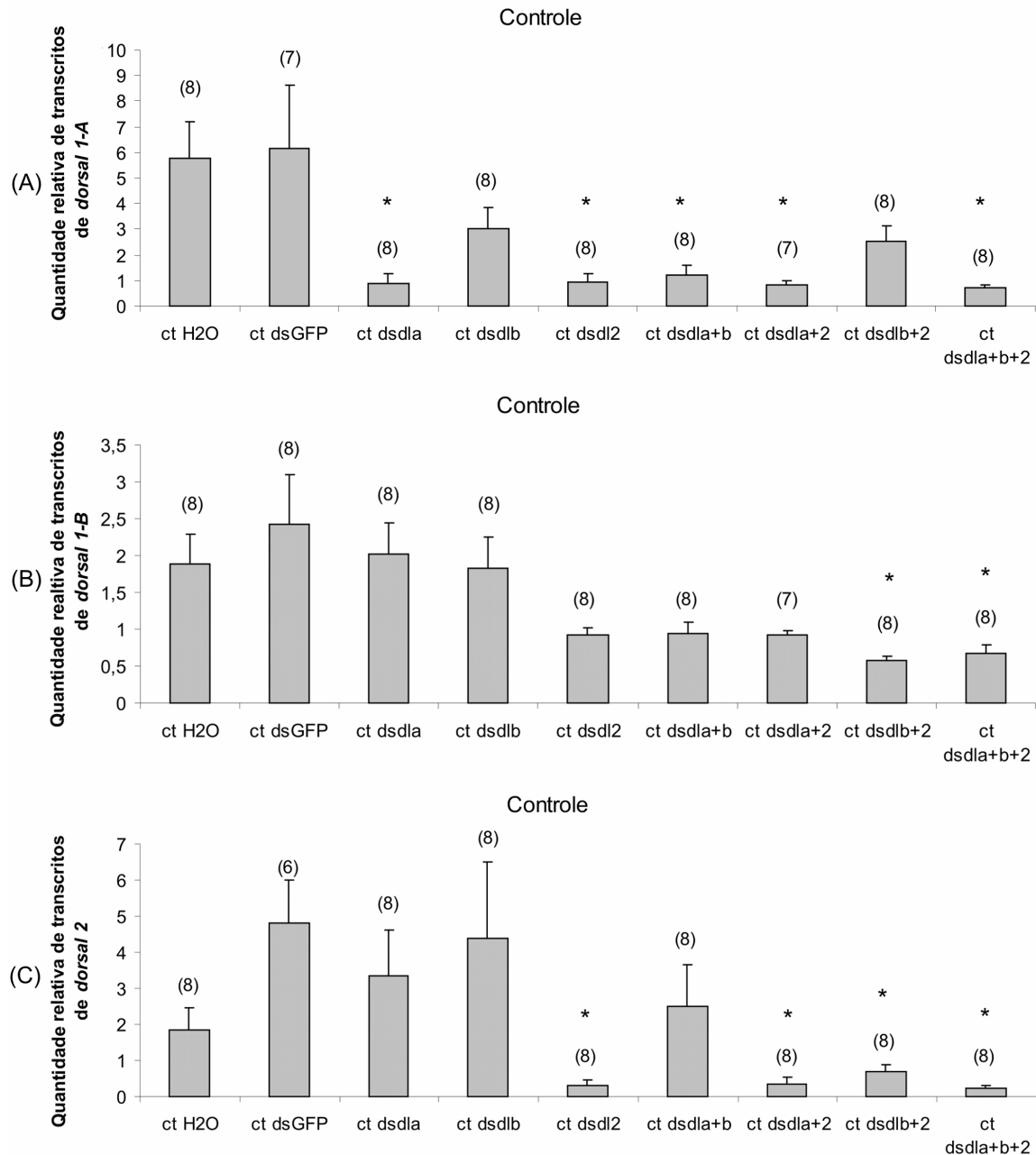


Figura 20- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de **(A) dorsal 1-A**, **(B) dorsal 1-B** e **(C) dorsal 2** de abelhas *Apis mellifera* após três dias injeção com dsRNA mais 48 horas correspondentes aos grupos infectados. Pupas de olho branco (Pw) foram injetadas com dsRNA de dorsal (dsdla, dsdlb, dsdl2, dsdla+b, dsdla+2, dsdlb+2 ou dsdla+b+2), com dsRNA de GFP, ou com água livre de nuclease (H2O). Estas abelhas são controles (ct), ou seja, não receberam qualquer tipo de injeção com bactérias. Foi usada *actina* como controle endógeno. Gráfico: média + erro padrão da quantificação de amostras individuais (número de amostras indicado acima de cada coluna). Asteriscos indicam redução significativa de transcritos ($p < 0,05$).

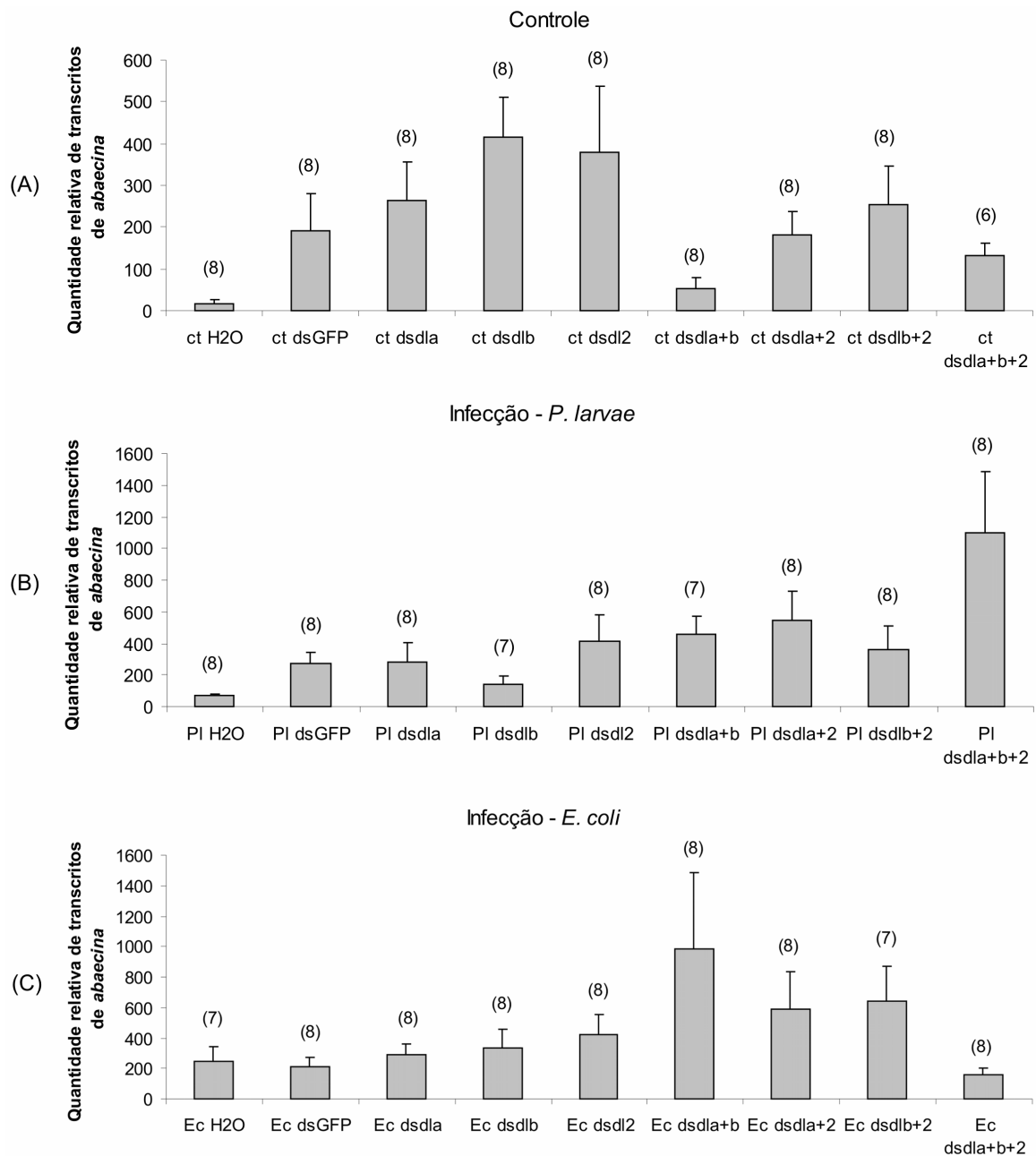


Figura 21- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de *abaecina* de abelhas *Apis mellifera*. Pupas de olho branco (Pw) foram injetadas com dsRNA para dorsal (dsdla, dsdlb, dsdl2, dsdla+b, dsdla+2, dsdlb+2 ou dsdla+b+2), controle com dsRNA de GFP, ou injeção com água livre de nuclease (H2O). Estas abelhas foram infectadas com bactérias *Paenibacillus larvae* (PI), *Escherichia coli* (Ec) ou não foram infectadas (ct) três dias após o tratamento com dsRNA. As coletas foram feitas após 48 horas de infecção. Foi usada *actina* como controle endógeno. Gráfico: média + erro padrão da quantificação de amostras individuais (número de amostras indicado acima de cada coluna).

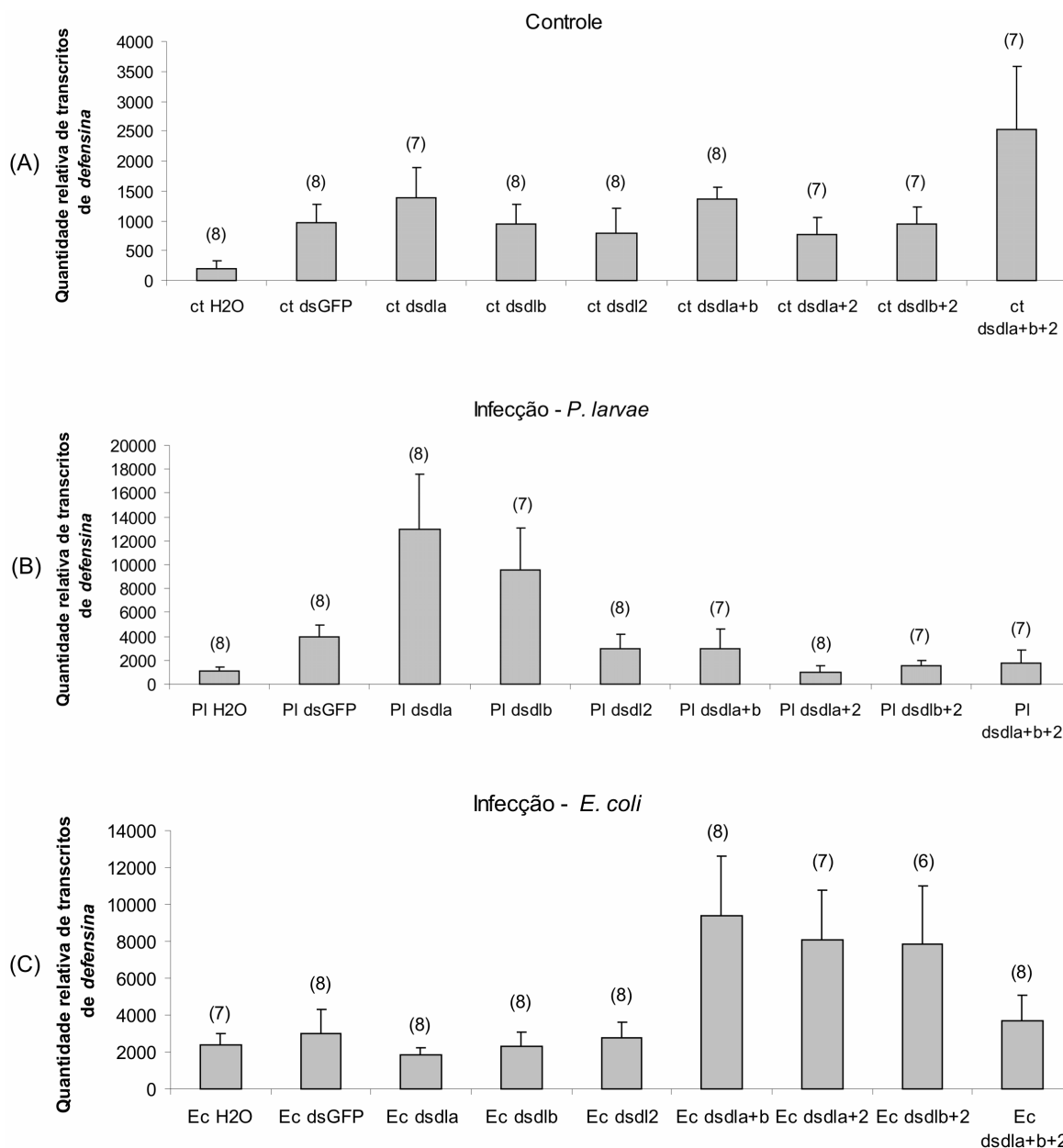


Figura 22- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de *defensina* de abelhas *Apis mellifera*. Pupas de olho branco (Pw) foram injetadas com dsRNA para dorsal (*dsdla*, *dsdlb*, *dsdl2*, *dsdla+b*, *dsdla+2*, *dsdlb+2* ou *dsdla+b+2*), controle com dsRNA de GFP, ou injeção com água livre de nuclease (H₂O). Estas abelhas foram infectadas com bactérias *Paenibacillus larvae* (PI), *Escherichia coli* (Ec) ou não foram infectadas (ct) três dias após o tratamento com dsRNA. As coletas foram feitas após 48 horas de infecção. Foi usada *actina* como controle endógeno. Gráfico: média + erro padrão da quantificação de amostras individuais (número de amostras indicado acima de cada coluna).

4- Proteínas de estocagem em abelhas infectadas por bactérias

Abelhas recém-emergidas injetadas com água, *M. luteus* (7×10^3 bactérias/ μl) ou *S. marcescens* ($5,58 \times 10^3$ bactérias/ μl) foram utilizadas para verificar a relação de proteínas de estocagem com a imunidade através da quantificação de transcritos de *vitelogenina*, *hexamerina 70a*, *lipoforinal* e *lipoforinalIII*.

Como já demonstrado anteriormente, a transcrição de *defensina* foi maior em abelhas injetadas com água, *S. marcescens* e *M. luteus* quando comparadas às controles sem injeção (ANOVA; $p < 0,05$; $n=4$) (Figura 23A). Os níveis de transcritos de outro gene envolvido na imunidade de insetos, a *profenoloxidase*, diminuíram em abelhas infectadas com bactérias com relação às abelhas não injetadas (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3-4$) (Figura 23B). A ativação do sistema imune é, então, caracterizado pelo aumento de transcrição da *defensina*, e diminuição na quantidade de transcritos de *profenoloxidase*.

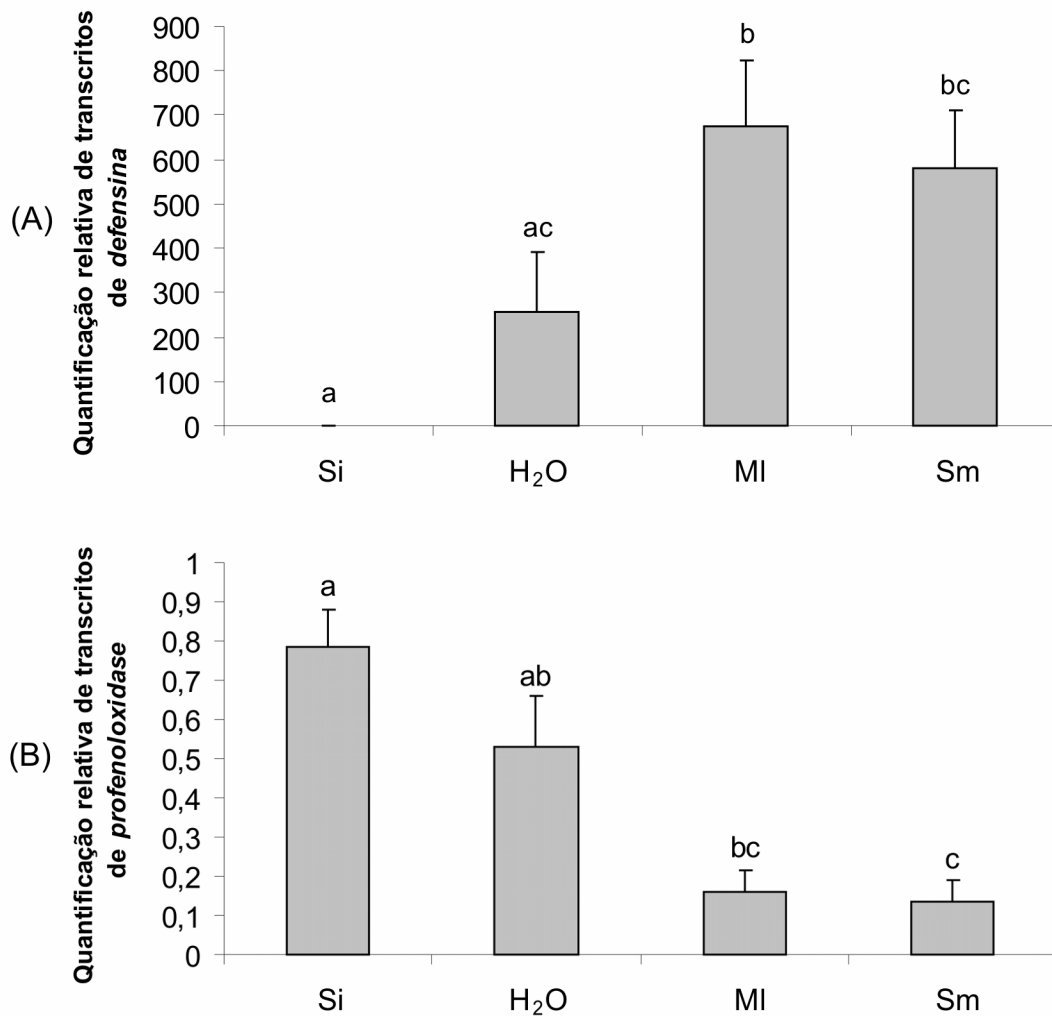


Figura 23- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de **(A)** *defensina* e **(B)** *profenoloxidase* em abelhas *Apis mellifera* injetadas com água (H₂O), com *Micrococcus luteus* (MI) ou com *Serratia marcescens* (Sm). O controle não recebeu qualquer tipo de injeção (Si). Foi usado *rp49* como controle endógeno. O gráfico foi gerado a partir de quantificação de 3-4 amostras (n=3-4). Cada amostra representa quatro indivíduos. Gráfico: média + erro padrão. Letras: diferenças estatísticas entre os grupos (p<0,05).

Tendo a confirmação de que as abelhas responderam à infecção, nos propusemos a investigar as proteínas de estocagem nestas abelhas. Os resultados revelaram que o perfil da quantificação de transcritos dos grupos tratados foi muito semelhante entre *vitelogenina* e *lipoforina III* (Figura 24A e D). Os níveis de transcritos de *vitelogenina* diminuíram com os tratamentos, mas foi somente significativo com tratamento com *M. luteus* (ANOVA; $p < 0,05$; $n=4$). Já para *lipoforina III*, as abelhas injetadas tanto com a bactéria *M. luteus* quanto a *S. marcescens* apresentaram quantidade ainda menor de transcritos deste gene com relação às abelhas injetadas com água – injúria (ANOVA; $p < 0,05$; $n=4$) (Figura 24D). Os níveis de transcritos de *hexamerina 70a* (ANOVA; $p=0,166$; $n=4$) e *lipoforina I* (ANOVA; $p=0,21$; $n=4$) não variaram significativamente entre os grupos tratados e controle (Figura 24B e C).

Através de Western blot, observou-se que a diminuição na quantidade de transcritos do gene codificador da Vitelogenina também foi acompanhada pela diminuição desta proteína nos grupos tratados (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3-5$) (Figura 25A). Além disso, a quantidade da proteína Hexamerina 70a também parece diminuir em abelhas que sofreram injúria ou nas infectadas, mas esta diminuição não foi estatisticamente significativa (ANOVA; $p > 0,05$; $n=4$) (Figura 25B).

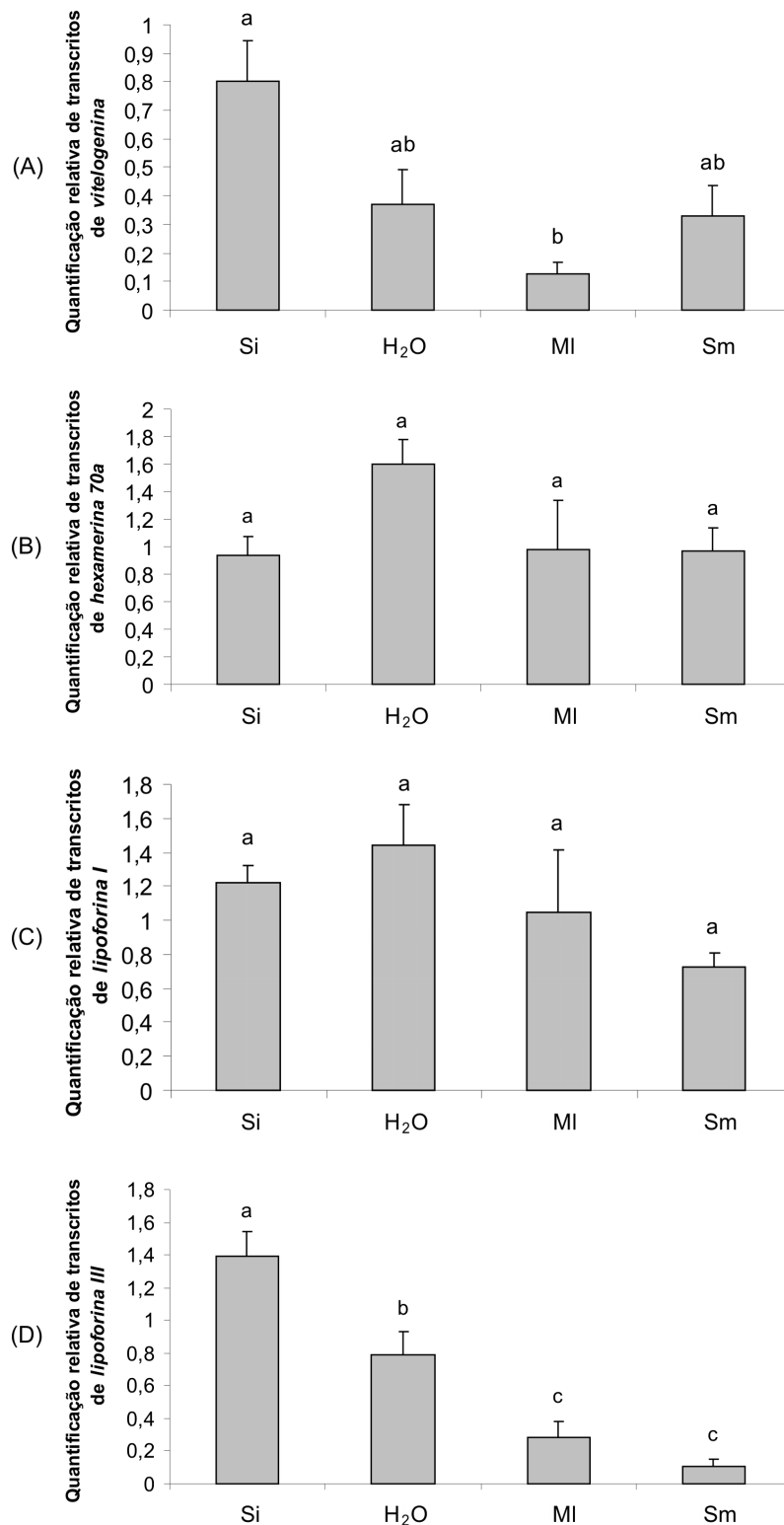


Figura 24- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de **(A)** *vitelogenina*, **(B)** *hexamerina 70a*, **(C)** *lipoforina I* e **(D)** *lipoforina III* em abelhas *Apis mellifera* injetadas com água (H₂O), *Micrococcus luteus* (MI) ou *Serratia marcescens* (Sm). O controle não recebeu qualquer tipo de injeção (Si). Foi usado *rp49* como controle endógeno. O gráfico foi gerado a partir de quantificação de quatro a oito amostras (n=4-8). Cada amostra representa quatro indivíduos. Gráfico: média + erro padrão. Letras: diferenças estatísticas entre os grupos (p<0,05).

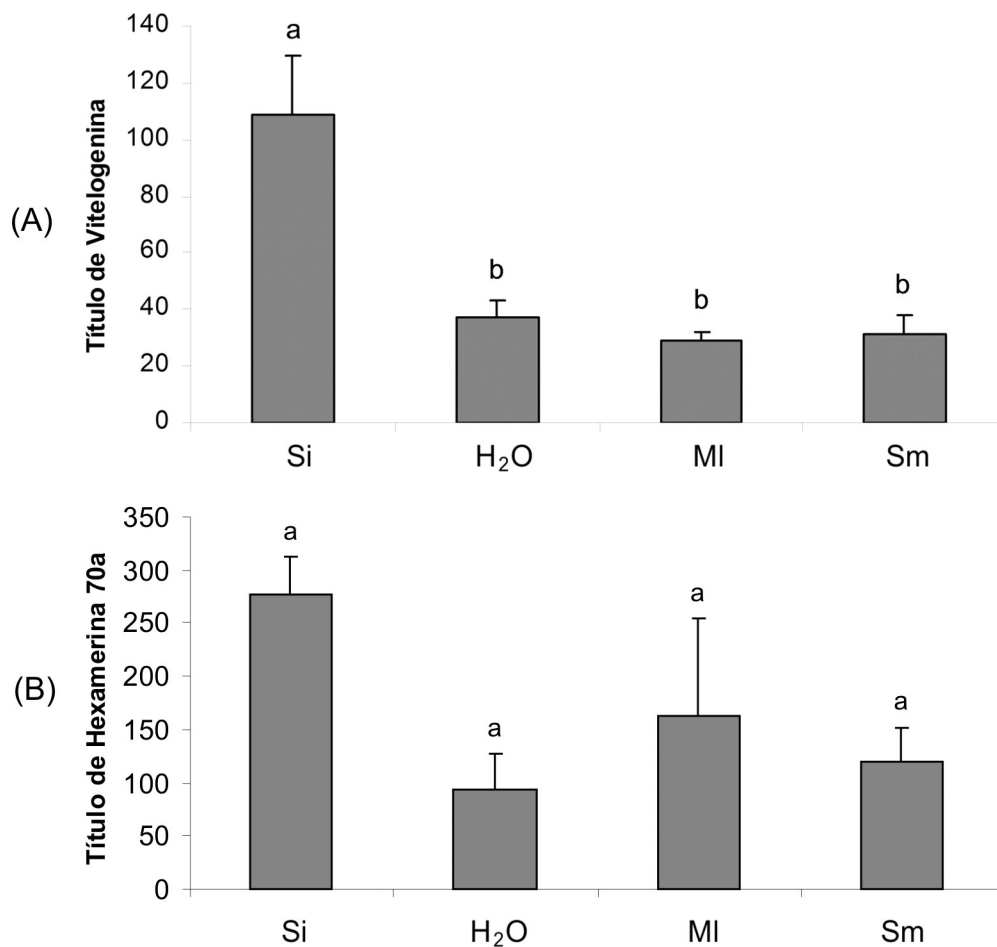


Figura 25- Quantidade das proteínas **(A)** Vitelogenina e **(B)** Hexamerina 70a, por Western blot, do abdômen de abelhas *Apis mellifera* injetadas com água (H₂O), *Micrococcus luteus* (MI) ou *Serratia marcescens* (Sm). O controle não recebeu qualquer tipo de injeção (Si). Para construção do gráfico, foi usada densitometria da imagem das bandas geradas por dois experimentos de Western blot, usando-se anticorpo desenvolvido contra proteínas do ovo de *A. mellifera* para Vitelogenina e anticorpo específico para Hexamerina 70a de *A. mellifera*. O gráfico de título de Vitelogenina foi gerado a partir da quantificação de três amostras (n=3) para H₂O, MI e Sm e cinco amostras (n=5) para Si. Para o título de Hexamerina, a quantificação foi feita a partir de quatro amostras (n=4). Cada amostra representa quatro indivíduos. Gráfico: média + erro padrão. Letras: diferenças estatísticas entre os grupos (p<0,05).

5- Imunidade em abelhas alimentadas com diferentes dietas

Abelhas recém-emergidas receberam três tipos de dietas com diferentes quantidades de proteína e açúcar. Concomitantemente com estes tipos de alimento, as abelhas receberam água contendo a bactéria Gram-negativa *S. marcescens* (10^2 a 10^3 bactérias/ μ l) ou sem bactéria (controle) durante seis dias. Deste modo, observamos como as abelhas alimentadas com tipos diferentes de alimento responderam à infecção. Surpreendentemente, nenhum tipo de tratamento alimentar fez com que as abelhas infectadas aumentassem a quantidade de transcritos de *defensina* (ANOVA; $p=0,229$; $n=3$) (Figura 26A). Contudo, abelhas alimentadas com *beebread* apresentaram diminuição de transcritos de *profenoxidase*, como esperado, em abelhas infectadas (ANOVA; $p<0,05$; $n=3$) (Figura 26B).

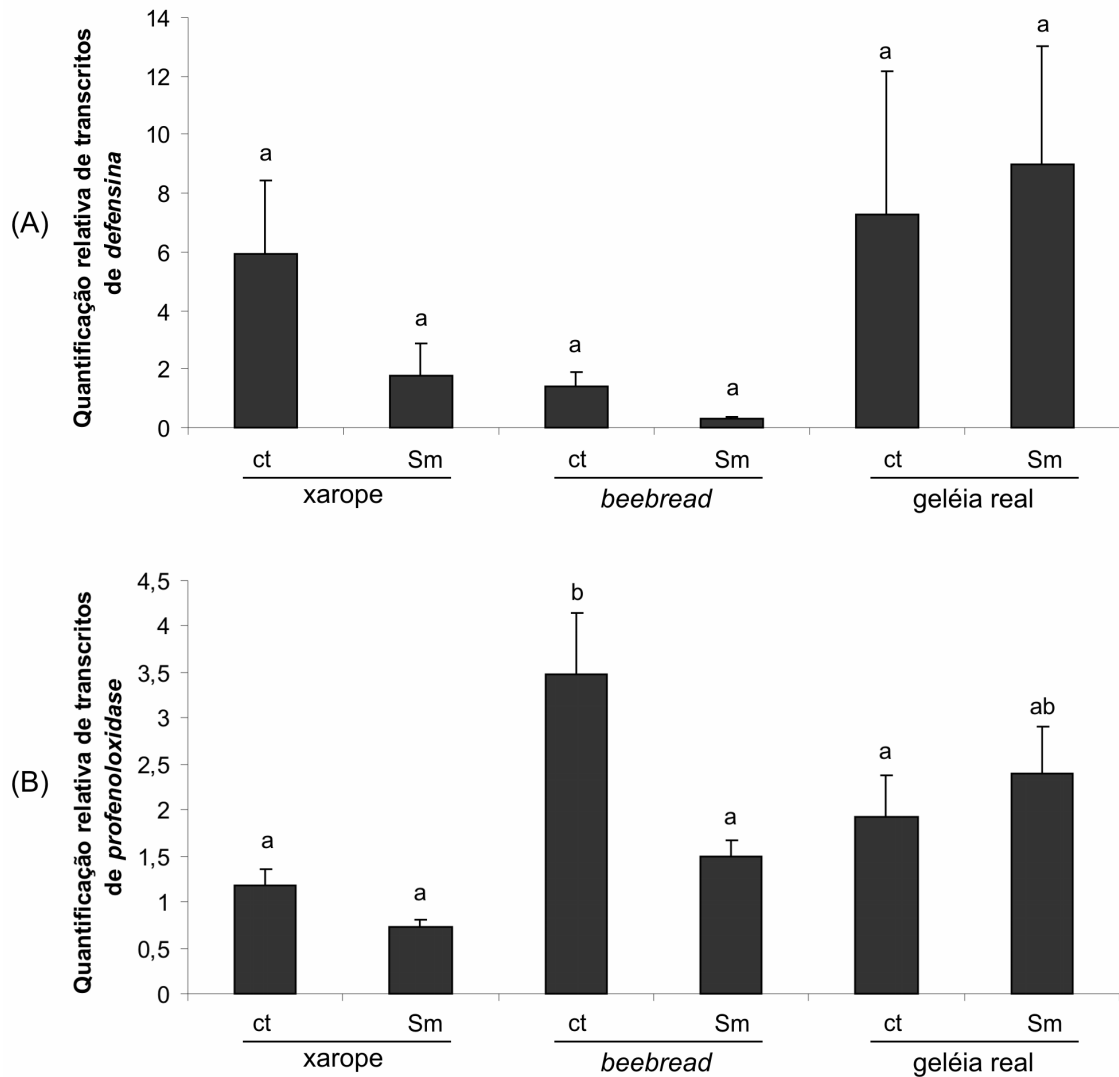


Figura 26- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de **(A)** *defensina* e **(B)** *profenoloxidase* em operárias *Apis mellifera*. Abelhas recém-emergidas receberam três dietas diferentes: xarope, *beebread* e geléia real. Um grupo de abelhas recebeu água contendo *Serratia marcescens* (Sm), e um outro grupo, o controle (ct), recebeu água somente. As coletas foram feitas após seis dias. Cada coluna é representada pela média de três amostras (n=3), sendo que cada uma é representada por quatro indivíduos. Gráfico: média + erro padrão. Letras: diferenças estatísticas entre os grupos (p<0,05).

A alimentação com *beebread*, rica em proteínas, provocou um aumento significativo na quantidade de transcritos das proteínas de estocagem em abelhas controle, ou seja, não infectadas, quando comparadas àquelas que foram alimentadas com xarope ou geléia real (Figura 27 A-D). Esta diferença foi claramente observada para a quantidade dos transcritos de *vitelogenina* e *hexamerina 70a* (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$) (Figura 27 A e B). O mesmo ocorreu quando a proteína Vitelogenina foi avaliada, e neste caso, a quantidade desta proteína nas abelhas que receberam uma das duas dietas ricas em proteínas, tanto o *beebread* quanto a geléia real, foi mais elevada que em abelhas que receberam somente xarope como alimento (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$) (Figura 28).

Com relação às proteínas de estocagem dos grupos de abelhas infectadas, somente as abelhas que receberam o alimento *beebread*, e foram contaminadas, mostraram diminuição na quantidade dos transcritos de *vitelogenina* (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$) (Figura 27A), de *hexamerina 70a* (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$) (Figura 27B) e de *lipoforina III* (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$) (Figura 27D). A quantidade de transcritos de *lipoforina I* não foi alterada significativamente em nenhum tipo de tratamento, apesar de mostrar uma ligeira diminuição em abelhas tratadas com *beebread* e infectadas (Figura 27C). Nenhuma alteração significativa na quantidade de transcritos entre o grupo controle e o infectado pôde ser observada com qualquer outro tipo de alimentação.

A quantidade de proteína Vitelogenina diminuiu após infecção com *S. marcescens* em abelhas que receberam *beebread*, como observado para os níveis de transcritos desta proteína, e também em abelhas alimentadas com geléia real e infectadas (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3$) (Figura 28).

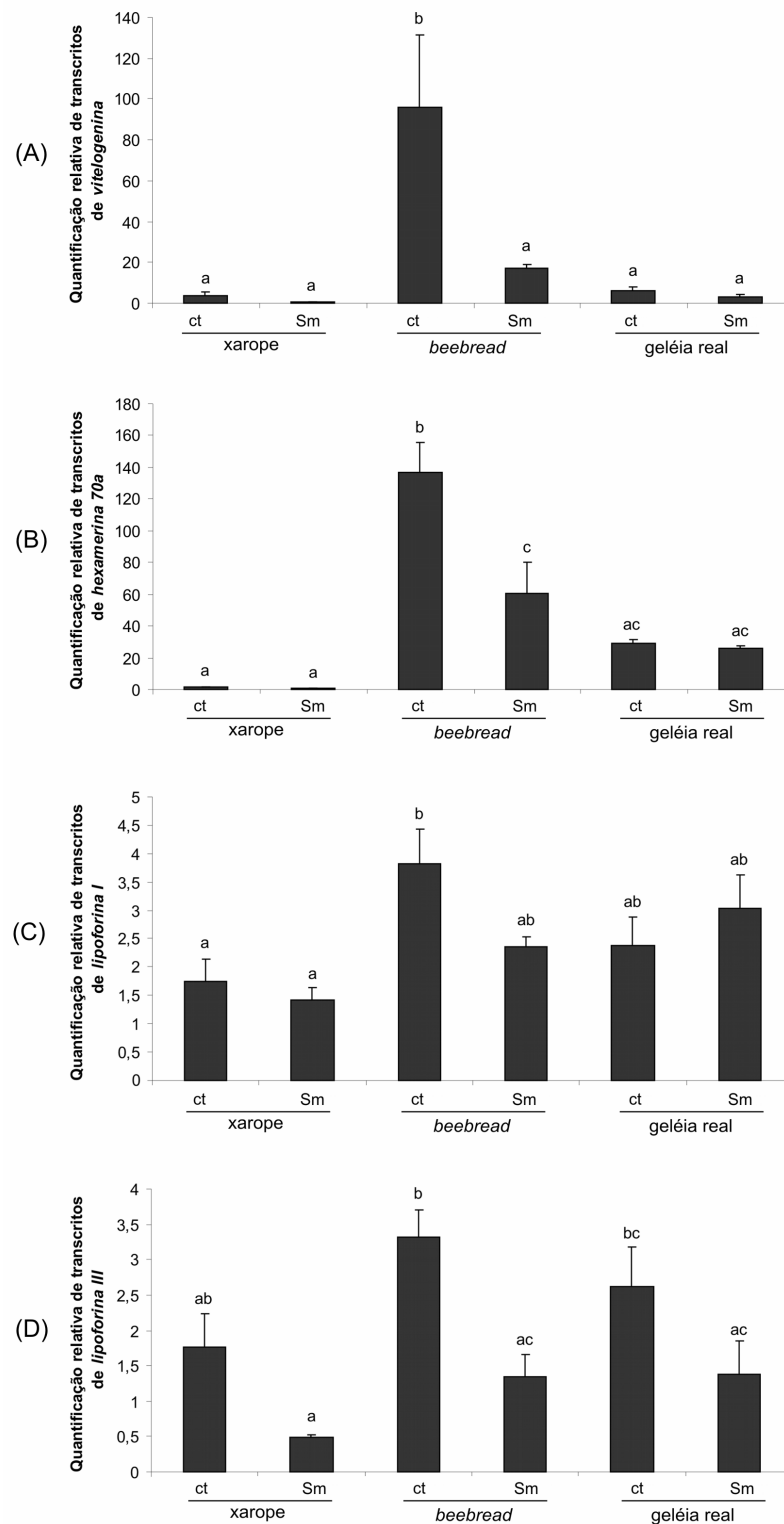


Figura 27- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de **(A)** *vitelogenina*, **(B)** *hexamerina 70a*, **(C)** *lipoforina I* e **(D)** *lipoforina III* em operárias *Apis mellifera*. Abelhas recém-emergidas receberam três dietas diferentes: xarope, *beebread* e geléia real. Um grupo de abelhas recebeu água contendo *Serratia marcescens* (Sm), um outro grupo, o controle (ct), recebeu água somente. As coletas foram feitas após seis dias. Cada coluna é representada pela média de três amostras (n=3), sendo que cada uma é representada por quatro indivíduos. Gráfico: média + erro padrão. Letras: diferenças estatísticas entre os grupos (p<0,05).

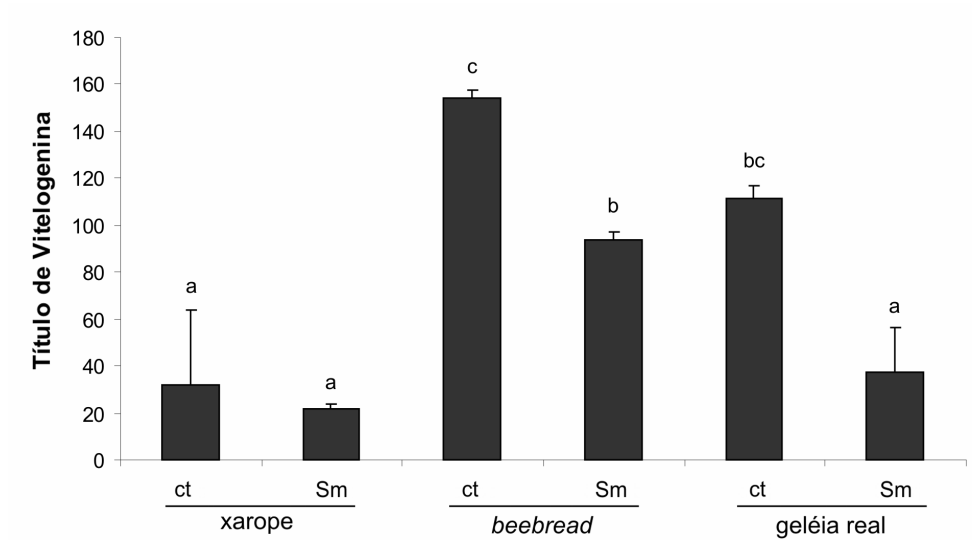


Figura 28- Quantidade de Vitelogenina na hemolinfa de operárias *Apis mellifera* que receberam diferentes dietas alimentares: xarope, *beebread* e geléia real. Um grupo de abelhas recebeu água contendo *Serratia marcescens* (Sm), um outro grupo, o controle (ct), recebeu água somente. O gráfico representa a densitometria da imagem das bandas de Vitelogenina em gel de poliácridamida 7,5%. A amostra de hemolinfa, usada para a quantificação em gel, corresponde aos mesmos *pools* de abelhas utilizados para quantificação de RNA mensageiro (Figura 27A).

6- Imuno-senescência

A capacidade de resposta imune em abelhas de diversas idades foi analisada através de infecção de abelhas recém-emergidas, nutridoras (com sete dias de idade) e forrageiras (com cerca de 20-40 dias de idade) de uma colônia típica. Além disso, foi montada uma colônia *single-cohort*, onde havia inicialmente somente abelhas recém-emergidas. Com esta colônia o fator idade foi eliminado quanto à resposta imune de abelhas infectadas, uma vez que as abelhas possuíam comportamento distinto (nutridora ou forrageiras) com uma mesma idade. As abelhas foram infectadas através de injeção de *S. marcescens* (injeção de 1 µl de uma solução 10³ bactérias/µl) e as controles não receberam qualquer tipo de injeção.

6.1- Colônia típica

Em colônia típica, a quantidade de transcritos da *defensina* foi maior em abelhas infectadas de todos os grupos, ou seja, em recém-emergidas, nutridoras e forrageiras (ANOVA; p<0,05; n=5-7) (Figura 29). Este resultado mostra que tanto as abelhas mais novas como as mais velhas são capazes de responder à infecção, através da ativação de transcrição de *defensina*.

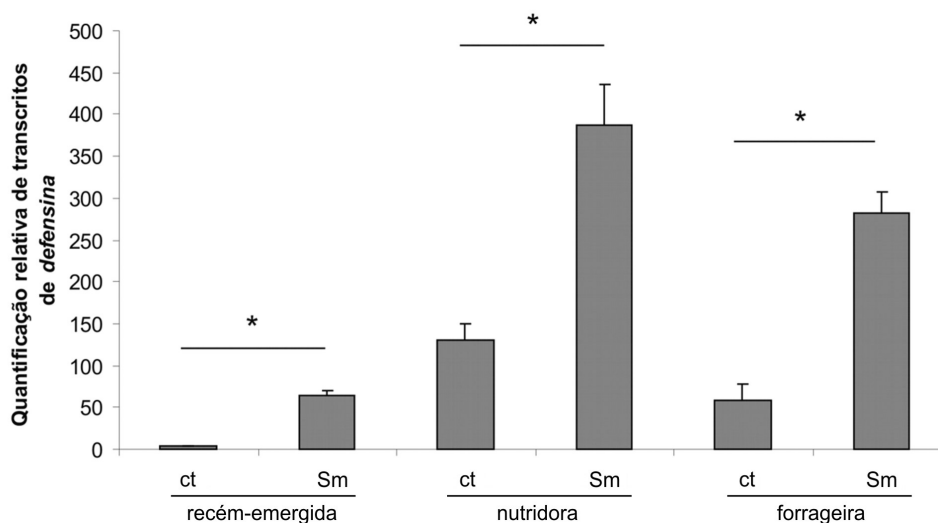


Figura 29- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de *defensina* em abelhas *Apis mellifera* de uma colônia típica. Abelhas de diversas idades: recém-emergidas, nutridoras e forrageiras, foram injetadas com bactérias *Serratia marcescens* (Sm). Os controles não receberam qualquer tipo de injeção (ct). As abelhas foram coletadas após cinco horas da injeção de bactérias. Foi usado *rp49* como controle endógeno. O gráfico foi gerado a partir de quantificação de amostras individuais (n=4-7). Gráficos: média + erro padrão. *diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

As abelhas em uma colônia típica, além de apresentarem idades diferentes e exercerem funções distintas na colônia, são também fisiologicamente diferentes. Uma das proteínas que varia de acordo com a idade das abelhas é a Vitelogenina. Por este fato, e pelo envolvimento desta proteína na imunidade, a quantidade de transcritos de *vitelogenina* foi analisada. Os níveis de transcritos deste gene diminuíram significativamente em abelhas recém-emergidas e forrageiras após infecção com bactéria (ANOVA; $p < 0,05$; n=5-7) (Figura 30A). Porém, nenhuma alteração foi observada em abelhas nutridoras (ANOVA; $p = 0,519$; n=4-5). A análise das proteínas em gel de poliacrilamida revelou que as abelhas nutridoras apresentaram maior quantidade desta proteína de estoque quando comparadas às recém-emergidas e forrageiras (Figura 30B). Um resultado surpreendente foi a baixa quantidade de transcritos de *vitelogenina* em

nutridoras (Figura 30A), mas segundo Gro Amdam (comunicação pessoal) existe uma resposta negativa na síntese de transcritos de *vitelogenina* pela alta quantidade da proteína já existente.

A alimentação também é uma outra característica que difere as abelhas com comportamentos distintos. Em abelhas forrageiras o consumo de açúcares é maior, a fim de fornecer energia para o vôo. Já as abelhas nutridoras consomem maior quantidade de proteínas como recurso para a produção de alimento para as crias. Esta diferença faz com que os genes da via de insulina apresentem maior transcrição em forrageiras. Neste trabalho, foram usados os genes *peptídeo do tipo insulina* e *bombyxina*, que participam da via da insulina. Em abelhas que não foram infectadas, ou seja, as controles, os transcritos de *peptídeo do tipo insulina* estão presentes em maior quantidade em forrageiras, como o esperado (ANOVA; $p < 0,05$; $n=5$) (Figura 30C). No entanto, a quantidade de transcritos de *bombyxina* é a mesma para nutridoras e forrageiras (Figura 30D). Após cinco horas de infecção por bactérias, os níveis de transcritos do gene *peptídeo do tipo insulina* apresentaram um aumento significativo em nutridoras e uma queda significativa em forrageiras quando comparadas aos controles sem infecção (ANOVA; $p < 0,05$; $n=3-5$) (Figura 30C). A transcrição de *bombyxina*, no entanto, não se alterou significativamente após infecção, apesar de apresentar ligeira queda nas abelhas infectadas (Figura 30D).

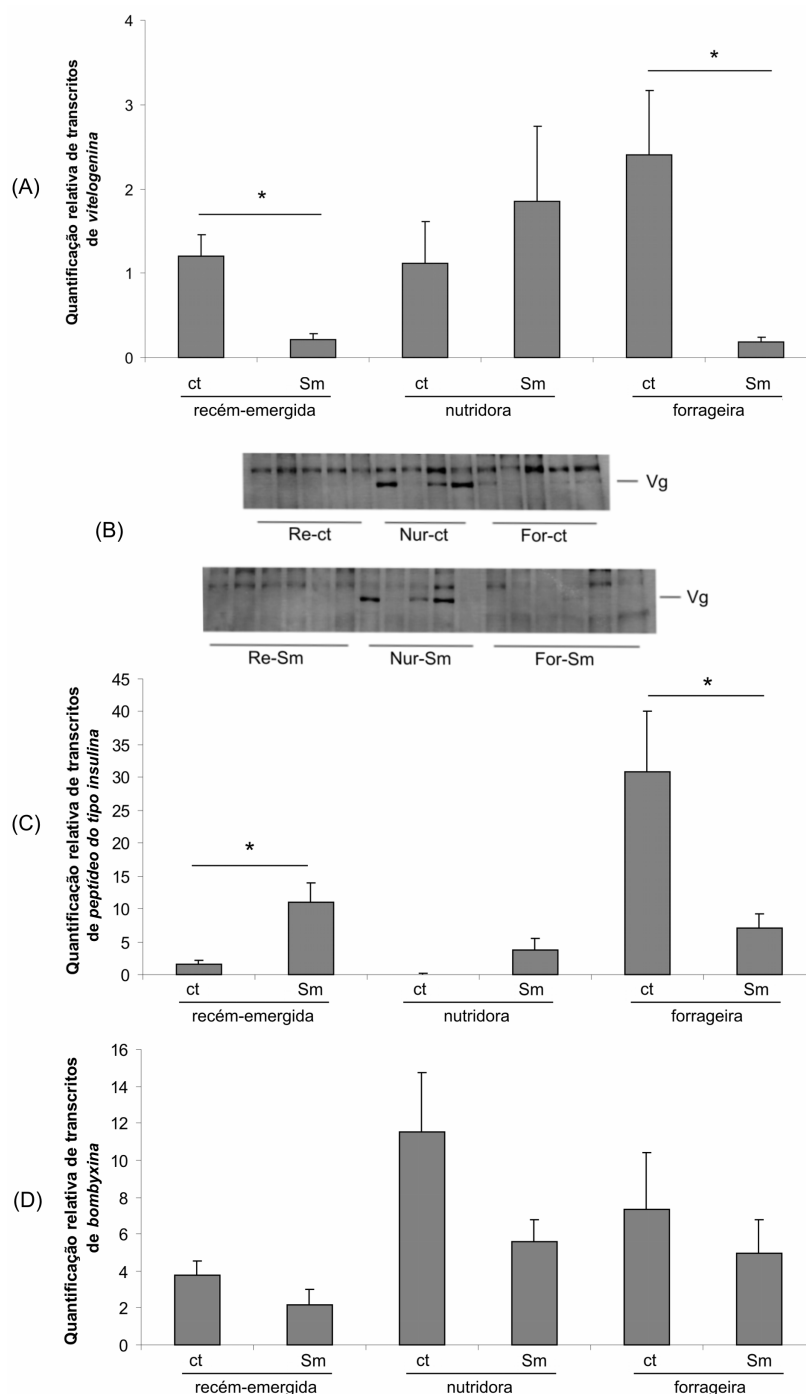


Figura 30- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de **(A) vitelogenina**, **(C) peptídeo do tipo insulina** e **(D) bomyxina** em abelhas *Apis mellifera* de uma colônia típica. Abelhas de diversas idades: recém-emergidas, nutridoras e forrageiras, foram injetadas com bactérias *Serratia marcescens* (Sm). Os controles não receberam qualquer tipo de injeção (ct). As abelhas foram coletadas após 5 horas da injeção de bactérias. Foi usado *rp49* como controle endógeno. O gráfico foi gerado a partir de quantificação de amostras individuais (n=3-7). Gráficos: média + erro padrão. *diferença estatística entre os grupos (p<0,05). **(B)** Perfil protéico da hemolinfa em gel de poliácridamida 7,5%, evidenciando Vitelogenina de abelhas *Apis mellifera*. As amostras são as mesmas usadas para quantificação relativa de RNA mensageiro.

Um experimento de sobrevivência foi feito com estas abelhas (recém-emergidas, nutridoras e forrageiras) infectadas com *S. marcescens*. As bactérias diluídas em água (10^2 bactérias/ μ l) foram fornecidas para ingestão nos dois primeiros dias de um experimento de dez dias. As abelhas que mais morreram foram as forrageiras, tanto as controles quanto as infectadas, quando comparadas às recém-emergidas e nutridoras (Figura 31). No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa na sobrevivência entre as forrageiras controles e infectadas (Kaplan-Meier; $p=0,12$). As nutridoras infectadas morreram mais que as controles (Kaplan-Meier; $p<0,0001$). Já as recém-emergidas infectadas morreram mais nos primeiros dias de infecção, mas posteriormente menor sobrevivência foi observada em abelhas do grupo controle (Kaplan-Meier; $p=0,0227$).

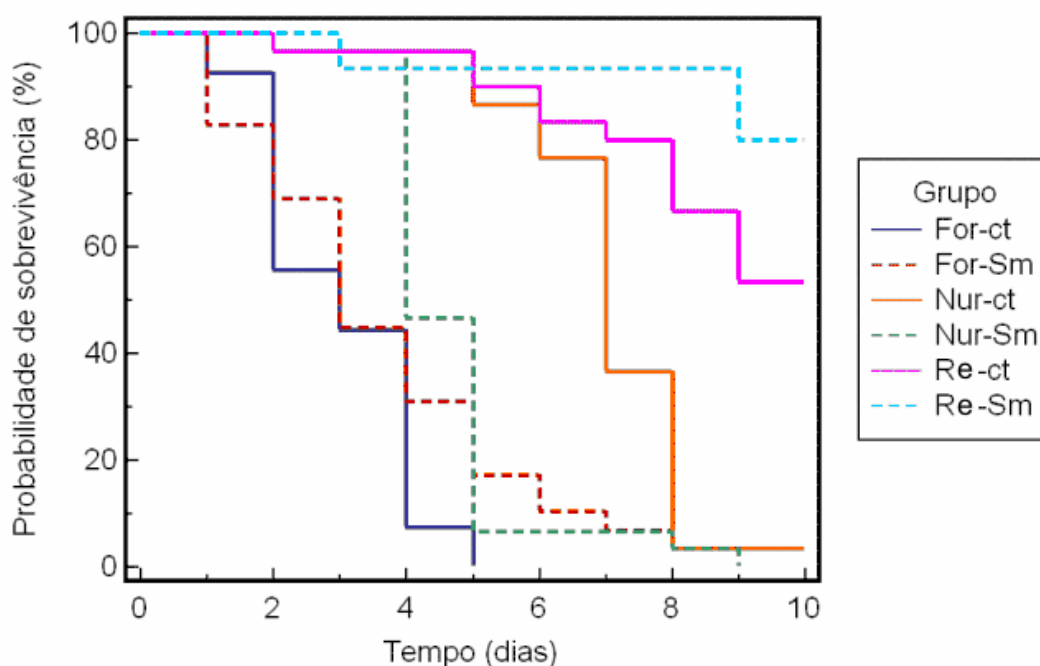


Figura 31- Curva de probabilidade de sobrevivência de abelhas *Apis mellifera*, de uma colônia típica, infectadas com *Serratia marcescens*. Abelhas recém-emergidas (Re), nutridoras (Nur) e forrageiras (For) foram alimentadas com bactérias *S. marcescens* (Sm) diluídas em água (10^2 bactérias/ μ l) nos dois primeiros dias. Os controles receberam água sem bactéria (ct). O experimento durou 10 dias. Re-ct (n=30), Re-Sm (n=30), Nur-ct (n=30), Nur-Sm (n=30), For-ct (n=27), For-Sm (n=29).

6.2- Colônia *single-cohort*

Duas coletas distintas foram feitas com abelhas da colônia *single-cohort*: abelhas nutridoras e forrageiras com idades de 6-8 dias (abelhas jovens), e abelhas com estes mesmos comportamentos, mas com 21-23 dias (abelhas velhas). Primeiramente, as abelhas nutridoras e forrageiras jovens apresentaram, como na colônia típica, aumento significativo nos níveis de transcritos de *defensina* após infecção (ANOVA; $p < 0,05$; $n=6$) (Figura 32). Diferentemente do que ocorreu em abelhas de colônia típica, abelhas nutridoras jovens apresentaram redução significativa (ANOVA; $p < 0,05$; $n=6$) da quantidade de transcritos de *vitelogenina* (Figura 33A). No entanto, a quantidade da proteína Vitelogenina em nutridoras e forrageiras não apresentou diferença (Figura 33B). Isto mostra, que apesar das abelhas executarem tarefas diferentes, elas não apresentaram quantidade de Vitelogenina característica ao comportamento, provavelmente por serem muito jovens. Contraditoriamente, o título de hormônio juvenil das abelhas forrageiras apresentou-se significativamente mais alto que em abelhas nutridoras, como esperado (ANOVA; $p < 0,05$; $n=6$) (Figura 33C). A quantidade deste hormônio, no entanto, não sofreu nenhuma alteração em abelhas infectadas (Figura 33C).

Outra evidência de que as abelhas ainda não apresentaram alguns fatores que as distinguiam fisiologicamente com relação ao comportamento foi a não alteração na quantidade de transcritos do *peptídeo do tipo insulina* ao se comparar nutridoras e forrageiras (Figura 34A). No entanto, de modo semelhante às abelhas de uma colônia típica, os níveis de transcritos deste gene diminuiram em abelhas infectadas, sendo significativo em nutridoras (ANOVA; $p < 0,05$; $n=6$) (Figura 34A). Nenhuma alteração foi observada na quantidade de transcritos da *bombyxina* (Figura 34B).

Novamente, as abelhas forrageiras foram mais susceptíveis à infecção (Figura 35), já que o grupo de forrageiras infectado apresentou uma taxa de mortalidade superior ao grupo de abelhas nutridoras infectadas (Kaplan-Meier; $p=0,0434$).

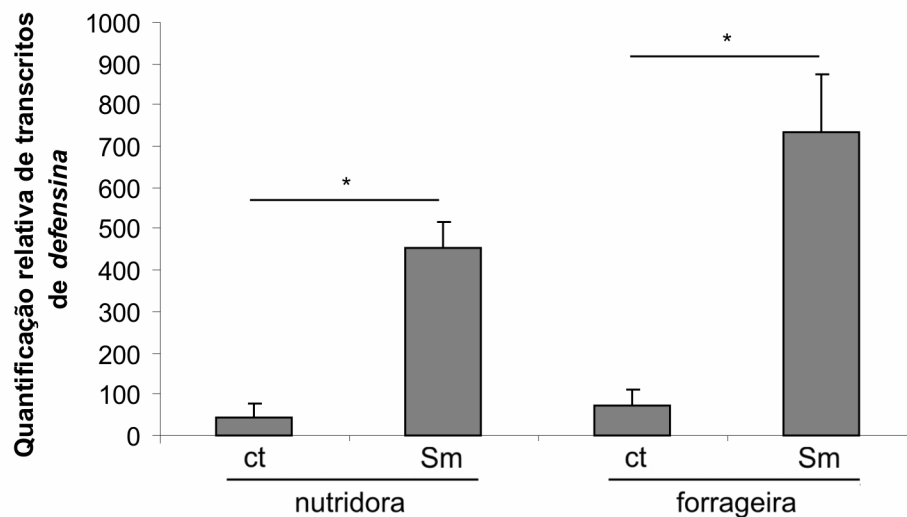


Figura 32- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de *defensina* em abelhas *Apis mellifera* de uma colônia *single-cohort*. Abelhas nutridoras e forrageiras foram injetadas com bactérias *Serratia marcescens* (Sm). Os controles não receberam qualquer tipo de injeção (ct). As abelhas foram coletadas após cinco horas da injeção de bactérias. Foi usado *rp49* como controle endógeno. O gráfico foi gerado a partir de quantificação de amostras individuais (n=6). Gráficos: média + erro padrão. *diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

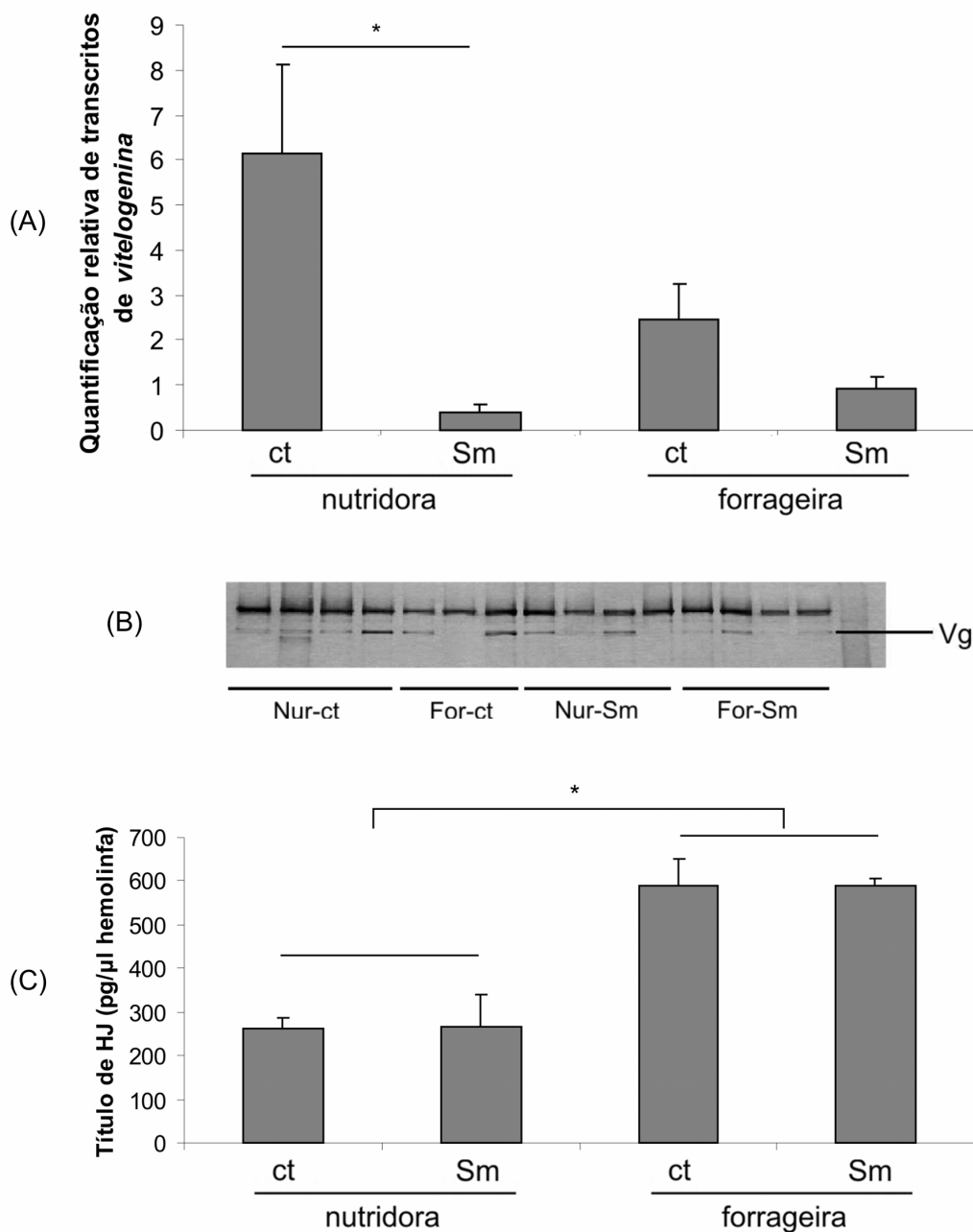


Figura 33- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de **(A)** vitelogenina em abelhas *Apis mellifera* de uma colônia *single-cohort*. Abelhas nutridoras e forrageiras foram injetadas com bactérias *Serratia marcescens* (Sm). Os controles não receberam qualquer tipo de injeção (ct). Foi usado *rp49* como controle endógeno. O gráfico foi gerado a partir de quantificação de amostras individuais (n=6). **(B)** Perfil protéico da hemolinfa em gel de poliacrilamida 7,5%, evidenciando Vitelogenina de abelhas *Apis mellifera*. As amostras são as mesmas usadas para quantificação de RNA mensageiro. **(C)** Título de hormônio juvenil por radioensaio da hemolinfa das abelhas utilizadas para quantificação de RNA mensageiro, acima citada. O número de amostras por grupo foi n=3, sendo que cada amostra representa de duas a três abelhas. As abelhas foram coletadas após cinco horas da injeção de bactérias. Gráficos: média + erro padrão. *diferença estatística entre os grupos (p<0,05).

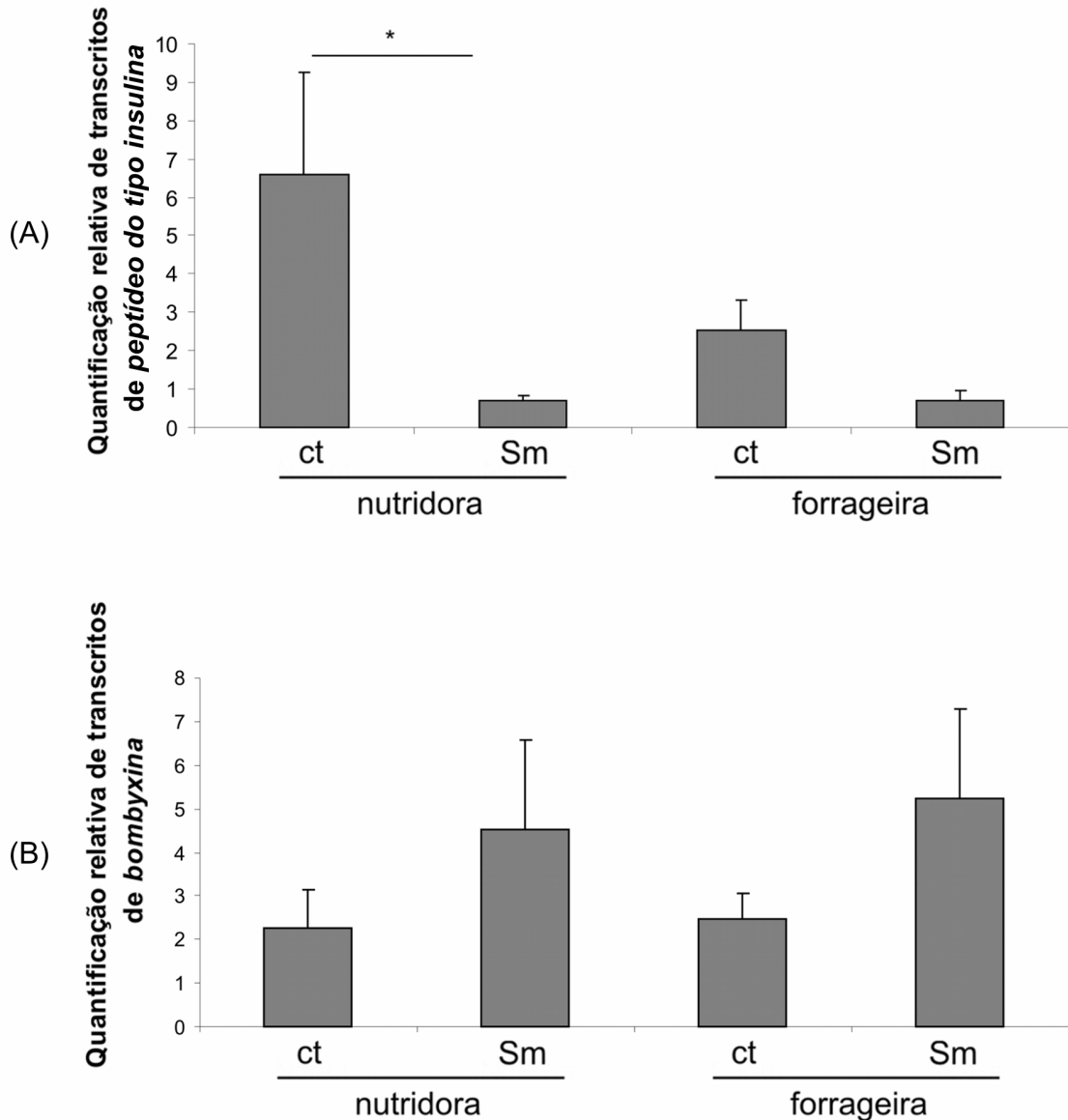


Figura 34- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de **(A)** *peptídeo do tipo insulina* e **(B)** *bombyxina* em abelhas *Apis mellifera* de uma colônia *single-cohort*. Abelhas de nutridoras e forrageiras foram injetadas com bactérias *Serratia marcescens* (Sm). Os controles não receberam qualquer tipo de injeção (ct). As abelhas foram coletadas após cinco horas da injeção de bactérias. Foi usado *rp49* como controle endógeno. O gráfico foi gerado a partir de quantificação de amostras individuais (n=6). Gráficos: média + erro padrão. *diferença estatística entre os grupos (p<0,05).

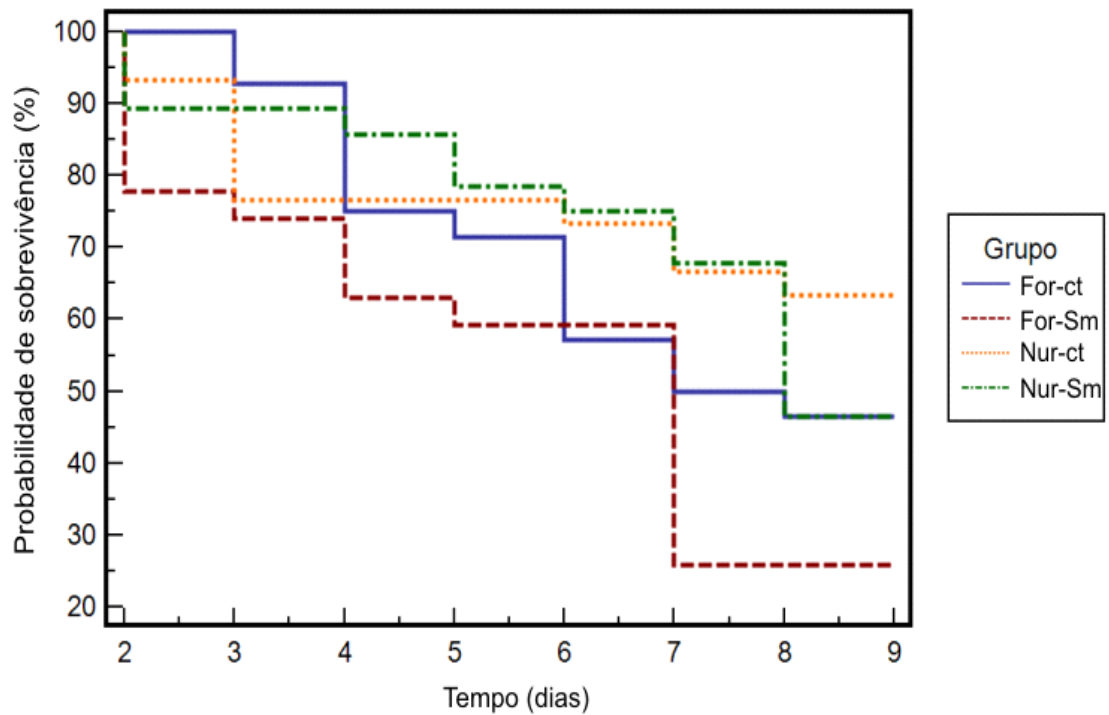


Figura 35- Curva de probabilidade de sobrevivência de abelhas *Apis mellifera*, de uma colônia *single-cohort*, infectadas com *Serratia marcescens* (Sm). Abelhas nutridoras (Nur) e forrageiras (For) de 6-8 dias de idade foram alimentadas com bactérias diluídas em água (10^2 bactérias/ μ l) nos três primeiros dias. Os controles receberam água sem bactéria (ct). O experimento durou nove dias. Nur-ct (n=30), Nur-Sm (n=28), For-ct (n=28), For-Sm (n=27).

As abelhas mais velhas (21-23 dias) da colônia *single-cohort* também apresentaram aumento na quantidade de transcritos de *defensina*, mostrando, claramente, a ativação da resposta imune tanto em abelhas nutridoras quanto em forrageiras (ANOVA; $p < 0,05$; $n = 5-6$) (Figura 36). Nenhuma alteração, no entanto, pôde ser observada na quantidade de transcritos de *vitelogenina* nos diferentes tipos de abelhas após infecção (ANOVA, nutridora: $p = 0,347$, $n = 5-6$; forrageira: $p = 0,326$, $n = 5-6$) (Figura 37A). Apesar de não se detectar mudança nos transcritos, pôde-se constatar que a hemolinfa das abelhas nutridoras apresentou uma taxa elevada de Vitelogenina (Figura 37B), que é uma característica fisiológica marcante destas abelhas. Os títulos de hormônio juvenil também se apresentaram maiores para as abelhas forrageiras com relação às nutridoras, reforçando as diferenças entre abelhas com estes dois tipos de comportamento (Figura 37C). No entanto, nenhuma alteração na quantidade deste hormônio foi observada entre abelhas infectadas e controles (Figura 37C).

Assim como observado para os transcritos de *vitelogenina*, a quantidade dos transcritos de *peptídeo do tipo insulina* e de *bombyxina* não se apresentou diferente entre as abelhas nutridoras e forrageiras sem infecção (Figura 38A e B). Após cinco horas de infecção, no entanto, parece haver redução na quantidade de transcritos de *peptídeo do tipo insulina* (Figura 38A), que apesar de não ser significativa é semelhante ao que aconteceu em abelhas mais jovens da *single-cohort* (Figura 34A).

O teste de sobrevivência mostrou mais uma vez que as abelhas forrageiras são mais susceptíveis à infecção (Figura 39). Em todos os casos, as abelhas infectadas apresentaram maior taxa de mortalidade que as controles (Kaplan-Meier; nutridoras: $p = 0,048$, $n = 31$; forrageiras: $p = 0,012$, $n = 32-33$), e entre as infectadas, as forrageiras foram mais susceptíveis que as nutridoras (Kaplan-Meier; $p < 0,0001$; $n = 31-32$).

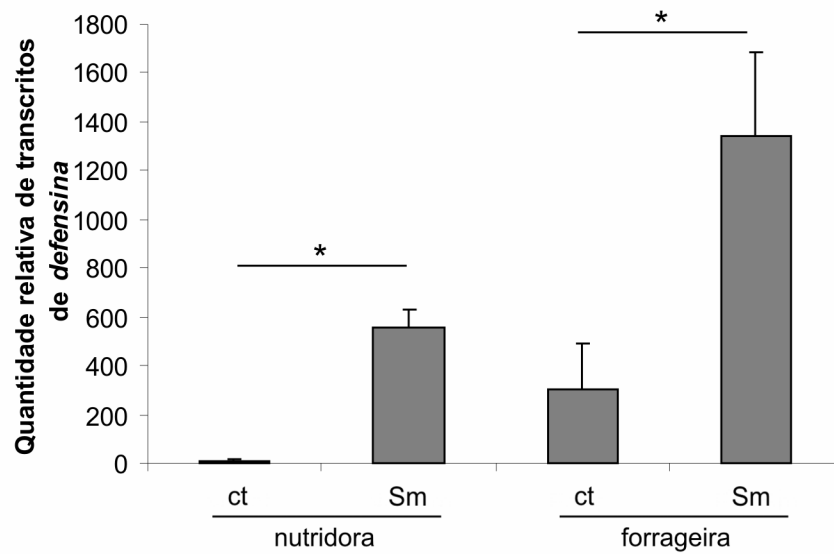


Figura 36- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de *defensina* em abelhas *Apis mellifera* de uma colônia *single-cohort*. Abelhas nutridoras e forrageiras foram injetadas com bactérias *S. marcescens* (Sm). Os controles não receberam qualquer tipo de injeção (ct). As abelhas foram coletadas após cinco horas da injeção de bactérias. Foi usado *rp49* como controle endógeno. O gráfico foi gerado a partir de quantificação de amostras individuais (n=5-6). Gráficos: média + erro padrão. *diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

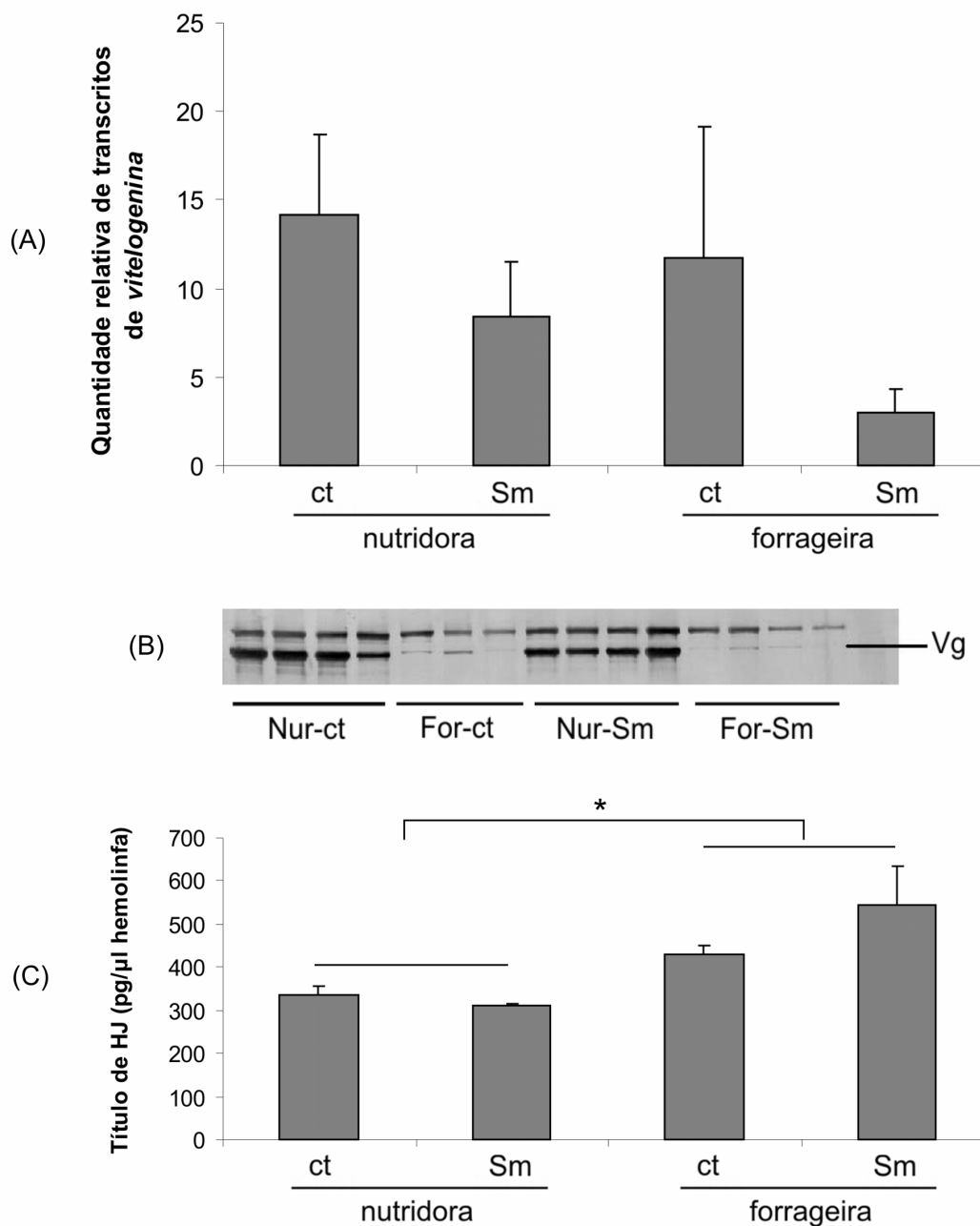


Figura 37- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de (A) *vitelogenina* em abelhas *Apis mellifera* de uma colônia *single-cohort*. Abelhas nutridoras (Nur) e forrageiras (For) foram injetadas com bactérias *Serratia marcescens* (Sm). Os controles não receberam qualquer tipo de injeção (ct). Foi usado *rp49* como controle endógeno. O gráfico foi gerado a partir da quantificação de amostras individuais (n=5-6). (B) Perfil protéico da hemolinfa em gel de poliácridamida 7,5%, evidenciando Vitelogenina (Vg) de abelhas *A. mellifera*. Amostras referentes às mesmas usadas para quantificação relativa de RNA mensageiro. (C) Título de hormônio juvenil por radioimunoensaio da hemolinfa das abelhas utilizadas para quantificação relativa de RNA mensageiro, acima citada. O número de amostras por grupo foi n=2, sendo que cada amostra representa três abelhas. As abelhas foram coletadas após cinco horas da injeção de bactérias. Gráficos: média + erro padrão. *diferença estatística entre os grupos (p<0,05).

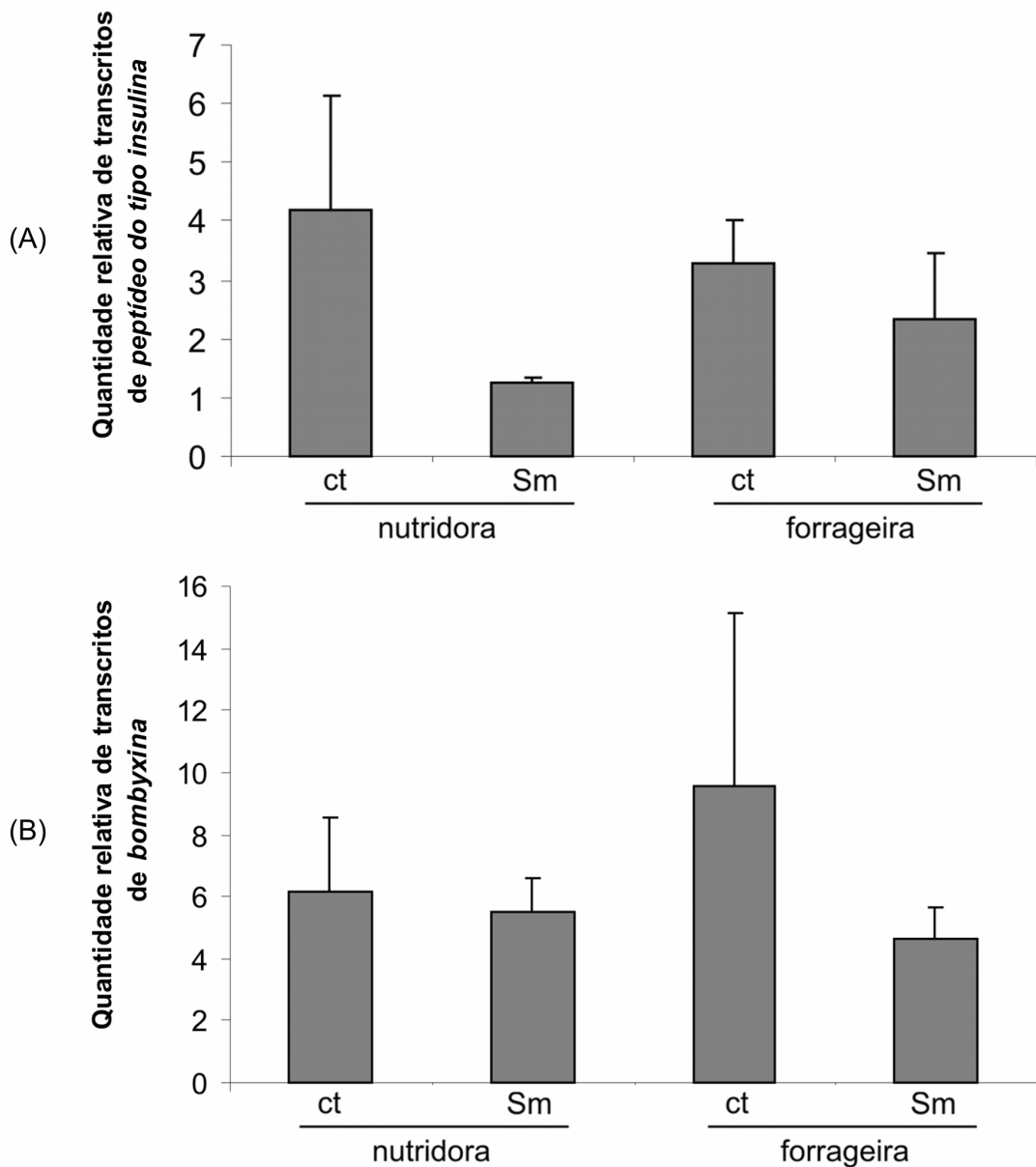


Figura 38- Quantidade relativa por real-time RT-PCR de transcritos de **(A)** *peptídeo do tipo insulina* e **(B)** *bombyxina* em abelhas *Apis mellifera* de uma colônia *single-cohort*. Abelhas nutridoras (Nur) e forrageiras (For) foram injetadas com bactérias *Serratia marcescens* (Sm). Os controles não receberam qualquer tipo de injeção (ct). Foi usado *rp49* como controle endógeno. As abelhas foram coletadas após cinco horas da injeção de bactérias. O gráfico foi gerado a partir de quantificação de amostras individuais (n=5-6). Gráficos: média + erro padrão. *diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

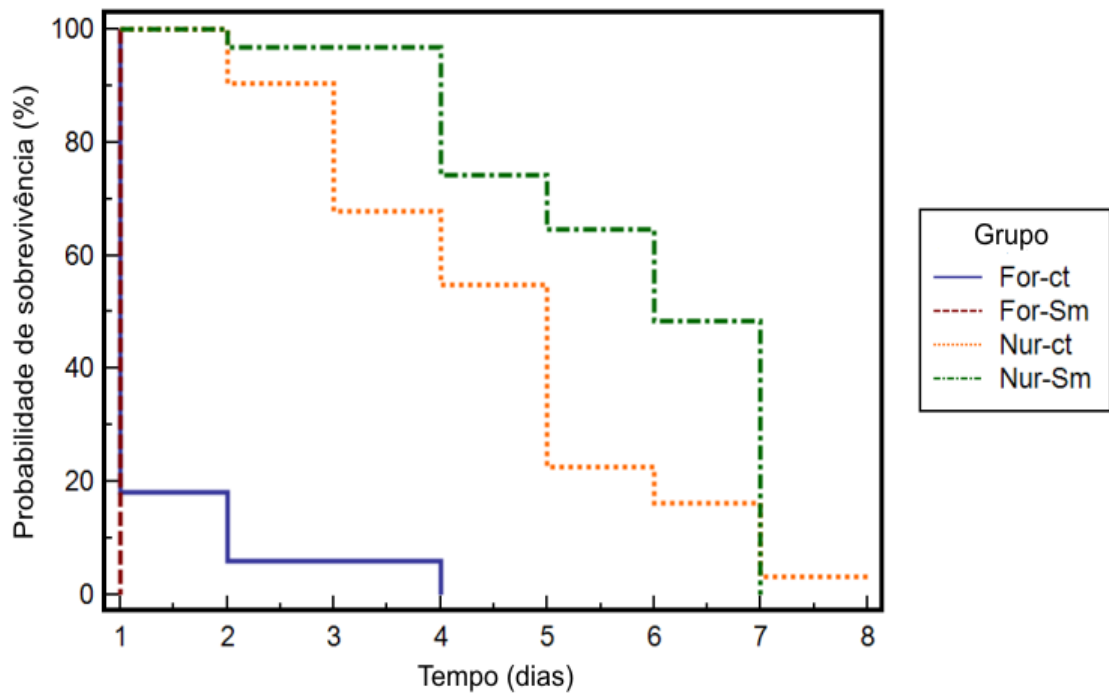


Figura 39- Curva de probabilidade de sobrevivência de abelhas *Apis mellifera*, de uma colônia *single-cohort*, infectadas com *Serratia marcescens*. Abelhas nutridoras (Nur) e forrageiras (For) de 21-23 dias de idade foram alimentadas com bactérias *S. marcescens* (Sm) diluídas em água (10^2 bactérias/ μ l) nos três primeiros dias. Os controles receberam água sem bactéria (ct). O experimento durou oito dias. Nur-ct (n=31), Nur-Sm (n=31), For-ct (n=33), For-Sm (n=32).

Discussão

Insetos sociais possuem certas características, como grande densidade populacional e uma alta similaridade entre os indivíduos, que fazem com que esses insetos sejam vulneráveis aos ataques de patógenos. Desta maneira, deve-se esperar que a abelha *Apis mellifera* possua uma resposta imune individual, como também, uma defesa social bastante adaptada. Trabalhos recentes vêm aumentando o conhecimento sobre imunidade individual, ou seja, gerada pelo indivíduo, nestes insetos, como por exemplo, através da identificação de peptídeos antimicrobianos, sua expressão e caracterização no combate aos microorganismos (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990; Casteels *et al.*, 1993; Casteels-Josson *et al.*, 1994; Gregory *et al.*, 2005; Kludiny *et al.*, 2005; Yang & Cox-Foster, 2005).

Recentemente, a análise do genoma de *A. mellifera* (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) aumentou significativamente o conhecimento de certas características do genoma destes insetos. Dentre elas, a diversidade reduzida das famílias de genes do sistema imune. No trabalho de análise do genoma com relação à resposta imune (Evans *et al.*, 2006), os genes de reconhecimento, sinalização e os efetores das vias intracelulares de resposta imune foram preditos como candidatos às vias de sinalização intracelular de Toll, Imd, JNK e JAK/STAT. No entanto, pouco ainda se sabe sobre a verdadeira função dos genes preditos na resposta imune de *A. mellifera*.

Genes de resposta imune em abelhas infectadas por bactérias

Neste trabalho usamos as bactérias *Micrococcus luteus* (Gram-positiva) e *Serratia marcescens* (Gram-negativa) em ensaios para infecção das abelhas, usando-se dois protocolos diferentes: injeção e alimentação. Além de injeção com bactérias, somente a injúria (injeção com água) também foi feita. A infecção por ingestão de *S. marcescens* foi conseguida com sucesso em *D. melanogaster* (Kylsten *et al.*, 1990), e também em *A. mellifera*, usando-se outros tipos de bactérias (Evans, 2004; Evans & Lopez, 2004). A bactéria *S. marcescens* é um patógeno oportunista e causa septicemia em abelhas e pode ser transmitida pelo ácaro varroa, um parasita de abelha (Glinski & Jarosz, 1992).

Em nossos experimentos verificamos a presença das bactérias na hemolinfa 24 horas após a ingestão de alimento infectado, mostrando que elas são capazes de passar pelo intestino atingindo a hemocele (dados não mostrados).

Entre os genes efetores analisados (*abaecina*, *hymenoptaecina*, *defensina*, *profenoloxidase* e *transferrina*) todos foram regulados positivamente ou com tendência ao aumento na quantidade de transcritos 12 horas após as injeções com bactérias, exceto *proPO*, em que a quantidade de transcritos não alterou significativamente, apesar de apresentar menores níveis em abelhas infectadas com *S. marcescens*. A diminuição na quantidade de transcritos deste gene também pôde ser observada quando abelhas adultas foram injetadas com a bactéria *P. larvae* ou *E. coli* (Yang & Cox-Foster, 2005; Zou *et al.*, 2006), ou então, quando larvas foram alimentadas com *P. larvae* (Zou *et al.*, 2006). Do mesmo modo que em abelhas infectadas por injeção, a *defensina* e *proPO* parecem ser ativados 6 e 12 horas após a infecção com bactérias pela alimentação, apesar de que somente *defensina* (6h após infecção) apresentou aumento significativo de transcritos. Contudo, a grande variação da resposta influenciou bastante nas análises estatísticas. Observamos, assim, que os genes efetores são regulados positivamente pela infecção por bactérias, seja por alimentação ou injeção, não diferindo entre os tipos de bactérias utilizadas. Além disso, a injúria por si mesma também é capaz de promover a transcrição destes genes. Em *Drosophila*, as duas vias de sinalização intracelulares também são ativadas pela injúria (Hoffmann & Reichhart, 2002). De maneira geral, abelhas infectadas por bactérias apresenta maior quantidade de transcritos dos genes codificadores dos peptídeos antimicrobianos e da Transferrina, muito provavelmente por todos estes genes serem regulados por um fator de transcrição do tipo Relish/NF- κ B, e por outro lado, são caracterizadas pela diminuição na quantidade de transcritos de *proPO*.

Os genes codificadores de todos os peptídeos encontrados na hemolinfa de abelha, ou seja, Apidaecinas, Abaecina, Hymenoptaecina e Defensina também foram ativados em abelhas adultas pela *Escherichia coli*, uma bactéria Gram-negativa (Casteels *et al.*, 1989; Casteels-Josson *et al.*, 1993; 1994). Desta maneira, estes autores sugerem

que a resposta imune não é específica. Resultado semelhante pôde ser visto quando abelhas adultas foram injetadas com *E. coli*, *Paenibacillus larvae* ou salina (Evans *et al.*, 2006). Estes resultados, adicionados aos encontrados neste trabalho, sugerem que a abelha não possui um sistema de resposta imune específico a uma bactéria patógena (*P. larvae*) ou outra qualquer (*E. coli*, *S. marcescens*, *M. luteus*). A evidência de que não existe um grupo de genes que são ativados devido ao tipo de infecção também foi vista por Irving *et al.* (2001) em *Drosophila*. Estes autores, utilizando-se da técnica de *microarray* de DNA, investigaram todo genoma deste inseto infectado com bactéria Gram-positiva, Gram-negativa ou fungo. Eles observaram que não existe uma clara distinção entre cada uma das infecções, uma vez que as mesmas categorias de genes foram induzidas por todas as infecções.

Com relação ao início de ativação dos peptídeos, Casteels-Josson *et al.* (1994) observaram um rápido aumento de transcrição dos genes em adultos entre três e quatro horas após a infecção, e que a transcrição dos genes *hymenoptaecina* e *abaecina* ocorreu bem antes que do gene *defensina*. Os autores correlacionaram os níveis baixos de transcritos de *defensina* com a baixa quantidade deste peptídeo na hemolinfa. Eles também mostraram que os níveis altos de transcrição dos genes dos peptídeos antimicrobianos perduraram por até 36 horas. Em nosso trabalho observamos que ocorre um aumento de transcrição dos peptídeos já em 3 horas, mas com 12 horas as abelhas começavam a morrer, talvez devido ao número e a patogeneicidade da bactéria. A bactéria *S. marcescens* é considerada como um microorganismo que, mesmo em pequeno número, é fatal para *Drosophila* (Flyg *et al.*, 1980; Kurz *et al.*, 2003; Lemaitre & Hoffmann, 2007). Não observamos, no entanto, que o gene codificador da Defensina tem menor quantidade de transcritos do que os outros peptídeos em 12 horas de infecção pela *S. marcescens*. Além disso, recentemente, foi demonstrado que a quantidade de transcritos do gene *defensina* é maior que do gene *abaecina* em larvas de *A. mellifera* (Evans, 2004). A contradição entre os resultados do trabalho de Casteels-Josson *et al.*

(1994) e dos trabalhos mais recentes (este trabalho e Evans, 2004) poderia ser explicada pelas diferenças nas técnicas empregadas, Northern blot ou real-time RT-PCR.

As larvas de primeiro ínstar de abelhas quando alimentadas com a bactéria *P. larvae* ou uma mistura de bactérias Gram-positivas, mostraram susceptibilidade por estas bactérias Gram-positivas através da ativação da transcrição de *abaecina*, porém, nenhuma alteração foi observada nos níveis de transcritos de *defensina*, como observado por Evans (2004) e Evans & Lopez (2004). Neste caso, os maiores níveis de expressão foram observados após 24 e 48 horas após a alimentação, e tempos menores (3, 6 e 12 horas) não foram suficientes para ativação. No trabalho aqui apresentado, o experimento com alimentação não foi tão efetivo quanto o de injeção, mas foi justamente em tempos menores (6 e 12 horas) que se observou um aumento nos níveis de transcritos da *defensina*. Este fato pode ter sido por duas razões. Primeiro, as espécies de bactérias utilizadas foram diferentes e elas podem ter provocado respostas diferentes. Segundo, as idades das abelhas foram diferentes (larvas e adultos) e isto pode ocasionar resultados também diferentes, considerando que alguns autores acreditam que o investimento na resposta imune seria diferente em cada fase do desenvolvimento (Amdam *et al.*, 2005), condicionado, inclusive, pelo ambiente em que vivem. Por exemplo, as crias de abelhas, que se desenvolvem em células não contaminadas ou muito pouco contaminadas, respondem muito mais à infecção com a síntese de Lisozima, uma enzima bacteriolítica, do que as abelhas adultas (Glinski & Jarosz, 1995).

Em *Drosophila*, as proteínas sinalizadoras Dorsal 1-B e Cactus pertencem à via Toll, e Relish pertence à via Imd. Em *A. mellifera*, os genes codificadores para estas proteínas respondem à injúria e infecção de adultos por injeção de diferentes tipos de bactérias, assim como de larvas por alimentação com bactérias (Evans *et al.*, 2006). No presente trabalho, estes genes foram regulados positivamente após injeção. O gene *dorsal 1-b* foi significativamente ativado somente por injúria, enquanto que *cactus* foi ativado independentemente do tipo de infecção (bactéria Gram-positiva ou Gram-negativa) ou sob injúria. Já o gene *relish* foi ativado pelos dois tipos de bactérias.

Contudo, nos experimentos com alimentação, nenhuma diferença significativa foi observada. Os resultados encontrados no presente trabalho, e também por Evans *et al.* (2006), reforçam a hipótese de que não exista em abelha uma ativação da via por especificidade de agente infeccioso.

Em *Drosophila* existem várias proteínas para o reconhecimento de microorganismos (Hultmark, 2003). Menor número de genes codificadores para estas proteínas em abelhas, pode também ser uma explicação para o tipo de resposta, tendo sido a resposta imune substituída em parte pelo componente social das abelhas (imunidade social). Dentre estas proteínas, analisamos a expressão de *PGRP* e *GNBP*, codificadores de proteínas de reconhecimento que proporcionam a ativação da via de sinalização Toll em *Drosophila*. Nos experimentos com injeção, somente infecção com *M. luteus* ocasionou aumento significativo da expressão de *GNBP*. Este resultado talvez indique a relação da ativação do gene codificador de *GNBP*, uma proteína de reconhecimento da via Toll, a partir de infecção por uma bactéria Gram-positiva (*M. luteus*). Esta é a única evidência de preferência de ativação da via de Toll por ativação de uma bactéria Gram-positiva em *A. mellifera*. Nos experimentos de infecção por ingestão de bactéria, no entanto, somente a transcrição do gene *PGRP* foi alterada e houve diminuição na quantidade de transcritos após 12 horas de tratamento com ambas bactérias, *S. marcescens* ou *M. luteus*.

De uma maneira geral, os experimentos com injeções foram mais efetivos na verificação de alteração dos níveis de transcritos dos genes. Isto se deve ao estresse provocado não somente pela infecção, mas pela injúria causada pela injeção. Quando alguns insetos são machucados, o sistema imune é induzido sem a presença de microorganismos, sugerindo que outros sinais induzem a resposta que não é baseada no reconhecimento de padrões (*pattern recognition*), tais como fatores do tipo citoquina. Interessantemente, o “modelo de perigo” (*Danger model*) proposto em vertebrados descreve um sistema imune que responde a substâncias que causam danos, e não simplesmente à presença de corpos estranhos (Gallucci & Matzinger, 2001). Sinais de

alarme são enviados por células estressadas, danificadas ou parasitadas para o início de diferentes tipos de resposta imune em tecidos distintos em resposta a patógenos. Exemplos destes sinais são as proteínas de choque térmico, nucleotídeos, moléculas reativas ao oxigênio, produtos desagregados da matriz extracelular e citoquinas como os interferons (revisado em Roxström-Lindquist, 2002). O efeito do estresse pôde ser verificado em abelhas através da ativação de genes quando somente injúria foi feita, talvez esta ativação seja importante para a preparação de uma eventual contaminação nestes insetos pelo ferimento produzido com a injeção. Além disso, os genes que foram mais fortemente induzidos foram os de peptídeos antimicrobianos e da Transferrina, indicando que o sistema imune de *A. mellifera*, através da transcrição de genes efetores, é gerado efetivamente no combate a possíveis microorganismos invasores.

Silenciamento de *profenoloxidase*

O RNA de interferência (RNAi) tem-se mostrado como uma poderosa ferramenta para investigar função gênica. Particularmente no caso de abelhas, o RNAi supre certas limitações para a pesquisa de genômica funcional nestes insetos, uma vez que a manipulação genética e os mutantes não estão disponíveis em abelhas. Esta técnica tem sido usada com sucesso em abelhas para silenciamento da expressão de *engrailed*, gene importante durante o desenvolvimento de embriões (Beye *et al.*, 2002), de *vitelogenina*, conhecida por sua ampla função além de ser a principal proteína do ovo (Amdam *et al.*, 2003; Guidugli *et al.*, 2005; Amdam *et al.*, 2006), de *tor* (*target of rapamycin*), importante na diferenciação de castas (Patel *et al.*, 2007), e ainda o gene *Am18w* envolvido na resposta imune, que codifica um receptor responsável pela transdução do sinal intracelular da via Toll, também foi silenciado em abelhas (Aronstein & Saldivar, 2005).

No presente estudo, experimentos de RNAi foram feitos visando o silenciamento de *proPO* de *A. mellifera*, para se verificar a importância deste gene na resposta imune e na pigmentação da cutícula. Em abelhas adultas, a injeção de dsRNA de *proPO* causou redução significativa tanto na quantidade de transcritos quanto na atividade da enzima

Fenoloxidase. Além disso, a injeção de diferentes doses de dsRNA de *proPO* mostrou que o silenciamento deste gene é maior em doses mais altas. Por outro lado, a especificidade do silenciamento da *proPO* foi verificada utilizando-se dois dsRNA diferentes, de um gene exógeno (*green fluorescent protein* - GFP) e de outro de uma Esterase de abelha (*Juvenile Hormone Esterase* - JHE). A injeção destes dsRNAs não causou diminuição nos níveis de transcritos de *proPO*, mostrando que o silenciamento de *proPO* foi específico.

O sucesso do silenciamento de *proPO* possibilitou verificar a importância deste gene na sobrevivência das abelhas perante infecção por bactérias *S. marcescens*. As abelhas com o silenciamento de *proPO* mostraram uma taxa de sobrevivência significativamente menor do que os controles injetadas com água quando estes dois grupos foram infectados. Contudo, as abelhas injetadas com dsRNA de GFP, usado como controle, foram tão susceptíveis às bactérias quanto as abelhas injetadas com dsRNA de *proPO*. Estes resultados mostram, assim, que a *proPO* não tem um papel relevante na proteção das abelhas contra infecção por *S. marcescens*.

Recentemente estudos com dípteros mostraram que a reação de melanização não é essencial para a sobrevivência destes insetos quando infectados por bactérias e fungos (Leclerc *et al.*, 2006; Schnitger *et al.*, 2007). Em abelhas, observamos também que o silenciamento de *proPO* foi tão prejudicial à sobrevivência dos adultos quanto do controle com dsRNA de GFP. Desta forma, nossos resultados também sugerem que a *proPO* não é crucial para sobrevivência das abelhas.

As pupas de abelhas também foram usadas como um sistema para se verificar a importância da Fenoloxidase na resposta imune, com algumas vantagens em relação aos adultos. Pelo fato da pupa ser imóvel, o refluxo da solução de injeção, muitas vezes observado em adultos, foi minimizado. Além disso, as pupas toleram dupla injeção (de dsRNA e de bactéria), e também maiores concentrações de dsRNA (20 µg) do que os adultos. Como em adultos, o silenciamento de *proPO* em pupas com a injeção de dsRNA de *proPO* também foi efetivo e mostrou-se específico ao se injetar dsRNA de GFP e de

um gene codificador de Lacase em abelhas (Lac). A melanização usada na defesa imune, porém, não ocorreu em pupas injetadas com dsRNA de proPO e seguida de injeção com *S. marcescens*. Da mesma maneira, pupas injetadas com dsRNA de GFP não mostraram melanização da hemolinfa após infecção. Estes tratamentos, então, inibiram de alguma forma o escurecimento da hemolinfa, que é uma evidência da síntese da melanina (Sugumaran, 2002). A melanização é um componente crítico no mecanismo de defesa celular em insetos, e a atividade da Fenoloxidase é de suma importância para a síntese de melanina (Beerntsen *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2005). A evidência direta do papel da Fenoloxidase em combater parasita foi demonstrada no mosquito *Armigeres subalbatus* (Shiao *et al.*, 2001). Este mosquito, quando inoculado com RNA *antisense* para proPO, não respondeu à infestação por microfilária. Neste caso, a melanização do parasita foi quase que completamente abolida. Assim como em abelhas adultas, o tratamento com um dsRNA de um gene exógeno foi bastante prejudicial para este inseto, fazendo com que as pupas não respondessem à injeção de *S. marcescens*. Estes resultados sugerem que a presença de um RNA fita dupla na hemocele inibe a reação da Fenoloxidase, claramente observada em pupas controles, sem injeção de dsRNA.

O processo da melanização em insetos tem sido descrito como essencial para outros eventos fisiológicos como no endurecimento do córion do ovo e da cutícula, assim como sua pigmentação (Christensen *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Em abelhas, a cutícula começa a receber depósitos de pigmentos no meio do estágio pupal. A cutícula, então, torna-se progressivamente escura e esclerotizada para formar o exoesqueleto do adulto. Recentemente, nós estabelecemos uma estreita relação entre a pigmentação cuticular e o aumento nos níveis de transcritos de proPO, assim como, da atividade da Fenoloxidase em abelhas (Zufelato *et al.*, 2004; Lourenço *et al.*, 2005). No presente estudo, nós demonstramos que a injeção de dsRNA de proPO em pupas de abelhas, e a conseqüente redução na quantidade de transcritos, resultou na inibição da pigmentação da cutícula, sugerindo que a Fenoloxidase participa no escurecimento do exoesqueleto. Todavia, a injeção de dsRNA de GFP, que não diminuiu a quantidade de transcritos de

proPO, também resultou em pupas sem pigmentação cuticular. Estes resultados poderiam ser devido ao efeito colateral de injeção de altas doses de dsRNA. Em mamíferos, altas doses de shRNA (*short-hairpin RNA*) usado pra o silenciamento gênico provoca danos a tecidos e acarreta mortalidade dos animais, muito provavelmente pela competição e saturação das vias compartilhadas pelo silenciamento por shRNA e microRNAs, reguladores endógenos de transcrição (Grimm *et al.*, 2006). A inibição da função dos microRNAs devido à saturação de vias endógenas, causada por altas doses de shRNA, também foi observada em estudos *in vitro* (Yi *et al.*, 2005). Decidimos, então, diminuir a dose de dsRNA, e as pupas injetadas com dsRNA alvo ou controle não apresentaram pigmentação da cutícula. Estes resultados sugerem que a Fenoloxidase não tem uma participação crucial na pigmentação da cutícula em abelhas.

Em insetos, as enzimas mais estudadas como função de melanização, fechamento de feridas, e imunidade são as Fenoloxidases conhecidas como Fenoloxidases do tipo Tirosinases (E.C. 1.10.3.1) (Ashida & Brey, 1998). O gene que codifica a Fenoloxidase do tipo Tirosinase em abelhas foi o alvo do presente estudo. Contudo, o papel de outra oxidase conhecida como Fenoloxidase do tipo Lacase (E.C. 1.10.3.2) foi, até o momento, pouco explorado. Recentemente, o envolvimento de ambas oxidases na pigmentação e endurecimento da cutícula foi estudado em *Tribolium castaneum* através de RNAi (Arakane *et al.*, 2005). Os resultados apontaram para as Lacases como enzimas principais no processo de pigmentação e endurecimento da cutícula neste besouro, embora não se possa ignorar uma pequena participação das Fenoloxidases do tipo Tirosinases neste processo.

Nossos resultados com relação à pigmentação das pupas indicam duas possibilidades. Primeiro, indicaria a possível participação das Lacases como principal enzima na pigmentação. Outra possibilidade seria o efeito drástico causado pela injeção de dsRNA, que provocou um atraso no desenvolvimento das pupas e, por conseguinte, mascarou o resultado de interferência da Fenoloxidase tipo Tirosinase para visualização da participação desta enzima na pigmentação cuticular de abelhas.

Os mamíferos possuem uma via de resposta ao dsRNA longo que induz a expressão de interferon e ativa duas enzimas dependentes de dsRNA, a proteína quinase dependente de dsRNA (PKR) e a 2',5' oligoadenilato sintetase (OAS) (Samuel, 2001). Esta via antiviral é conhecida como resposta do interferon. Os interferons são citocinas que funcionam como a primeira linha de defesa contra a infecção viral, através da ativação de uma resposta imune inata pela via do JAK/STAT (Sledz *et al.*, 2003). Os efeitos não específicos causados pela ativação da via do interferon inicialmente dificultou enormemente a aplicação da metodologia de RNAi em muitas células de mamíferos. Este problema aparentemente parecia ter sido superado com a descoberta dos RNAs de interferência curtos (siRNA), que efetivamente silenciava o transcrito alvo sem ativar o sistema do interferon (Harborth *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002). Todavia, pesquisas recentes têm sugerido que os siRNAs também podem ativar componentes do sistema do interferon, podendo assim, afetar amplamente a expressão de muitos genes (Kim *et al.*, 2004; Sledz *et al.*, 2003; Bridge *et al.*, 2003). Além disso, outros estudos recentes em mamíferos têm chamado a atenção para a existência de efeitos *off-target* do RNAi, isto é, do silenciamento de outros genes que não o alvo, devido a uma pequena porção de identidade do siRNA (Jackson *et al.*, 2003; Persengiev *et al.*, 2004). Em alguns casos, regiões possuindo uma seqüência de 11 a 15 nucleotídeos idênticos a de um gene, são suficientes para induzir o silenciamento gênico (Jackson *et al.*, 2003).

O processo de RNAi em *Drosophila* está intimamente relacionado com a via de sinalização intracelular do Toll na resposta imune gerada contra vírus de dsRNA (Zambon *et al.*, 2006), mas estes resultados são conflitantes com os de Dostert *et al.* (2005) que observaram que nenhum peptídeo antimicrobiano foi produzido após infecção com o vírus C (DVC) em *Drosophila*. Existem trabalhos, ainda, que mostram que a maquinaria de RNAi protege o adulto de *Drosophila* contra infecção viral (Galiana-Arnoux *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006), e que a via JAK/STAT também faz parte da resposta anti-viral em *Drosophila* (Dostert *et al.*, 2005). No entanto, existem evidências de que a imunidade baseada em RNAi é independente da via de sinalização JAK/STAT, uma vez que a

infecção por vírus não induz a via do RNAi e em mutantes desta via tiveram indução normal da via do JAK/STAT após infecção viral (Dostert *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). Apesar de resultados conflitantes, a alta similaridade da resposta imune inata entre os metazoários, desde plantas e insetos até mamíferos, evidencia a existência de um mecanismo ancestral de defesa (Janeway, 1989; Fearon & Locksley, 1996) e sugere que o sistema imune de insetos também seja ativado pelo dsRNA, assim como acontece em mamíferos. Além disso, recentemente, o efeito não específico (*off-target*) do RNAi associado com dsRNAs longos foram também observados em *Drosophila*, o que despertou a comunidade que trabalha com estes insetos para este problema (Kulkarni *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006; Moffat *et al.*, 2007). Podemos, assim, dizer que os dsRNAs podem gerar respostas inespecíficas através da ativação de genes da resposta imune e, também, pelos efeitos *off-target*.

A presença de um dsRNA longo na hemocele da abelha pode ter iniciado o processo de resposta imune a este invasor. Evidências de que o sistema imune da abelha é ativado na presença de dsRNA de GFP pode ser observado nos resultados de silenciamento de *dorsal* (discutido na próxima seção), onde a transcrição dos peptídeos antimicrobianos Abaecina e Defensina é maior em abelhas injetadas com dsRNA deste gene exógeno do que nos controles injetados com água.

Os resultados de silenciamento da proPO sugerem, de maneira geral, que o dsRNA tenha gerado ativação do sistema imune da abelha. Como consequência, o custo da resposta imune muito provavelmente tenha desacelerado o desenvolvimento das pupas e, em adultos, dificultado a visualização da importância deste gene na resposta contra bactérias. Não podemos, ainda, excluir a possibilidade de efeitos *off-target* promovidos pela injeção de dsRNA, que possam ter impedido conclusões mais definitivas sobre as funções do gene em questão.

Silenciamento de *dorsal 1-A*, *dorsal 1-B* e *dorsal 2*

Dorsal, uma proteína Relish, foi descrita em *Drosophila* como um importante fator de transcrição dos peptídeos antimicrobianos, sendo ativada pela presença de, principalmente, bactéria Gram-positiva e fungo (revisado em Hultmark, 2003). Até o momento foram descritos dois genes de *dorsal* em *A. mellifera*, *dorsal 1* e *dorsal 2* (Fan, 2001; Evans *et al.*, 2006). O gene *dorsal 1* codifica, por *splicing* alternativo, duas isoformas de *dorsal* chamadas, neste trabalho, de *dorsal 1-A* e *dorsal 1-B*, cujas isoformas foram caracterizadas e estudadas no trabalho de Fan (2001). O gene *dorsal 2* foi predito durante a análise do genoma de abelha, mas nenhum estudo funcional foi feito com este gene (Evans *et al.*, 2006).

Em outros insetos, duas isoformas de Relish do tipo Dorsal foram encontradas, *Rel1A* e *Rel1B*, em *Aedes aegypti* (Shin *et al.*, 2005), e *BmrelA* e *BmrelB*, em *Bombyx mori* (Tanaka *et al.*, 2005). As isoformas de Relish presentes nestes insetos são derivadas de *splicing* alternativo e pertencem ao tipo Dif-Dorsal, sendo importantes para resposta imune (Shin *et al.*, 2005, Tanaka *et al.*, 2005). É importante ressaltar que, até o presente momento, o ortólogo de Dif (*Dorsal related-immune factor*), mediador da via Toll em *Drosophila*, não foi ainda encontrado em outros insetos, inclusive mosquitos, o que leva muitos pesquisadores a atribuírem o papel do Dif ao Dorsal ou Relish nestes insetos (Barillas-Mury *et al.*, 1996; Sagisaka *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2005; Meister *et al.*, 2005). Nenhum ortólogo de Dif foi encontrado ao se analisar o genoma de *A. mellifera* (Evans *et al.*, 2006).

Em *Drosophila*, três moléculas Rel/NF- κ B – Dif, Dorsal e Relish – afetam a expressão de numerosos genes incluindo os peptídeos antimicrobianos, sendo que Dif e Dorsal fazem parte da via de sinalização Toll, e Relish da via Imd (revisado em Hultmark, 2003). Nestes mesmos insetos foi identificado Dorsal-B, um *splicing* que dá origem a um variante de Dorsal, sendo que a expressão de ambas formas aumenta no corpo gorduroso de larvas após infecção (Gross *et al.*, 1999). Em *A. mellifera*, o Dorsal 1-B, possui características muito parecidas com o ortólogo de *Drosophila*. Nos domínios C-

terminal está presente um sinal de localização nuclear (*nucleus localization signal - NLS*) bipartido (Shin *et al.*, 2005), além de outras regiões com alta similaridade como RHD (domínio Rel) e IPT_NF- κ B (domínio de transcrição do fator NF- κ B) na região N-terminal (Fan, 2001).

Neste trabalho, nós investigamos a contribuição de *dorsal* na resposta imune de pupas de olho branco de *A. mellifera* com o uso da técnica de RNAi injetando dsRNA de *dorsal 1-A* (dla), *dorsal 1-B* (dlb) e *dorsal 2* (dl2), bem como combinações destes dsRNA. Em todos os casos houve redução nos níveis de transcritos. A resposta de *dorsal 1-A*, *dorsal 1-B* e *dorsal 2* ao silenciamento foi maior em abelhas injetadas com dsRNA dos genes alvo cinco dias após a infecção quando comparados aos experimentos de três dias de tratamento. Não é de se surpreender que os níveis de transcritos de *dorsal 1-A* diminuam após tratamento com dsRNA de dl2, uma vez que as seqüências entre estes dois genes são muito parecidas, e a construção de um dsRNA longo não permitiu extrema exclusividade entre as seqüências. Desta maneira, o dsRNA de dl2 possui pequenas regiões complementares ao *dorsal 1-A* que foram suficientes para silenciar este gene, além de *dorsal 2*. O grupo de abelhas injetado com dsRNA de GFP foi escolhido como controle pelo fato de, uma maneira geral, apresentar alterações na transcrição gênica dos genes alvo.

A importância de Dorsal na imunidade foi testada através de infecção com a bactéria Gram-positiva *Paenibacillus larvae*, causadora de cria pútrida americana em abelhas, e com a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. Os genes codificadores da Abaecina e da Defensina foram, então, analisados, uma vez que estes peptídeos são muito provavelmente ativados por um fator de transcrição Rel/NF- κ B. Os níveis de transcritos de *abaecina* não se alteraram em nenhum dos grupos tratados, nem por tipos de bactérias ou pelo tempo de infecção. Em contraste, a quantidade de transcritos de *defensina* diminuiu significativamente em abelhas injetadas com dsRNA de dla+2 e de dla+b+2, após infecção com *P. larvae*. Estes resultados sugerem fortemente que o silenciamento de *dorsal 1-A* e/ou *dorsal 2* afetam na transcrição de *defensina* em abelhas

infectadas com bactéria Gram-positiva. Podemos observar, ainda, que a injeção de um dsRNA exógeno (GFP) foi suficiente para ativar a resposta imune, uma vez que a transcrição dos peptídeos Abaecina e Defensina, foi ativada. Assim, este grupo injetado com dsRNA de GFP foi considerado como grupo controle, também neste caso, já que este efeito, apesar de não desejado, aparentemente não interferiu nos resultados.

A Abaecina é um peptídeo, até o momento, exclusivo de *A. mellifera*. Ele possui 34 aminoácidos, é rico em prolina e possui grande similaridade com outro rico em prolina, a Drosocina (Casteels *et al.*, 1990; Casteels-Josson *et al.*, 1994; Casteels & Tempst, 1994). Estudos de atividade antimicrobiana revelaram que Abaecina age contra bactérias Gram-negativas (Casteels *et al.*, 1990; Fontana *et al.*, 2004). O fato de a Drosocina ser ativada pela via Imd em *Drosophila* (Hoffmann *et al.*, 1996) e da grande similaridade entre a Abaecina e a Drosocina, nos leva a sugerir que a regulação da Abaecina deva ser feita por Relish através da ativação da via Imd em abelhas. Assim, o silenciamento de *dorsal*, não acarretaria problemas na transcrição de *abaecina*, como observamos neste trabalho. Não podemos, no entanto, eliminar a hipótese de que o gene *abaecina* também seja regulado por outra via de sinalização (Toll), uma vez que não observamos maior quantidade de transcritos de *abaecina* em abelhas com infecção de uma bactéria Gram-negativa, a *E. coli*, quando comparada com infecção de *P. larvae*.

As Defensinas de insetos são peptídeos ricos em cisteínas e compostos de 36 a 46 aminoácidos, exceto para abelhas *A. mellifera* e *B. terrestris* que possuem 51 aminoácidos. Estes peptídeos mostram atividade contra um grande número de bactérias Gram-positivas, sendo que somente poucas Gram-negativas, fungos e leveduras são afetados pelas Defensinas (Bulet *et al.*, 1999). A diminuição nos níveis de transcritos de *defensina* de abelhas silenciadas e infectadas com uma bactéria Gram-positiva sugere fortemente que *dorsal* é responsável pela transcrição da *defensina*, na via de sinalização do Toll quando ativada por uma bactéria Gram-positiva. A via Toll em *Drosophila* controla a transcrição do peptídeo antifúngico Drosomicina, enquanto que a via Imd ativa a

transcrição dos peptídeos contra Gram-negativas Dipterocinas e Drosocinas. As Cecropinas, Attacinas e Defensinas parecem ser controladas pelas duas vias (Hoffmann *et al.*, 1996). Desta maneira, a transcrição de *defensina* não seria regulada somente por Dif/Dorsal, mas também por Relish. Este fato explica a razão de nem todos grupos com silenciamento de *dorsal* apresentarem diminuição nos níveis dos transcritos de *defensina*. Além disso, se *defensina* é realmente controlada pelas duas vias, as abelhas com silenciamento de *dorsal* e maior período de infecção (48 horas) puderam ativar a *defensina* pela via Imd, em quantidade suficiente, fazendo com que não pudéssemos observar redução nos níveis de transcritos deste gene.

Em *Bombyx mori* transgênico, cujo gene de Rel (homólogo de Dorsal) foi silenciado, houve inibição na ativação de vários genes de peptídeos antimicrobianos após infecção com *Micrococcus luteus* (Tanaka *et al.*, 2005). No entanto, em *A. mellifera*, apesar de analisarmos somente dois genes codificadores de peptídeos antimicrobianos, não observamos com tanta clareza a importância de Dorsal para a transcrição destes genes, uma vez que Dorsal não parece ser crucial para a transcrição de *defensina*. Recentemente, muitos trabalhos têm mostrado a interação das duas vias de sinalização, Toll e Imd, na regulação dos genes de peptídeos antimicrobianos, havendo, portanto, redundância nesta regulação em *Drosophila* (De Gregorio *et al.*, 2002; Tanji *et al.*, 2007; Pal *et al.*, 2007). Este modelo é contra a visão, que ainda prevalece, de que a resposta imune em *Drosophila* seria específica e não teria redundância (Lemaitre, 2004). Acredita-se que a cooperação das proteínas Rel/NF- κ B seja particularmente necessária quando as duas vias são estimuladas por um nível baixo de infecção e/ou por muitos tipos de microorganismos, que é provavelmente o cenário mais comum que ocorre na natureza (Tanji *et al.*, 2007). A ativação do sistema imune em insetos é bastante complexo, envolvendo também a possibilidade da formação de heterodímeros e homodímeros das três proteínas Rel/NF- κ B para criar fatores de transcrição com diferentes especificidades (Han & Ip, 1999) e a presença de vários grupos de sítios κ B na região promotora dos

genes de peptídeos antimicrobianos (Senger *et al.*, 2004), pode determinar os níveis de expressão e a capacidade de resposta das vias Toll e Imd (Tanji *et al.*, 2007). Esta complexidade também deve existir em *A. mellifera*. Nossos resultados sugerem que existe uma cooperação entre as vias Toll e Imd na transcrição de *defensina*, apesar de existir evidências de que o gene *defensina* seja regulado preferencialmente por um fator de transcrição Rel/NF- κ B do tipo Dorsal.

Proteínas de estocagem em abelhas infectadas por bactérias

As proteínas de estocagem estudadas neste trabalho foram Vitelogenina, Hexamerina 70a, Lipoforina I e Lipoforina III. As abelhas infectadas com a bactéria *M. luteus* apresentaram redução significativa na quantidade de transcritos de *vitelogenina* e da proteína, em qualquer tipo de injeção (água, *M. luteus* ou *S. marcescens*). A Vitelogenina parece estar relacionada à resposta imune por ser uma glicoproteína ligadora a zinco, um íon necessário para funcionamento normal de hemócitos. Neste caso, a diminuição da quantidade de hemócitos seria causada pela queda dos títulos de zinco na hemolinfa, como consequência da falta de síntese da Vitelogenina (Amdam *et al.*, 2004). Além disso, esta proteína pode ser fonte de aminoácidos na produção de alimento para a cria, a geléia real, produzida pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas nutridoras (Amdam *et al.*, 2003). Em *Anopheles gambiae*, a infecção pelo agente causador da malária pode causar a redução, no corpo gorduroso, da quantidade dos transcritos de *vitelogenina* (Ahmed *et al.*, 1999). A redução de transcritos para esta proteína também foi observada em abelhas infectadas (este trabalho), sugerindo que a Vitelogenina deve participar do sistema imune de uma outra maneira que não afetando os hemócitos. Estas células fazem parte da reação celular e sua redução causada pela queda de Vitelogenina não seria vantajosa durante um período crítico da resposta imune. A redução da quantidade de transcritos assim como da proteína em abelhas, pode ainda sugerir que a Vitelogenina é utilizada como fonte de aminoácidos para a produção de outras proteínas

diretamente relacionadas com a destruição dos microorganismos invasores, como por exemplo, na síntese dos peptídeos antimicrobianos.

As Hexamerinas de insetos participam do estoque de aminoácidos para a metamorfose (Telfer & Kunkel, 1991) e providenciam energia para este processo (Levenbook, 1985; Levenbook & Bauer, 1984; Pan & Telfer, 1999; Telfer & Kunkel, 1991). Como funções secundárias, as Hexamerinas podem fornecer energia para a manutenção do metabolismo, carregar substâncias hidrofóbicas tais como lipídeos e ecdisteróides (Kanost *et al.*, 1990), modular a quantidade de hormônio juvenil circulante (Zhou *et al.*, 2007), participar na regulação de casta em cupins (Zhou *et al.*, 2006) e participar do componente estrutural da cutícula (Marinotti *et al.*, 1988; Peter & Scheller, 1991). Algumas Hexamerinas de insetos têm sido apresentadas como envolvidas na resposta imune. O conteúdo alto de aminoácidos aromáticos nas Arilforinas (um tipo de Hexamerina) pode aumentar a capacidade de ligação destas proteínas com substratos, fazendo, assim, que sejam ideais para isolamento de parasitas (Burmester, 1999). Devido às diferentes funções das Hexamerinas, a regulação de sua expressão é complexa. Em abelhas, existem quatro Hexamerinas, HEX 110, HEX 70a, HEX 70b e HEX 70c (Danty *et al.*, 1998; Cunha *et al.*, 2005; Bitondi *et al.*, 2006). Somente Hex 70a é encontrada em quantidades significativas em adultos e ela é composta de um grande número de aminoácidos aromáticos, caracterizando, assim, uma Arilforina (Danty *et al.*, 1998; Martins, J.R., comunicação pessoal). Por estas razões, esta proteína foi usada neste trabalho para analisar sua possível participação na imunidade em abelhas adultas infectadas por bactérias. No entanto, nenhuma diferença significativa pôde ser observada na quantidade de transcritos ou proteína da Hex 70a em abelhas infectadas com relação aos controles. Estes resultados diferem do que já foi encontrado em outros insetos. Em *Locusta migratoria*, a infecção pelo fungo *Metarhizium anisopliae* provoca uma alta expressão de uma Hexamerina (Wang *et al.*, 2007). A quantidade de uma Hexamerina do tipo Arilforina também aumentou na mariposa *Pseudaletia separata* ao ser infectada pela vespa *Cotesia kariyai* (Hayakawa, 1994). Os tipos de infecção nestes organismos foram

bem diferentes dos usados para infecção em abelhas, e talvez, por esta razão, os resultados sejam diferentes. Apesar destes autores observarem aumento da Hexamerina após a infecção, não se sabe ainda o verdadeiro papel destas proteínas na resposta imune.

A Lipoforina de insetos é composta pela apoLp-I e apoLp-II, e funciona como transportadora de lipídeos da dieta, do intestino para o corpo gorduroso, enquanto que também distribui lipídeos estocados ou sintetizados para tecidos periféricos (Ogoyi *et al.*, 1995; Rodenburg & Van der Horst, 2005). O corpo gorduroso está envolvido no metabolismo de lipídeos por ser o local de estoque e mobilização destas moléculas. Estudos de Lipoforina de insetos revelaram que a quantidade desta proteína aumenta após infecção com microorganismos (Cheon *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Em *Aedes aegypti*, genes codificadores da Lipoforina e do receptor de Lipoforina de corpo gorduroso têm sua expressão aumentada após infecção por bactéria Gram-positiva, fungo ou ingestão de parasita, indicando que o metabolismo de lipídeos está envolvido na resposta imune sistêmica gerada pela presença de patógenos e parasitas (Cheon *et al.*, 2006). Curiosamente, a infecção com bactérias Gram-negativas, nestes insetos, não gerou aumento na quantidade de transcritos de *lipoforina* (Cheon *et al.*, 2006). No entanto, a infecção com o fungo *M. anisopliae* provocou um aumento nos transcritos de *lipoforina* em *L. migratoria* (Wang *et al.*, 2007). Esta proteína também é encontrada nos coágulos juntamente com outras proteínas, e está intimamente relacionada com a ativação da cascata da Profenoloxidase, o que indica que a Lipoforina participa da coagulação, um processo extremamente importante para o fechamento de feridas e defesa imune contra organismos invasores (Li *et al.*, 2002; Mullen & Goldsworthy, 2003; Rahman *et al.*, 2006). No entanto, em abelhas *A. mellifera* infectadas, não observamos qualquer alteração significativa na quantidade de transcritos de *lipoforina*.

A Lipoforina III também é uma glicoproteína transportadora de lipídio como a Lipoforina I/II. Além desta função, a Lipoforina III pode ser classificada como proteína de reconhecimento (PRR), ligando-se a moléculas comuns aos grupos de microorganismo,

ou seja, aos componentes de parede celular (Hoffmann *et al.*, 1999). A redução de Lipoforina III, bastante expressiva em abelhas infectadas com bactérias, merece maior atenção e estudos futuros poderão elucidar a participação desta glicoproteína na imunidade não só de abelhas como de insetos em geral.

A redução expressiva de várias proteínas de estocagem sugere duas possibilidades: estas proteínas serviriam como fonte de aminoácidos para produção de outras proteínas diretamente envolvidas no combate aos microorganismos, ou, ainda, que devido ao custo gerado pela resposta imune, estas proteínas não seriam mais produzidas neste momento e a maquinaria do corpo gorduroso seria utilizada para a produção de moléculas efetoras sintetizadas durante a resposta imune.

Imunidade em abelhas alimentadas com diferentes dietas

A quantidade de transcritos das proteínas de estocagem estudadas neste trabalho (Vitelogenina, Hexamerina 70a, Lipoforina I e Lipoforina III) foi analisada em abelhas que receberam diferentes tipos de alimentação: xarope, *beebread* e geléia real, e infectadas com *S. marcescens*. Os genes codificadores do peptídeo antimicrobiano Defensina e da enzima Profenoloxidase foram analisados quanto a sua transcrição após infecção. Apesar de não ter havido nenhuma alteração na quantidade de transcritos de *defensina*, os níveis de transcritos de *profenoloxidase* diminuíram em abelhas alimentadas com *beebread* e infectadas. A diminuição dos níveis de transcritos de *profenoloxidase* em abelhas infectadas já foi observada anteriormente neste trabalho, como característica de abelhas com ativação do sistema imune. A não alteração dos níveis de transcritos de *defensina* em abelhas infectadas talvez se deva pelas diferenças nas estratégias de infecção, que, neste caso, foi via oral, somados aos tipos de alimentação. Todavia, os resultados de redução na quantidade de transcritos e/ou proteínas das proteínas de estocagem em abelhas infectadas, confirmando resultados anteriores, mais a diminuição na quantidade de transcritos de *profenoloxidase*, indicam certamente um panorama de resposta imune à infecção. Estes resultados mostram, ainda, que a infecção por ingestão

de *S. marcescens* também é efetiva na ativação do sistema imune como a injeção desta bactéria na hemocele de abelhas.

Em abelhas não infectadas, somente alimentação com *beebread* proporcionou um aumento significativo de todas as proteínas de estocagem aqui estudadas, apesar da geléia real também ser uma fonte protéica. Sendo assim, a melhor fonte protéica para as abelhas é o *beebread*. O tipo de dieta consumida pelas abelhas influenciando na quantidade de proteínas de estocagem já foi demonstrado (Bitondi & Simões, 1996; Cremonez *et al.*, 1998; Cunha *et al.*, 2005; Bitondi *et al.*, 2006). A concentração de Vitelogenina na hemolinfa de abelhas adultas foi consideravelmente maior em indivíduos que receberam pelo menos 50% de pólen na dieta (Bitondi & Simões, 1996) ou *beebread* (Cremonez *et al.*, 1998). A quantidade das Hexamerinas 70b e 110 foi também significativamente maior na hemolinfa de abelhas alimentadas com *beebread* quando comparadas àquelas alimentadas somente com açúcar (Cunha *et al.*, 2005; Bitondi *et al.*, 2006).

A infecção com *S. marcescens* provocou alteração significativa nos níveis de transcritos dos genes *profenoxidase*, *vitelogenina*, *hexameria 70a* e *lipoforina III* somente em abelhas que tinham altos níveis de RNAm destes genes, ou seja, naquelas que foram alimentadas com *beebread*. Estes resultados mostram que a alimentação com xarope ou geléia real pode ser restritiva à ativação da resposta imune. Poucos estudos têm revelado a relação entre a dieta dos insetos e a sua imunidade. Por exemplo, a larva do barbeiro *Rhodnius prolixus* alimentada somente de plasma, ao invés de sangue, tem menor produção de peptídeos antimicrobianos (do tipo Cecropina), além de redução da atividade da Lisozima e formação de nódulos, menor número de hemócitos e são menos resistentes quando infectados experimentalmente com bactérias (Feder *et al.*, 1997). A privação de alimento também leva à redução das funções imunes no besouro *Tenebrio molitor* (Siva-Jothy & Thompson, 2002) e a uma maior susceptibilidade da mosca tsé-tsé à infecção por tripanossomo (Welburn *et al.*, 1989; Kubi *et al.*, 2006). Sabe-se ainda que

sob condições controladas de alimentação, a produção de peptídeos antimicrobianos depende das reservas do corpo gorduroso (Hetru *et al.*, 1998).

As proteínas de estocagem Hexamerinas e Lipoforinas, além da essencial Vitelogenina para o crescimento dos ovos, estão intimamente relacionadas com a reprodução em insetos. A Hexamerina foi descrita como suporte na produção de ovos de vários insetos (Pan & Telfer, 1996, 1999, 2001; Seo *et al.*, 1998; Wheeler *et al.*, 2000; Capurro *et al.*, 2000; Hahn & Wheeler, 2003), assim como de *A. mellifera* (Bitondi *et al.*, 2006); e a Lipoforina foi encontrada em ovos de muitos insetos (Kawooya *et al.*, 1988; Liu & Ryan, 1991; Telfer *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 1994; Engelmann & Mala, 2005) e também de abelhas *A. melliferas* (Guidugli-Lazzarini, 2006). Em abelhas, a importância da Hexamerina e da Lipoforina na reprodução também já foi realçada (Bitondi *et al.*, 2006; Guidugli-Lazzarini, 2006). Deste modo, a alimentação rica em proteína, como foi o caso do *beebread*, proporciona maior acúmulo destas proteínas de estocagem e, por consequência, recursos para uma abelha operária, na ausência da rainha, ativar o ovário e produzir ovos. A presença de ovários ativos foi confirmada em operárias alimentadas com *beebread*, mas o mesmo não ocorreu em operárias alimentadas com xarope ou geléia real (Guidugli-Lazzarini, comunicação pessoal). Podemos, assim, observar a importância da alimentação com pólen para a síntese destas proteínas e, conseqüentemente, o *status* reprodutivo de uma abelha operária. A restrição de dieta também reduz a fecundidade em *Drosophila*, uma vez que este inseto produz menor quantidade de ovos (Burger *et al.*, 2007).

O custo de um processo, como a resposta de defesa imune, é uma das limitações centrais consideradas em estudos de ecologia evolutiva. Custos relevantes são estimados não somente pelo custo absoluto da defesa imune, isto é, da demanda energética ou da quantidade de nutrientes necessários, mas também pela perda do *fitness* se nenhum outro caminho é encontrado (Schmid-Hempel, 2005). O custo da ativação da resposta imune por algum outro processo é fácil de se interpretar e medir, como a redução da fecundidade. Em *Drosophila*, por exemplo, o parasitismo por um

himenóptero, causou redução no tamanho e número de ovos, mostrando assim, redução de *fitness* do adulto parasitado (Fellowes *et al.*, 1999). Uma compensação fisiológica entre imunidade e reprodução também foi vista em *T. molitor* (Rolf & Siva-Jothy, 2002). O fato das abelhas alimentadas com *beebread* e infectadas com bactéria apresentarem quantidades muito pequenas de proteínas de estocagem, muito provavelmente indica que estas abelhas não teriam o recurso essencial para a ativação dos ovários, sugerindo assim, que existe esta troca de investimentos de recursos entre a ativação da resposta imune e a fecundidade nas abelhas.

Imuno-senescência

Imuno-senescência é a redução da eficiência da imunidade à medida que o organismo envelhece. As operárias adultas possuem polietismo etário, que é estabelecido pela divisão de trabalho baseada em comportamento de abelhas que executam diversas tarefas ao longo de sua vida adulta. Em uma colônia típica, as abelhas executam diferentes tarefas dentro da colônia durante as duas e três primeiras semanas de vida adulta, incluindo o cuidado com a cria, ou seja, de nutridora, e, então, tornam-se forrageadoras de néctar e pólen nas últimas semanas de vida (Winston, 1987). As abelhas forrageiras estão, assim, mais suscetíveis aos micróbios presentes no meio ambiente, principalmente em plantas. O sistema imune durante esse período deveria, então, permitir uma maior defesa à abelha. No entanto, acredita-se que abelhas mais velhas apresentem declínio na resposta imune devido à diminuição da quantidade de hemócitos por apoptose, processo que está relacionado com altos níveis de hormônio juvenil, que é uma característica de forrageiras (Amdam *et al.*, 2004; 2005).

Para verificarmos a senescência da resposta imune utilizamos abelhas de idades diferentes, com funções distintas em uma colônia típica: recém-emergidas, nutridoras e forrageiras. Além disso, para excluirmos o fator da idade, utilizamos abelhas com funções diferentes, mas com mesma idade a partir de uma colônia *single-cohort*. Neste caso,

foram utilizadas abelhas nutridoras e forrageiras novas, de 6-8 dias, e nutridoras e forrageiras velhas, de 21-23 dias.

A infecção com bactéria *S. marcescens* provocou, em cinco horas de infecção por injeção, a resposta imune em todos os grupos estudados independentemente do comportamento ou da idade, ou seja, nas abelhas de uma colônia típica, ou nas abelhas das colônias *single-cohort*. Assim, a capacidade de ativação do sistema imune observada pelo aumento da transcrição de *defensina* foi evidente, mesmo nas abelhas mais velhas. Contudo, sob a estratégia de infecção por alimentação, as abelhas forrageiras, de qualquer idade, isto é, novas ou velhas, sempre foram mais susceptíveis à infecção por *S. marcescens* e/ou confinamento em caixinhas, que é uma condição de estresse, quando comparadas às abelhas recém-emergidas e nutridoras.

Em mamíferos, a imunidade compreende um sistema de dois componentes, a imunidade adaptativa e a inata, que funcionam conjuntamente de maneira complexa. A imunidade adaptativa combina o reconhecimento altamente específico do antígeno e na memória imunológica através da modificação genética de linfócitos e expansão clonal. O declínio funcional da imunidade com o envelhecimento em mamíferos é acompanhado de mudanças sistêmicas, como do remodelamento do sistema adaptativo e da ativação do sistema imune inato, que resulta no desenvolvimento de inflamação crônica (DeVeale *et al.*, 2004). Em *Drosophila*, o envelhecimento também está relacionado com o aumento na transcrição de genes relacionados com imunidade (Pletcher *et al.*, 2002), que, como todo inseto, possui somente sistema imune inato. Enquanto que a imunidade adaptativa é encontrada somente em vertebrados, a imunidade inata foi conservada em todos os animais (Janeway & Medzhitov, 2002). Assim, a ativação do sistema imune inato com o envelhecimento parece ser um padrão nos animais. Em *A. mellifera*, a possibilidade de manipulação do comportamento, permite que abelhas com comportamento e fisiologia de abelhas mais velhas, ou seja, forrageiras, possam fazer este comportamento sendo uma abelha ainda jovem, em um processo denominado de plasticidade. Em nossos resultados, observamos que abelhas novas com características de abelhas velhas (forrageiras)

ativaram seu sistema imune, o que parece concordar com os resultados encontrados em animais mais velhos. Contudo, as forrageiras foram mais susceptíveis que abelhas de uma mesma idade, mas com característica de abelha nova. Nossos resultados, então, nos levaram a investigar outros fatores que possivelmente estariam afetando a sobrevivência de abelhas novas com fisiologia e comportamentos de mais velhas. Recentemente, foi demonstrado em colônias *single-cohort* de *A. mellifera* que abelhas mais velhas são mais susceptíveis ao estresse que abelhas mais novas executando o mesmo comportamento, sugerindo que a mortalidade das mais velhas ocorra devido à sua fisiologia e não somente aos riscos encontrados fora da colônia (Remolina *et al.*, 2007).

Estudos recentes com abelhas têm gerado resultados que levam à proposição de modelos da relação entre o hormônio juvenil (HJ), a via de sinalização da insulina e a proteína Vitelogenina (Corona *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2007).

Como já dito anteriormente, as operárias adultas de uma colônia típica executam tarefas de acordo com a sua idade. Todavia, este comportamento é extremamente plástico. Em resposta ao contexto social e necessidades da colônia, os indivíduos podem aumentar ou diminuir sua taxa de desenvolvimento, ou até mesmo, retornar a estágios comportamentais anteriores. Por exemplo, em colônias com baixo número de nutridoras, as abelhas jovens continuam cuidando da cria ao invés de começar a executar tarefas fora da colônia (Robinson *et al.*, 1989). Do mesmo modo, em colônias que não tem abelhas jovens, abelhas mais velhas, que normalmente seriam forrageiras, reverterem seu papel para a função de nutridoras (Robinson *et al.*, 1992; Huang & Robinson, 1996). O início do forrageamento é associado com aumento do HJ (Fluri *et al.*, 1982), o que provoca a inibição da síntese de Vitelogenina (Pinto *et al.*, 2000).

O HJ parece dar a velocidade do desenvolvimento comportamental. Embora tratamento com hormônio juvenil possa acelerar a transição de operárias de dentro da colônia para forrageiras, este efeito requer muitos dias, sugerindo que o HJ não ative este comportamento (Elekonich & Robinson, 2000). Além disso, o HJ não é essencial para o

fORAGEAMENTO, uma vez que operárias sem HJ, pela retirada dos *corpora allata* (a única fonte de HJ) no primeiro dia de vida adulta, ainda se tornam forrageiras, mas com idade mais avançada, este atraso no forrageamento é eliminado com reposição de HJ (Sullivan *et al.*, 2000).

O comportamento de forrageamento ainda envolve a especialização da abelha em coleta de néctar ou pólen. As abelhas de linhagens selecionadas para maior estoque de pólen iniciam o forrageamento mais cedo, além de serem mais propensas a carregar pólen, e em grande quantidade (Page & Fondrk, 1995). Este tipo de abelha possui altos níveis de HJ e Vitelogenina na hemolinfa ao emergirem, além de ovários bastante desenvolvidos (Amdam *et al.*, 2004; 2006). Diante deste cenário, a divisão de trabalho levando ao forrageamento, deve ter evoluído de um ancestral com uma rede reguladora envolvendo a via de sinalização da insulina (Hunt *et al.*, 2007), uma vez que o número de ovariolos em abelhas é determinado durante o terceiro ínstar larval através de uma cascata endócrina de sinalização dependente da nutrição (Wheeler *et al.*, 2006).

A via de sinalização da insulina é a principal via da interpretação da informação nutricional em vários organismos (Ikeya *et al.*, 2002; Nijhout *et al.*, 2003). Esta via é um módulo conservado evolutivamente que age como mensageira na regulação de crescimento e tamanho (Oldham *et al.*, 2002). Além disso, ela está associada com envelhecimento e encurtamento da vida em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (Finch & Ruvkun, 2001). Estudos em *Drosophila* indicam a conexão entre a via de sinalização da insulina e o HJ (Tatar *et al.*, 2001; Tu *et al.*, 2005). Em abelhas, como discutido anteriormente, os títulos de HJ e Vitelogenina apresentam, em geral, um padrão inverso. A Vitelogenina tem, nestes insetos, um papel importante como antioxidante, pela sua capacidade em se ligar ao zinco, levando assim ao aumento da longevidade em abelhas (Amdam *et al.*, 2004; Seehuus *et al.*, 2006). Esta proteína, além de ser considerada como protetora pela sua capacidade antioxidante, parece coordenar vários processos como trabalhar juntamente com o HJ em uma rede duplo-repressora para coordenação do comportamento (Amdam & Omholt, 2003). Nesta rede, a Vitelogenina

seria responsável pela supressão do HJ e pela inibição da mudança do comportamento de atividades dentro da colônia para de forrageadora. Utilizando-se da técnica de RNA de interferência, estas hipóteses foram confirmadas, uma vez que a diminuição de Vitelogenina provocou aumento nos níveis de HJ (Guidugli *et al.*, 2005) e o início mais cedo do comportamento de forrageamento (Nelson *et al.*, 2007).

Os modelos de interação entre hormônio juvenil (HJ), a via de sinalização da insulina e a proteína Vitelogenina, propostos por Hunt *et al.* (2007) e Corona *et al.* (2007) consideram de maneira geral que a via da insulina está acima da regulação de HJ e da Vitelogenina, e é mediadora do comportamento de forrageamento (Hunt *et al.*, 2007) e do envelhecimento (Corona *et al.*, 2007).

Considerando a estreita relação entre o HJ, a via de sinalização da insulina e da Vitelogenina, resolvemos estudar estas características nas abelhas para tentar estabelecer o processo de envelhecimento relacionado com a imunidade.

Em abelhas de uma colônia típica, a infecção provocou a diminuição nos níveis dos transcritos de *vitelogenina* em abelhas recém-emergidas e forrageiras. Estas abelhas são consideradas mais frágeis que as nutridoras (Seehuus *et al.*, 2006). A diminuição na quantidade de transcritos de *vitelogenina*, em abelhas infectadas, foi observada e discutida anteriormente. Como esperado, a quantidade da proteína Vitelogenina no abdômen das nutridoras foi maior que em recém-emergidas e forrageiras. Além disso, o aumento significativo da quantidade de transcritos do *peptídeo do tipo insulina* em forrageiras com relação às nutridoras também confirma resultados encontrados por Corona *et al.* (2007), onde os autores verificaram aumento de transcrição deste peptídeo em abelhas mais velhas. Em abelhas forrageiras o consumo de açúcares é maior para fornecimento de energia para o vôo. Já as abelhas nutridoras consomem maior quantidade de proteínas como recurso para a produção de alimento para as crias. Esta diferença faz com que os genes da via de insulina apresentem maior transcrição em forrageiras. Nenhuma alteração foi observada com relação aos níveis de transcritos da *bombyxina*, gene codificador de um peptídeo com estrutura do tipo insulina. Mas, como

ainda não se conhece o verdadeiro papel da Bombyxina em *A. mellifera*, pode ser que este peptídeo não participe da via de insulina nestes insetos.

Curiosamente, a infecção provocou aumento na transcrição do gene do peptídeo do tipo insulina em recém-emergida e diminuição em forrageira. As abelhas recém-emergidas, neste experimento, foram alimentadas com uma mistura contendo pólen e açúcar. Sabe-se que abelhas de até três a cinco dias de idade começam a preparar o intestino para a produção de endopeptidases digestivas para que o pólen seja digerido (Crailsheim, 1988), assim, as abelhas recém-emergidas ainda não possuem a capacidade de digestão do pólen. O aumento do consumo de alimento durante a estimulação do sistema imune pela injeção de LPS (lipopolissacarídeo, componente da parede de bactérias) já foi observado na abelha *Bombus terrestris* (Tyler *et al.*, 2006). Assim, as abelhas *A. mellifera* tanto recém-emergidas quanto forrageiras devem ter ingerido uma quantidade maior de alimento, mas somente as forrageiras conseguiram digerir o pólen, e com um *status* nutricional alto, diminuiu a transcrição do *peptídeo do tipo insulina*.

As colônias *single-cohort* são uma manipulação feita para discriminar idade e comportamento durante o desenvolvimento do comportamento de abelhas e induz o forrageamento precoce (Giray & Robinson, 1994; Huang & Robinson, 1992; Robinson *et al.*, 1989). Neste trabalho, foram coletadas abelhas com 6-8 dias de idade sendo nutridoras, ou seja, com idade normal a este comportamento, e abelhas forrageiras coletoras de pólen precoces. Ou então, abelhas com 21-23 dias de idade sendo nutridoras velhas e forrageiras com idade normal a este comportamento.

Surpreendentemente, ao se analisar as abelhas com 6-8 dias de idade, o comportamento de forrageamento foi caracterizado por altos níveis de HJ na hemolinfa, como esperado, mas nenhuma diferença com relação à quantidade de Vitelogenina no abdômen foi encontrada ao se comparar abelhas nutridoras e forrageiras. Este resultado claramente indica que o processo de forrageamento está implicado com aumento dos níveis de HJ e não com a diminuição da quantidade de Vitelogenina como já foi proposto

(Amdam & Omholt, 2003; Guidugli *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2007). As abelhas velhas, por sua vez, apresentaram uma diferença expressiva na quantidade de Vitelogenina entre as nutridoras e forrageiras, acompanhada pela diferença inversa nos níveis de HJ. Talvez, o tempo maior executado por diferentes comportamentos tenha influenciado nas diferenças na quantidade de Vitelogenina observadas neste grupo de abelhas.

As abelhas nutridoras de 6-8 dias infectadas apresentaram diminuição significativa nos níveis de transcritos de *vitelogenina* e do *peptídeo tipo insulina*, que foram características encontradas também na colônia típica. No entanto, nenhuma diferença foi observada com relação aos títulos de HJ após infecção das abelhas, muito provavelmente pelo curto tempo em que as abelhas foram infectadas (5 horas), período em que metade das forrageiras infectadas já tinha morrido.

A fisiologia de uma abelha velha, mostrada pela forrageira, não só em uma colônia típica como uma *single-cohort*, mostra que apesar desta abelha ter a competência em ativar o sistema imune, ela possui características limitantes para a sobrevivência. Estas características são essencialmente dependentes da alimentação e das reservas protéicas das abelhas. A característica mais marcante nos nossos experimentos foi o nível elevado de HJ nas abelhas forrageiras, independentemente da idade das operárias ou da quantidade de Vitelogenina. A aplicação tópica de HJ induz a formação de núcleo picnótico, ou seja, de degeneração, de hemócitos em abelhas (Rutz *et al.*, 1974; Wille & Rutz, 1975), além de ter uma associação negativa com a imunidade em insetos (Rolff & Siva-Jothy, 2002). Amdam *et al.* (2005) também consideram que HJ ou outros fatores podem afetar na proliferação ou morte dos hemócitos independentemente da concentração de zinco, e por conseqüência de Vitelogenina (Amdam *et al.*, 2004). Assim, os níveis de HJ parecem ser cruciais para a integridade ou envelhecimento do sistema imune. Não se pode, no entanto, excluir a participação da Vitelogenina e dos genes da via da insulina, como conseqüência da alimentação, na eficiência do sistema imune.

Como a imunidade em insetos tem um custo muito alto (Schmid-Hempel, 2005), a seleção muito provavelmente não favoreceu investimentos na eficiência do sistema

imune em forrageiras (Amdam *et al.*, 2005), que por executarem tarefas fora da colônia, estão mais susceptíveis a ataques.

Os dados gerados no presente trabalho revelaram vários aspectos da resposta imune humoral em *A. mellifera*, que ampliam o conhecimento sobre os mecanismos do sistema imune destes insetos. De maneira geral, a ativação da resposta imune, dada pela síntese de peptídeos antimicrobianos, foi clara em abelhas infectadas com bactérias. Existem ainda genes diretamente relacionados com a resposta imune, que mesmo em pequeno número quando comparados aos de outros insetos, são regulados em abelhas após infecção por bactérias. No entanto, a sobrevivência destes insetos a ataques de microorganismos depende não somente da ativação da resposta imune, mas também de fatores intrínsecos a sua fisiologia. O *status* nutricional é um fator importante, uma vez que abelhas alimentadas com grandes quantidades de proteínas são capazes de acumular alta quantidade de proteínas de estocagem. A alimentação diferencial dependente do comportamento das abelhas também ocasiona mudanças nos níveis de hormônio juvenil e na síntese de peptídeos da via de insulina, que são características relacionadas ao envelhecimento. As abelhas supridas de grandes quantidades de proteínas de estocagem e com níveis baixos de hormônio juvenil, como é o caso das nutridoras (normalmente abelhas jovens), possuem uma maior competência à sobrevivência a diversos estresses, como o de infecção por bactérias.

O estudo da imunidade em *A. mellifera*, desenvolvido no presente trabalho, permitiu as seguintes conclusões:

- 1- Abelhas adultas infectadas por bactérias são capazes de gerar uma resposta imune contra estes microorganismos através do aumento na transcrição dos genes codificadores de peptídeos antimicrobianos e da Transferrina.
- 2- A especificidade de ativação de uma determinada via intracelular não está clara em *A. mellifera*, sugerindo que exista interação entre as vias Toll e Imd na ativação dos genes de peptídeos antimicrobianos. Existe, no entanto, evidência de preferência de ativação da via de sinalização de Toll a partir do reconhecimento de uma bactéria Gram-positiva que gera a ativação da transcrição do gene de reconhecimento *GNBP*.
- 3- O silenciamento de *proPO* é efetivo tanto em adultos quanto em pupas de *A. mellifera* e dependente da dose de dsRNA injetado, mas a estratégia de uso de dsRNAs longos não permite a verificação do verdadeiro papel deste gene na imunidade, uma vez que efeitos não desejáveis são gerados.
- 4- Dorsal 1-A e/ou Dorsal 2 participam da via de sinalização intracelular para a ativação do gene da *defensina* em *A. mellifera* infectada por bactéria Gram-positiva, muito provavelmente pela via Toll. Enquanto que *Abaecina* deva ser preferencialmente ativada por uma outra via de sinalização intracelular.
- 5- As abelhas infectadas por bactérias apresentam diminuição de transcrição e, em alguns casos também dos títulos de proteínas, das proteínas de estocagem estudadas neste trabalho: Vitelogenina, Hexamerina 70A e Lipoforina I/II e III.
- 6- A alimentação com *beebread*, rica em proteína, proporcionou grande aumento na quantidade de transcritos de proteínas de estocagem em abelhas adultas, e permitiu que estas abelhas respondessem melhor à infecção.
- 7- As abelhas mais velhas, que realizam comportamento de forrageamento em uma colônia típica, quando infectadas por bactérias são tão capazes de ativar o sistema imune através da transcrição de *defensina* quanto abelhas mais novas, as quais realizam o

papel de nutridora. Contudo, elas são mais suscetíveis à infecção que abelhas nutridoras ou recém-emergidas.

8- As abelhas forrageiras de uma colônia *single-cohort*, independentemente da idade, apesar de ativarem o sistema imune são mais suscetíveis à infecção por bactérias, muito provavelmente por sua fisiologia.

9- A senescência, ou perda da eficiência, do sistema imune está, então, relacionada com a fisiologia da abelha, que envolve dentre outros fatores, títulos de hormônio juvenil na hemolinfa, quantidade de Vitelogenina e alimentação, a qual é interpretada pela via de sinalização da insulina.

10- As abelhas forrageiras, de uma colônia *single-cohort*, apresentam maiores títulos de hormônio juvenil na hemolinfa, e não mostram, necessariamente, diferenças na quantidade de Vitelogenina, sugerindo que este hormônio é característica essencial de uma forrageira, e não níveis de Vitelogenina.

11- Como a característica mais marcante de uma abelha forrageira é dada pela alta quantidade de hormônio juvenil, níveis baixos deste hormônio devem favorecer a integridade do sistema imune. Todavia, as proteínas de estocagem, dentre elas a Vitelogenina, devem também favorecer para o melhor funcionamento do sistema imune em *A. mellifera*.

Referências Bibliográficas

- Agaisse, H. & Perrimon, N. (2004) The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol. Rev.* 198: 72–82.
- Agaisse, H., Petersen, U.M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B. & Perrimon, N. (2003) Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev. Cell.* 5: 441–450.
- Ahmed, A. M., Taylor, P., Maingon, R., & Hurd, H. (1999) The effects of infection with *Plasmodium yoelii nigeriensis* on the reproductive fitness of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Invertbr. Reprod. Dev.* 36: 217–222
- Amdam, G.V. & Omholt, S.W. (2003) The hive bee to forager transition in honeybee colonies: The double repressor hypothesis. *J. Theor. Biol.* 223: 451–464.
- Amdam, G.V., Aase, A.L.T.O., Seehuus, S.–C., Fondrka, M.K., Norberg, K. & Hartfelder, K. (2005) Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp. Gerontol.* 40: 939–947.
- Amdam, G.V., Csondes, A., Fondrk, M.K. & Page, R.E. (2006) Complex social behavior derived from maternal reproductive traits. *Nature* 439: 76–78.
- Amdam, G.V., Norberg, K., Hagen, A. & Omholt, S.W. (2003a) Social exploitation of vitellogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 1799–1802.
- Amdam, G.V., Simões, Z.L., Guidugli, K.R., Norberg, K. & Omholt, S.W. (2003b) Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnol.* 3:1.
- Amdam, G.V., Simões, Z.L.P., Hagen, A., Norberg, K., Schroder, K., Mikkelsen, O., Kirkwood, T.B.L. & Omholt, S.W. (2004) Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp. Gerontol.* 39: 767–773.
- Anderson, K.V. & Nusslein-Volhard, C. (1984) Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 311: 223–227.

- Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Beeman, R.W., Kanost, M.R., Kramer, K.J. (2005) Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11337–11342.
- Aronstein, K. & Saldivar, E. (2005) Characterization of a honey bee Toll related receptor gene *Am18w* and its potential involvement in antimicrobial immune defense. *Apidologie* 36: 3–14.
- Ashida, M. & Brey, P.T. (1998) Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey, P.T. & Hultmark, D. (eds.), *Molecular mechanisms of immune responses in insects*. Chapman and Hall, London, pp.135–172.
- Bangham, J., Jiggins, F. & Lemaitre, B. (2006) Insect immunity: the post-genomic era. *Immunity* 25: 1–5.
- Barchuk, A.R., Bitondi, M.M.G. & Simões, Z.L.P. (2002) Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *J. Insect Sci.* 2.1, 8.
- Barillas–Mury, C., Charlesworth, A., Gross, I., Richman, A., Hoffmann, J.A. & Kafatos, C.F. (1996) Immune factor Gambif1, a new rel family member from the human malaria vector, *Anopheles gambiae*. *EMBO J.* 15: 4691–4701.
- Bartholomay, L.C., Cho, W.L., Rocheleau, T.A., Boyle, J.P., Beck, E.T., Fuchs, J.F., Liss, P., Rusch, M., Butler, K.M., Wu, R.C., Lin, S.P., Kuo, H.Y., Tsao, I.Y., Huang, C.Y., Liu, T.T., Hsiao, K.J., Tsai, S.F., Yang, U.C., Nappi, A.J., Perna, N.T., Chen, C.C. & Christensen, B.M. (2004) Description of the transcriptomes of immune response-activated hemocytes from the mosquito vectors *Aedes aegypti* and *Armigeres subalbatus*. *Infect. Immun.* 72: 4114–4126.
- Beerntsen, B.T., James, A.A. & Christensen, B.M. (2000) Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 115–137.
- Beresford, P.J., Basinski-Gray, J.M., Chiu, J.K., Chadwick, J.S. & Aston, W.P. (1997) Characterization of hemolytic and cytotoxic Gallysins: a relationship with arylphorins. *Dev. Comp. Immunol.* 21: 253–266.

- Beye, M., Haertel, S., Hagen, A., Hasselmann, M. & Omholt, S.W. (2002) Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Molec. Biol.* 11: 527–532
- Bidla, G., Lindgren, M., Theopolda, U. & Dushay, M.S. (2005) Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 669–679.
- Bitondi, M.M., Nascimento, A.M., Cunha, A.D., Guidugli, K.R., Nunes, F.M. & Simões, Z.L. (2006) Characterization and expression of the Hex 110 gene encoding a glutamine-rich hexamerin in the honey bee, *Apis mellifera*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 63: 57–72.
- Bitondi, M.M.G. & Simões, Z.L.P. (1996) The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers. *J. Apicult. Res.* 35: 27–36.
- Boutros, M., Agaisse, H. & Perrimon, N. (2002) Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 3: 711–722.
- Bridge, A.J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.L. & Iggo, R. (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Genet.* 34: 263–264.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L. & Hoffmann, D. (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 329–344.
- Burger, J.M., Hwangbo, D.S., Corby–Harris, V. & Promislow, D.E. (2007) The functional costs and benefits of dietary restriction in *Drosophila*. *Aging Cell* 6: 63–71.
- Burgett, D.M. (1997) Antibiotic systems in honey, nectar, and pollen. In: Morse, R.A. & Flottum, K. (eds.), *Honey Bee Pest, Predators, and Diseases*. A.I. Root Co., Medina, OH. pp. 455–468.
- Burmester, T. (1999) Evolution and function of the insect hexamerins. *Eur. J. Entomol.* 96: 213–225.

- Caetano-Anollés, G. & Gresshoff, P.M. (1994) Staining nucleic acids with silver: an alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promega Notes* 45: 13–21.
- Capurro, M.L., Moreira-Ferro, C.K., Marinotti, O., James, A.A. & de Bianchi, A.G. (2000) Expression patterns of the larval and adult hexamerin genes of *Musca domestica*. *Insect Mol. Biol.* 9: 169–177.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., & Tempst, P. (1993) Functional and Chemical Characterization of *Hymenoptaecin*, an antibacterial Polypeptide that is infection-inducible in the Honeybee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.* 268: 7044–7054
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. & Tempst, P. (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 8: 2387–2391.
- Casteels, P., Ampe, C., Rivieri, L., Van Damme, J., Elicone, C., Flemming, M., Jacobs, F., & Tempst, P. (1990) Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.* 187: 381–386.
- Casteels, P. & Tempst, P. (1994) Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 339–345.
- Casteels-Josson, K., Capaci, T., Casteels, P. & Tempst, P. (1993) Apidaecin multipptide precursor structure: a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response. *EMBO J.* 12: 1569–1578.
- Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P. & Tempst, P. (1994) Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *J. Biol. Chem.* 269: 28569–28575.
- Cerenius, L. & Söderhäll, K. (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198: 116–126.
- Cheon, H.M., Shin, S.W., Bian, G., Park, J.H. & Raikhel, A.S. (2006) Regulation of lipid metabolism genes, lipid carrier protein lipophorin, and its receptor during immune challenge in the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Biol. Chem.* 281: 8426–8435.

- Christe, P., Oppliger, A., Bancalà, F., Castella, G. & Chapuisat, M. (2003) Evidence for collective medication in ants. *Ecol. Lett.* 6: 19–22.
- Christensen, B.M., Li, J., Chen, C.C. & Nappi, A.J. (2005) Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends Parasitol.* 21: 192–199.
- Christophides, G.K., Vlachou, D. & Kafatos, F.C. (2004) Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol. Rev.* 198: 127–148.
- Coodin, S. & Caveney, S. (1992) Lipophorin inhibits the adhesion of cockroach (*Periplaneta americana*) haemocytes *in vitro*. *J. Insect Physiol.* 38: 853–862.
- Corona, M., Velarde, R.A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K.A. & Robinson, G.E. (2007) Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 7128–7133.
- Crailsheim, K. (1986). Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifica carnica* Pollm). *J. Insect Physiol.* 32: 629–634.
- Crailsheim, K. (1988) Transport of leucine in the alimentary canal of the honeybee (*Apis mellifera* L.) and its dependence on season. *J. Insect Physiol.* 34: 1093–1100.
- Crailsheim, K., Schneider, L. H. W., Hrassnigg, N., Buhlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R. & Schoffmann, B. (1992). Pollen consumption and utilization in worker honey bees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *J. Insect Physiol.* 38: 409–419.
- Cremer, S., Armitage, S.A.O. & Schmid-Hempel, P. (2007) Social Immunity. *Current Biol.* 17: 693–702.
- Cremonese, T.M., De Jong, D. & Bitondi, M.M.G. (1998) Quantification of hemolymph protein as a method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Econ. Entomol.* 91: 1284–1289.

- Cunha, A.D., Nascimento, A.M., Guidugli, K.R., Simões, Z.L. & Bitondi, M.M. (2005) Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 51: 1135–1147.
- Daffre, S., Kysten, P., Samakovlis, C. & Hultmark, D (1994) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Mol. Gen. Genet.* 242: 152–162.
- Danty, E., Arnold, G., Burmester, T., Huet, J. C., Huet, D., Pernollet, J. C. & Masson, C. (1998) Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 387–397.
- De Gregorio, E., Spellman, P.T., Tzou, P., Rubin, G.M. & Lemaitre, B. (2002) The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J.* 21: 2568–2579.
- DeVeale, B., Brummel, T. & Seroude, L. (2004) Immunity and aging: the enemy within? *Aging Cell.* 3: 195–208.
- Dimarcq, J.L., Hoffmann, D., Meister, M., Bulet, P., Lanot, R., Reichhart, J.M. & Hoffmann, J.A. (1994) Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity. *Eur. J. Biochem.* 221: 201–209.
- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J.A. & Imler, J.L. (2005) The Jak–STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nat. Immunol.* 6: 946–953.
- Do Nascimento, A.M., Cuvillier–Hot, V., Barchuk, A.R., Simões, Z.L. & Hartfelder, K. (2004) Honey bee (*Apis mellifera*) transferrin-gene structure and the role of ecdysteroids in the developmental regulation of its expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 415–424.
- Duvic, B. & Brehélin, M. (1998) Two major proteins from locust plasma are involved in coagulation and are specifically precipitated by laminarin, a beta-1,3-glucan. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 959–967.

- Ekengren, S. & Hultmark, D. (2001) A family of Turandot-related genes in the humoral stress response of *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 998–1003.
- Ekengren, S., Tryselius, Y., Dushay, M.S., Liu, G., Steiner, H. & Hultmark, D. (2001) A humoral stress response in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 11: 714–718.
- Elekonich, M.M. & Robinson, G.E. (2000) Organizational and activational effects of hormones on insect behavior. *J. Insect Physiol.* 46: 1509–1515.
- Engelmann, F. & Mala, J. (2005) The cockroach *Leucophaea maderae* needs more than juvenile hormone, vitellogenin and reserves to make a yolky egg. *J. Insect Physiol.* 51: 465–472.
- Evans, J. & Lopez, D. (2004) Bacterial probiotics induce immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 97: 752–756.
- Evans, J. (2004) Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 85: 105–111.
- Evans, J.D., Aronstein., K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.-L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G., Zhou, C. & Hultmark, D. (2006) Immune pathways and defense mechanisms in honey bees, *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* 15: 645–656.
- Fan, Xiang (2001) *Apis dorsal: Gene structure, role in oogenesis and embryonic development, signal in the induction of an innate immune response*. Dissertação (Doutorado), Erberhard-Karls Universität Tübingen, Alemanha. 99pp.
- Farnaud, S. & Evans, R.W. (2003) Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol. Immunol.* 40: 395–405.
- Fearon, D.T. & Locksley, R.M. (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272: 50–53.
- Feder, D., Mello, C.B., Garcia, E.S. & Azambuja, P. (1997) Immune responses in *Rhodnius prolixus*: influence of nutrition and ecdysone. *J. Insect Physiol.* 43: 513–519.

- Fellowes, M.D.E., Kraaijeveld, A.R. & Godfray, H.C.J. (1999) Cross-resistance following selection for increased defense against parasitoids in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 53: 1302–1305.
- Finch, C.E. (1990) *Longevity, Senescence, and the Genome*. Univ. of Chicago Press, Chicago.
- Finch, C.E. & Ruvkun, G. (2001) Genetics of aging. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2: 435–462.
- Fluri, P., Lüscher, M., Wille, H. & Gerig, L. (1982) Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone and vitellogenin in worker honeybees. *J. Insect Physiol.* 28: 61–68.
- Flyg, C., Kenne, K. & Boman, H. G. (1980) Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J. Gen. Microbiol.* 120: 173–181.
- Fontana, R., Mendes, M.A., de Souza, B.M., Konno, K., Cesar, L.M., Malaspina, O. & Palma, M.S. (2004) Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides* 25: 919–928.
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T. & Kobayashi, K. (1990) A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *J. Biol. Chem.* 265: 11333–11337.
- Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J.A. & Imler, J-L. (2006) Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *Drosophila*. *Nat. Immunol.* 7: 590–597.
- Gallucci, S. & Matzinger, P. (2001) Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 114–119.
- Gillespie, J. P., Kanost, M. R. & Trenczek, T. (1997) Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 611–643.

- Giray, T. & Robinson, G.E. (1994). Effects of intracolony variability in behavioral development on plasticity of division of labor in honey bee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 35: 13–20.
- Glinski, Z. & Jarosz, J. (1992) *Varroa jacobsoni* as a carrier of bacterial infections to a recipient bee host. *Apidologie* 23: 25–31.
- Glinski, Z. & Jarosz, J. (1995) Cellular and humoral defences in honey bees. *Bee World* 76: 195–205.
- Goodman, W.G., Coy, D.C., Baker, F.C., Xu, L. & Toong, Y.C. (1990) Development and application of a radioimmunoassay for the juvenile hormones. *Insect Biochem.* 20: 357–364.
- Gregory, P.G., Evans, J.D., Rinderer, T. & de Guzman, L. (2005) Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites. *J. Insect Sci.* 5:7.
- Grimm, D., Streetz, K.L., Jopling, C.L., Storm, T.A., Pandey, K., Davis, C.R., Marion, P., Salazar, F. & Kay, M.A. (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441: 537-541.
- Gross, I., Georgel, P., Oertel-Buchheit, P., Schnarr, M. & Reichhart, J.M. (1999) Dorsal-B, a splice variant of the *Drosophila* factor Dorsal, is a novel Rel/NF-kappaB transcriptional activator. *Gene* 228: 233–242.
- Guidugli, K.R., Nascimento, A.M., Amdam, G.V., Barchuk, A.R., Omholt, S., Simões, Z.L.P. & Hartfelder, K. (2005) Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a social insect. *FEBS Lett* 579: 4961–4965
- Guidugli-Lazzarini (2006) *Expressão gênica das proteínas vitelogenina e lipoforina e seus receptores nas fases vitelogênicas e não vitelogênicas de Apis mellifera*. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 159pp.
- Hahn, D.A. & Wheeler, D.E. (2003) Presence of a single abundant storage hexamerin in both larvae and adults of the grasshopper, *Schistocerca americana*. *J. Insect Physiol.* 49: 1189–1197.

- Han, Z.S., & Ip, Y.T. (1999) Interaction and specificity of Rel-related proteins in regulating *Drosophila* immunity gene expression. *J. Biol. Chem.* 274: 21355–21361.
- Harizanova, N., Georgieva, T., Dunkov, B.C., Yoshiga, T. & Law, J.H. (2005) *Aedes aegypti* transferrin. Gene structure, expression pattern, and regulation. *Insect Mol. Biol.* 14: 79–88.
- Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T. & Weber, K. (2001) Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* 114: 4557–4565.
- Hayakawa Y. (1994) Cellular immunosuppressive protein in the plasma of parasitized insect larvae. *J. Biol. Chem.* 269: 14536–14540.
- Hedengren, M. Asling, B. Dushay, M.S., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M. & Hultmark, D. (1999) *Relish*, a central factor in the control of humoral, but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol. Cell* 4: 827–837.
- Hedengren-Olcott, M., Olcott, M.C., Mooney, D.T., Ekengren, S., Geller, B.L. & Taylor, B.J. (2004) Differential activation of the NF-kappaB-like factors Relish and Dif in *Drosophila melanogaster* by fungi and Gram-positive bacteria. *J Biol Chem.* 279: 21121–21127.
- Hetru, C., Hoffmann, D. & Bulet, P. (1998) Antimicrobial peptides from insects. In Brey, P.T. & Hultmark, D. (eds). *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. London, Chapman & Hall. pp.40–44.
- Hillyer, J.F., Schmidt, S.L. & Christensen, B.M. (2003) Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. *Cell. Tissue Res.* 313: 117–127.
- Hoffmann, J.A., & Reichhart, J.M. (2002) *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.* 3:121–126.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. & Ezekowitz, R.A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284: 1313–1318.

- Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M. & Hetru, C. (1996) Innate immunity in higher insects. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 8–13.
- Honey Bee Genome Sequencing Consortium (2006) The genome of a highly social insect, the honey bee. *Nature* 443: 931–949.
- Huang, Z.Y. & Robinson, G.E. (1992) Honeybee colony integration: Worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 11726–11729.
- Huang, Z.Y. & Robinson, G.E. (1996) Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 39: 147–158.
- Huang, Z.Y., Robinson, G.E. & Borst, D.W. (1994) Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. *J. Comp. Physiol. A* 174: 731–739.
- Hultmark, D. (2003) *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 12–19.
- Hunt, G.J., Amdam, G.V., Schlipalius, D., Emore, C., Sardesai, N., Williams, C.E., Rueppell, O., Guzman-Novoa, E., Arechavaleta-Velasco, M., Chandra, S., Fondrk, M.K., Beye, M. & Page, R.E. Jr. (2007) Behavioral genomics of honeybee foraging and nest defense. *Naturwissenschaften* 94: 247–267.
- Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K. & Hafen, E. (2002) Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Current Biol.* 12: 1293–1300.
- Irving, P., Troxler, L., Heuer, T.S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. & Hetru, C. (2001) A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 15119–15124.
- Janeway, C.A. Jr (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54: 1–13.
- Janeway, C. A. Jr. & Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197–216.

- Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., & Linsley, P.S. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* 21: 635–637.
- Kanost, M.R., Kawooya, J.K., Law, J.H., Ryan, R.O., Van Heusden, M.C. & Ziegler, R. (1990) Insect hemolymph proteins. *Adv. Insect Physiol.* 22: 299–396.
- Kawooya, J.K., Osir, E.O. & Law, J.H. (1988) Uptake of the major hemolymph lipoprotein and its transformation in the insect egg. *J. Biol. Chem.* 263: 8740–8747.
- Keller, L. & Jemielity, S. (2006) Social insects as a model to study the molecular basis of ageing. *Exp. Gerontol.* 41: 553–556.
- Kim, H.J., Je, H.J., Park, S.Y., Lee, I.H., Jin, B.R., Yun, H.K., Yun, C.Y., Han, Y.S., Kang, Y.J. & Seo, S.J. (2004) Immune activation of apolipoprotein III and its distribution in hemocytes from *Hyphantria cunea*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 1011–1023.
- Kim, T. & Kim, Y.J. (2005) Overview of innate immunity in *Drosophila*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38: 121–127.
- Kim, S.R., Yao, R., Han, Q., Christensen, B.M. & Li, J. (2005) Identification and molecular characterization of a prophenoloxidase involved in *Aedes aegypti* chorion melanization. *Insect Mol. Biol.* 14: 185–194.
- Klaudiny, J., Albert, S., Bachanova, K., Kopernicky, J. & Simuth, J. (2005) Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 11–22.
- Kubi, C., van den Abbeele, J.D.E., Deken, R., Marcotty, T., Dorny, P. & van den Bossche, P. (2006) The effect of starvation on the susceptibility of teneral and non-teneral tsetse flies to trypanosome infection. *Med. Vet. Entomol.* 20: 388–392.
- Kucharski, R. & Maleszka, R. (2003) Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferring in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Insect Sci.* 3:27.

- Kulkarni, M.M., Booker, M., Silver, S.J., Friedman, A., Hong, P., Perrimon, N. & Mathey-Prevot, B. (2006) Evidence of off-target effects associated with long dsRNAs in *Drosophila melanogaster* cell-based assays. *Nat. Methods* 3: 833–838.
- Kurz, C.L., Chauvet, S., Andrès, E., Aurouze, M., Vallet, I., Michel, G.P., Uh, M., Celli, J., Filloux, A., De Bentzmann, S., Steinmetz, I., Hoffmann, J.A., Finlay, B.B., Gorvel, J.P., Ferrandon, D. & Ewbank, J.J. (2003) Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by *in vivo* screening. *EMBO J.* 22: 1451–1460.
- Kylsten, P., Kimbrell, D.A., Daffre, S., Samakovlis, C. & Hultmark, D. (1992) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands. *Mol. Gen. Genet.* 232: 335–343.
- Kylsten, P., Samakovlis, C. & Hultmark, D. (1990) The cecropin locus in *Drosophila*; a compact gene cluster involved in the response to infection. *EMBO J.* 9: 217–224.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Leclerc, V., Pelte, N., El Chamy, L., Martinelli, C., Ligoxygakis, P., Hoffmann, J.A. & Reichhart, J.M. (2006) Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *EMBO Rep.* 7: 231–235.
- Lehrer, R.I. & Ganz, T. (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 23–27.
- Lemaitre, B. (2004) The road to Toll. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 521–527.
- Lemaitre, B. & Hoffmann, J. (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 697–743.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J.M. & Hoffmann, J.A. (1995) A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92: 9465–9469.

- Lemaitre, B., Reichhart, J.M. & Hoffmann, J.A. (1997) *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 14614–14619.
- Li, D., Scherfer, C., Korayem, A.M., Zhao, Z., Schmidt, O. & Theopold, U. (2002) Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 919–928.
- Li, J.S., Kim, S.R., Christensen, B.M. & Li, J. (2005) Purification and primary structural characterization of prophenoloxidases from *Aedes aegypti* larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 1269–1283.
- Liu, H. & Ryan, R.O. (1991) Role of lipid transfer particle in transformation of lipophorin in insect oocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1085: 112–118.
- Lourenço, A.P., Zufelato, M.S., Bitondi, M.M.G. & Simões, Z.L.P. (2005) Molecular characterization of a cDNA encoding the prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 541–552.
- Levenbook, L (1985) Insect storage proteins. In: Kerkut, GA & Gilbert, LI (eds). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*; vol. 9. Oxford: Pergamon Press. pp.307–346.
- Levenbook, L. & Bauer, A. (1984) The fate of the larval storage protein calliphorin during adult development of *Calliphora vicina*. *Insect Biochemistry* 15: 77–86.
- Ma, G., Hay, D., Li, D. Asgari, S. & Schmidt, O. (2006) Recognition and inactivation of LPS by lipophorin particles. *Dev. Comp. Immunol.* 30: 619–629.
- Mandato, C.A., DiehlJones, W.L. & Downer, R.G.H. (1996) Insect hemocyte adhesion *in vitro*: Inhibition by apoliphorin I and an artificial substrate. *J. Insect Physiol.* 42: 143–148.
- Marinotti, O., Nunes, L.R. & de Bianchi, A.G. (1988) Heterogeneous glycosylation of *Musca domestica* arylphorin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151: 1004–1010.

- Mason, H.S. (1955) Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzymol.* 16: 105–184.
- Mason, H.S. (1965) Oxidases. *Ann. Rev. Biochem.* 34: 595–634.
- Medzhitov, R., & Janeway, C.A. Jr (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296: 298–300.
- Meister, S., Kanzok, S.M., Zheng, X.L., Luna, C., Li, T.R., Hoa, N.T., Clayton, J.R., White, K.P., Kafatos, F.C., Christophides, G.K. & Zheng, L. (2005) Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 11420–11425.
- Moffat, J., Reiling, J.H. & Sabatini, D.M. (2007) Off-target effects associated with long dsRNAs in *Drosophila* RNAi screens. *Trends Pharmacol Sci.* 28: 149–151.
- Mullen, L. & Goldsworthy, G. (2003) Changes in lipophorins are related to the activation of phenoloxidase in the haemolymph of *Locusta migratoria* in response to injection of immunogens. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 661–670.
- Naug, D. & Camazine, S. (2002) The role of colony organization on pathogen transmission in social insects. *J. Theor. Biol.* 215: 427–439.
- Nelson, C.M., Ihle, K.E., Fondrk, M.K., Page, R.E. & Amdam, G.V. (2007) The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol.* 5: e62.
- Nijhout, H.F. (2003) The control of growth. *Development* 130: 5863–5867.
- Nichol, H., Law, J.H. & Winzerling, J.J. (2002) Iron metabolism in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 535–559.
- Oldham, S., Stocker, H., Laffargue, M., Wittwer, F., Wymann, M. & Hafen, E. (2002) The *Drosophila* insulin/IGF receptor controls growth and size by modulating PrdInsP3 levels. *Development* 129: 4103–4109.
- Omholt, S.W. & Amdam, G.V. (2004) Epigenetic regulation of aging in honeybee workers. *Sci. Aging Knowledge Environ.* 2004: pe28.

- Ogoyi, D.O., Osir, E.O. & Olembo, N.K. (1995) Lipophorin and apolipophorin-III in solitary and gregarious phases of *Schistocerca gregaria*. *Comp. Biochem. Physiol.* 112: 441–449.
- Page, R. E., & Fondrk, M. K. (1995). The effects of colony-level selection on the social organization of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies: Colony-level components of pollen hoarding. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 36: 135–144.
- Pal, S., Wu, J. & Wu, L.P. (2007) Microarray analyses reveal distinct roles for Rel proteins in the *Drosophila* immune response. *Dev. Comp. Immunol.* doi:10.1016/j.dci.2007.04.001.
- Pan, M.L. & Telfer, W.H. (1996) Methionine-rich hexamerin and arylphorin as precursor reservoirs for reproduction and metamorphosis in female luna moths. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 33: 149–162.
- Pan, M.L. & Telfer, W.H. (1999) Equivalence of riboflavin-binding hexamerin and arylphorin as reserves for adult development in two saturniid moths. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42:138–146.
- Pan, M.L. & Telfer, W.H. (2001) Storage hexamer utilization in two lepidopterans: differences correlated with the timing of egg formation. *J. Insect Sci.* 1:2.
- Patel, A., Fondrk, M.K., Kaftanoglu, O., Emore, C., Hunt, G., Frederick, K. & Amdam, G.V. (2007) The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. *PLoS ONE* 2: e509.
- Persengiev, S.P., Zhu, X. & Green, M.R. (2004) Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 10: 12–18
- Peter, M.G. & Scheller, K. (1991) Arylphorins and the integument. In Retnakaran A. & Binnington K. (eds), *The Physiology of Insect Epidermis*. Intaka Press, NC. pp.115–124.

- Pinto, L.Z., Bitondi, M.M.G. & Simões, Z.L.P. (2000) Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *J. Insect Physiol.* 46: 153–160.
- Pletcher, S.D., Macdonald, S.J., Marguerie, R., Certa, U., Stearns, S.C., Goldstein, D.B. & Partridge, L. (2002) Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 12: 712–723.
- Rahman, M.M., Ma, G., Roberts, H.L.S. & Schmidt, O. (2006) Cell-free immune reactions in insects. *J. Insect Physiol.* 52: 754–62.
- Ratledge, C. & Dover, L.G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 881–941.
- Remolina, S.C., Hafez, D.M., Robinson, G.E. & Hughes, K.A. (2007) Senescence in the worker honey bee *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* doi:10.1016/j.jinsphys.2007.05.015.
- Robinson, G.E. (1992) Regulation of division of labor in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 637–665.
- Robinson, G.E., Page, R.E. Jr., Strambi, C. & Strambi, A. (1989) Hormonal and Genetic Control of Behavioral Integration in Honey Bee Colonies. *Science* 246: 109–112.
- Robinson, G.E., Strambi, C., Strambi, A. & Huang, Z.Y. (1992) Reproduction in worker honey bees is associated with low juvenile hormone titers and rates of biosynthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 87: 471–480.
- Rodenburg, K.W. & Van der Horst, D.J. (2005) Lipoprotein-mediated lipid transport in insects: analogy to the mammalian lipid carrier system and novel concepts for the functioning of LDL receptor family members. *Biochim. Biophys. Acta* 1736: 10–29.
- Rolff, J. & Siva-Jothy, M.T. (2002) Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9916–9918.
- Rothenbuhler, W.C. (1964) Resistance to American foulbrood in honey bees: I. Differential survival of larvae of different genetic lines. *Am. Zool.* 4: 111–123.

- Roxström-Lindquist, K. (2002) *Innate Immunity in Insects, Function and Regulation of Hemolin from Hyalophora cecropia*. Dissertação (Doutorado). Department of Genetics. Stockholm University, Suécia. 62pp.
- Rueppell, O., Bachelier, C., Fondrk, M.K. & Page, R.E. Jr. (2007a) Regulation of life history determines lifespan of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Exp. Gerontol.* doi:10.1016/j.exger.2007.06.002.
- Rueppell, O., Christine, S., Mulcrone, C. & Groves, L. (2007b) Aging without functional senescence in honey bee workers. *Curr. Biol.* 17: R274–275.
- Rutz, W., Gerig, L., Wille, H. & Lüscher, M. (1974) A bioassay for juvenile hormone (JH) effects of insect growth regulators (IGR) on adult worker honeybees. *Bull. de la Soc. Entomol. Suisse* 47: 307–313.
- Sadd, B.M., Kleinlogel, Y., Schmid–Hempel, R. & Schmid-Hempel, P. (2005) Trans-generational immune priming in a social insect. *Biol. Lett.* 1: 386–388.
- Sagisaka, A., Tanaka, H., Furukawa, S. & Yamakawa, M. (2004) Characterization of a homologue of the Rel/NF-kappaB transcription factor from a beetle, *Allomyrina dichotoma*. *Biochim. Biophys. Acta* 1678: 85–93.
- Samakovlis, C., Kylsten, P., Kimbrell, D.A., Engstrom, A. & Hultmark, D. (1991) The *Andropin* gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* 10: 163–169.
- Samuel, C.E. (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 778–809.
- Schmid–Hempel, P. (1998) *Parasites in Social Insects*. Princeton NJ, Princeton University Press.
- Schmid–Hempel, P. (2005) Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 529–551.
- Schnitger, A.K., Kafatos, F.C. & Osta, M.A. (2007) The melanization reaction is not required for survival of *Anopheles gambiae* mosquitoes after bacterial infections. *J. Biol. Chem.* 282: 21884–21888.

- Schulz, D.J., Huang, Z.-Y. & Robinson, G.E. (1998) Effects of colony foodshortage on behavioral development in honey bees. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 42: 295–303.
- Seehuus, S.-C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T. & Amdam, G.V. (2006) Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 962–967.
- Senger, K., Armstrong, G.W., Rowell, W.J., Kwan, J.M., Markstein, M., & Levine, M. (2004) Immunity regulatory DNAs share common organizational features in *Drosophila*. *Mol. Cell* 13: 19–32.
- Seo, S.J., Kang, Y.J., Cheon, H.M. & Kim, H.R. (1998) Distribution and accumulation of storage protein-1 in ovary of *Hyphantria cunea* Drury. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 37: 115–128.
- Shiao, S.H., Higgs, S., Adelman, Z., Christensen, B.M., Liu, S.H. & Chen, C.C. (2001) Effect of prophenoloxidase expression knockout on the melanization of microfilariae in the mosquito *Armigeres subalbatus*. *Insect Mol. Biol.* 10: 315–321.
- Shin, S.W., Kokoza, V., Bian, G., Cheon, H.M., Kim, Y.J. & Raikhel, A.S. (2005) REL1, a homologue of *Drosophila* dorsal, regulates toll antifungal immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. *J. Biol. Chem.* 280: 16499–16507.
- Siemering, K.R., Golbik, R., Sever, R. & Haseloff, J., 1996. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* 6: 1653–1663.
- Siva-Jothy, M.T. & Thompson, J.J.W. (2002) Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiol. Entomol.* 27: 206–212.
- Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H. & Williams, B.R. (2003) Activation of the interferon system by shortinterfering RNAs. *Nat. Cell Biol.* 5: 834–839.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76–85.

- Spivak, M. & Reuter, G.S. (2001) *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. *J. Econ. Entomol.* 94: 326–331.
- Starks, P.T., Blackie, C.A., Thomas, D. & Seeley, P.T. (2000) Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften* 87: 229–231.
- Stöven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engstrom, Y., & Hultmark, D. (2000) Activation of the *Drosophila* NFkappaB factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO Report* 1: 347–352.
- Stöven, S., Silverman, N., Junell, A., Hedengren-Olcott, M., Erturk, D., Engstrom, Y., Maniatis, T. & Hultmark, D. (2003) Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 5991–5996.
- Sugumaran, M. (2002) Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.* 15: 2–9.
- Sullivan, J.P., Jassim, O., Fahrbach, S.E. & Robinson, G.E. (2000) Juvenile hormone paces behavioural development in the adult honey bee. *Horm. Behav.* 37: 1–14.
- Sun, J., Hiraoka, T., Dittmer, N.T., Cho, K.H. & Raikhel, A.S. (2000) Lipophorin as a yolk protein precursor in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec.* 30: 1161–1171.
- Taft, A.S., Chen, C.C., Li, J. & Christensen, B.M. (2001) Molecular cloning of two prophenoloxidase genes from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 10: 97–103.
- Tanaka, H., Yamamoto, M., Moriyama, Y., Yamao, M., Furukawa, S., Sagisaka, A., Nakazawa, H., Mori, H. & Yamakawa, M. (2005) A novel Rel protein and shortened isoform that differentially regulate antibacterial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* 1730: 10–21.
- Tanji, T., Hu, X., Weber, A.N. & Ip, Y.T. (2007) Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* 27: 4578–4588.

- Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M. & Garofalo, R.S. (2001) A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* 292: 107–110.
- Telfer, W. H. & Kunkel, J.G. (1991) The function and evolution of insect storage hexamers. *Annu. Rev. Entomol.* 36: 205–228.
- Telfer, W., Pan, M.–L. & Law, J.H. (1991) Lipophorin in developing adults of *Hyalophora cecropia*: support of yolk formation and preparation for flight. *Insect Biochem.* 21: 653–663.
- Theopold, U., Li, D., Fabbri, M., Scherfer, C. & Schmidt, O. (2002) The coagulation of insect hemolymph. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 363–372.
- Theopold, U., Schmidt, O., Söderhäll, K. & Dushay, M.S. (2004) Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends Immunol.* 25: 289–94.
- Thompson, G.J., Crozier, Y.C. & Crozier, R.Y. (2003) Isolation and characterization of a termite transferrin gene up-regulated on infection. *Insect Mol. Biol.* 12: 1–7.
- Toth, A.L. & Robinson, G.E. (2005) Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Anim. Behav.* 69: 427–435.
- Traniello, J.F., Rosengaus, R.B. & Savoie, K. (2002) The development of immunity in a social insect: evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 6838–6842.
- Tu, M-P., Yin, C-M. & Tatar, M. (2005) Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142: 347–356.
- Tyler, E.R., Adams, S. & Mallon, E.B. (2006) An immune response in the bumblebee, *Bombus terrestris* leads to increased food consumption. *BMC Physiol.* 6:6.

- Tzou, P., De Gregorio, E. & Lemaitre, B. (2002) How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 102–110.
- Valles, M.S. & Pereira, R.M. (2005) *Solenopsis invicta* transferrin: cDNA cloning, gene architecture, and up-regulation in response to *Beauveria bassiana* infection. *Gene* 358: 60–66.
- Wang, X.H., Aliyari, R., Li, W.X., Li, H.W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P. & Ding, S.W. (2006) RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* 312: 452–454.
- Wang, C., Cao, Y., Wang, Z., Yin, Y., Peng, G., Li, Z., Zhao, H. & Xia, Y. (2007) Differentially-expressed glycoproteins in *Locusta migratoria* hemolymph infected with *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* doi:10.1016/j.jip.2007.05.012.
- Weers, P.M.M. & Ryan, R.O. (2006) Apolipoprotein III: Role model apolipoprotein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 231–240.
- Welburn, S.C., Maudlin, I., & Ellis, D.S. (1989) Rate of trypanosome killing by lectins in midguts of different species and strains of *Glossina*. *Med. Vet. Entomol.* 3: 77–82.
- Wiesner, A., Losen, S., Kopacek, P., Weise, C. & Gotz, P. (1997) Isolated apolipoprotein III from *Galleria mellonella* stimulates the immune reactions of this insect. *J. Insect Physiol.* 43: 383–391.
- Wheeler, D.E., Buck, N. & Evans, J.D. (2006) Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* 15: 597–602.
- Wheeler, D.E., & Kawooya, J.K. (1990) Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 14: 253–267
- Wheeler, D.E., Tuchinskaya, I., Buck, N.A. & Tabashnik, B.E. (2000) Hexameric storage proteins during metamorphosis and egg production in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera). *J. Insect Physiol.* 46: 951–958.

- Wille, H. & Rutz, W. (1975) Beziehungen zwischen Juvenilhormontiter und Hämocyten erwachsener Sommerbienen (*Apis mellifera* L.). *Schweiz. Landwirtschaft. Forsch.* 14: 339–353.
- Wilson, E.O. (1971) *The Insect Society*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Winston, M.L. (1987) *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge.
- Wojda, I., Kowalski, P. & Jakubowicz, T. (2004) JNK MAP kinase is involved in the humoral immune response of the greater wax moth larvae *Galleria mellonella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 56: 143–154.
- Yang, X. & Cox-Foster, D.L. (2005) Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 7470–7475.
- Yi, R., Doehle, B.P., Qin, Y., Macara, I.G. & Cullen, B.R. (2005) Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA* 11: 220-226.
- Yoshiga, T., Hernandez, V.P., Fallon, A.M. & Law, J.H. (1997) Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12337–12342.
- Yu, J.Y., DeRuiter, S.L. & Turner, D.L. (2002) RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6047–6052.
- Yun, E.Y., Kang, S.W., Hwang, J.S., Goo, T.W., Kim, S.H., Jin, B.R., Kwon, O.-Y. & Kim, K.Y. (1999) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a transferrin homolog from *Bombyx mori*. *Biol. Chem.* 380: 1455–1459.
- Yun, H.K., Ki, W.K. & Kim HR (1994) Analysis of lipophorin in the hemolymph, ovaries, and testes of the fall webworm, *Hyphantria cunea* (Druty). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 27: 153–167.

- Zambon, R.A., Vakharia, V.N. & Wu, L.P. (2006) RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cell Microbiol.* 8: 880–889.
- Zhou, X., Oi, F.M. & Scharf, M.E. (2006) 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. & Scharf, M.E. (2007) Hexamerin-based regulation of juvenile hormone-dependent gene expression underlies phenotypic plasticity in a social insect. *Development* 134: 601–610.
- Zou, Z., Lopez, D.L., Kanost, M.R., Evans, J.D. & Jiang, H. (2006) Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect Mol. Biol.* 15: 603–614.
- Zufelato, M.S., Lourenço, A.P., Simões, Z.L.P., Jorge, J.A. & Bitondi, M.M.G. (2004) Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 1257–1268.

Apêndice

Apêndice 1

Available online at www.sciencedirect.com

Insect Biochemistry and Molecular Biology 35 (2005) 541–552

 Insect
 Biochemistry
 and
 Molecular
 Biology

www.elsevier.com/locate/ibmb

Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*

Anete Pedro Lourenço^{a,*}, Maria Saete Zufelato^b, Márcia Maria Gentile Bitondi^b,
Zilá Luz Paulino Simões^b

^aDepartamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, 14040-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^bDepartamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Received 10 November 2004; received in revised form 25 January 2005; accepted 26 January 2005

Abstract

Phenoloxidase (PO), a melanin-synthesizing enzyme known to play an important role in insect defense, is found as a zymogen (ProPO) in hemolymph and cuticle, where it is activated by proteolysis. We characterized the first *proPO* cDNA in an eusocial insect, the *Apis mellifera* honey bee. The *AmproPO* cDNA contains an ORF of 2079 bp encoding 693 amino acids, and is composed of 9 exons and 8 introns. Southern blot of digested genomic DNA suggested that only one copy of the *proPO* gene is present in *A. mellifera*. The molecular mass of the deduced ProPO and the active enzyme was predicted to be 80.1 and 74.4 kDa, respectively. The calculated *pI* was 6.28. BLASTp search of the deduced amino acid sequence, and neighbor-joining analysis, showed similarity with ProPOs from other insects, ranging from 47% to 63%. Protein signature analyses revealed four conserved regions, including the two copper binding sites characteristic of arthropod ProPOs. RT-PCR and Southern blot showed the highest amount of *AmproPO* transcripts in workers whole body, followed by queens and drones. Expression was also detected in hemocytes and integument. Real time RT-PCR showed higher amounts of *AmproPO* transcripts in adults and older pupae than in younger pupae and larvae, suggesting a function of *AmproPO* in adult exoskeleton melanization and differentiation.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Apis mellifera*; Honey bee; Prophenoloxidase; Melanization; Insect immunity

1. Introduction

Phenoloxidase (PO) is a copper-containing enzyme which catalyses the hydroxylation of monophenol to *o*-diphenol and its oxidation to *o*-quinone, which in a nonenzymatic reaction generates melanin (Mason, 1955, 1965). In insects, PO-mediated melanin synthesis plays a major role in immune defense. Melanin synthesis at the wound site prevents hemolymph loss, besides providing cytotoxic compounds (quinone) to encapsulate and eliminate opportunist-invading microorganisms.

Besides, the function of PO in quinone tanning reactions is essential for cuticle (exoskeleton) sclerotization (Andersen et al., 1996; Sugumaran, 1998). PO was demonstrated to exist in the hemolymph of insects as an inactive prophenoloxidase (ProPO), which can be activated via a serine protease cascade (Lai-Fook, 1966; Ashida, 1971; Ashida and Brey, 1998). More recently, the presence of a ProPO-activating system in the cuticle was also reported (Ashida and Brey, 1995).

The unique roles played by POs in insect biochemistry, physiology, and immunology have raised interest in studies on different species. At present, *proPO* cDNA from a variable number of species representative of Lepidoptera, Diptera and Coleoptera, have been cloned and sequenced (Fujimoto et al., 1995; Hall et al., 1995;

*Corresponding author. Tel.: +1 55 16 602 3153; fax: +1 55 16 633 6482.

E-mail address: anete@rge.fmrp.usp.br (A.P. Lourenço).

Kawabata et al., 1995; Jiang et al., 1997; Park et al., 1997; Cho et al., 1998; Lee et al., 1999; Müller et al., 1999; Chase et al., 2000; Cui et al., 2000; Huang et al., 2001; Taft et al., 2001; Kim et al., 2002; Li et al., 2002). In hymenopterans, only the atypical PO isoforms from the venom gland of *Pimpla hypochondriaca*, a parasitoid wasp (Parkinson et al., 2001), and the PO from the *Apis mellifera* honey bee (Zufelato et al., 2004) have been studied to date.

Recently, we identified and characterized the single PO activity found in honey bee hemolymph (Zufelato et al., 2004). The specific activity, subunit molecular mass, and kinetic parameters were determined. The effect of biochemical and physicochemical agents on the activity of this enzyme was also analyzed. In parallel and to better correlate the PO enzyme activity with the expression of its corresponding gene, the full-length *proPO* cDNA was isolated, cloned, and structurally characterized. In addition, expression studies were carried out in tissues, honey bee castes and sexes, and throughout worker development. These results are presented in the current paper, whose additional aim was to obtain insights for further study of the melanizing response (and other components of the immune response) against parasites and pathogens in *A. mellifera*.

2. Materials and methods

2.1. *Apis mellifera* honey bees

Workers, drones and queens of Africanized *A. mellifera* were collected from hives of the experimental apiary of the University of São Paulo at Ribeirão Preto, Brazil. Larvae and pupae were staged according to criteria established by Rembold et al. (1980), Michelette and Soares (1993), and Tozetto (1997) for queens, workers, and drones, respectively. The earlier pupal phases present unpigmented cuticle and progressive eye colors from white (Pw) to brown (Pb). The older pupae show progressive cuticle pigmentation and were classified as light (Pbl), intermediate (Pbm) and dark (Pbd). Adult workers of defined age were obtained by painting marker newly emerged bees, returning them to experimental hives, and collecting 3, 4, 12, 15 and 20 days later.

2.2. cDNA isolation and sequencing

Hemolymph was collected from dark pigmented pupae (Pbd) ready to emerge as adult workers. Total RNA was isolated from hemocytes using Trizol (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. mRNA from pupal hemocytes was isolated using an mRNA isolation kit (Amersham Biosciences).

Degenerated primers for PCR were designed based on the highly conserved sequences of the two copper binding sites of arthropod ProPO proteins. The forward primer 5'-CAY CAY TKB CAY YTN GT-3' was derived from the amino acid sequence HWHLVY, and the reverse primer 5'-CKR TCR AAN GGR WAN CCC AT-3' was derived from the MGYPFDR sequence. The first strand cDNA was synthesized using the SuperScriptII synthesis system (Life Technologies) in reaction mixtures containing 500 ng of mRNA from pupal hemocytes, dNTP mix, RNase out, and the reverse primer. PCR amplification of the target cDNA was performed in reaction mixtures containing 1 µl of the cDNA obtained from the reverse transcription reaction, Ready-To-Go™ PCR Beads (Amersham Biosciences), 10 pmoles of the forward and reverse primers, and sterile H₂O to a final volume of 25 µl. PCR was performed using 35 cycles as follows: 94 °C, 1 min; 54 °C, 1 min and 72 °C, 1 min. A fragment of 1.3 kb was cloned into the pGEM-T-easy Vector System (Promega) and then sequenced using big dye terminator reaction in an ABI 310 Sequencer (Perkin Elmer).

2.3. 5' and 3'-RACE

Rapid amplification of the 3' end of the full-length *AmproPO* was performed using the Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech). Poly (A)⁺ mRNA was isolated from queens at the middle of the pupal stage (unpigmented Pb pupae), and used to synthesize cDNA. The adaptor-ligated cDNAs were subjected to PCR using Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech) under the following conditions: 35 cycles at 94 °C for 1 min, 56 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min. The forward primer was provided by Clontech and the reverse primer was 5'-CGT CCT GGG AAA TAT CAT GG-3', designed on the basis of the 1.3 kb fragment obtained as described above. The PCR product was then cloned into pCR2.1-TOPO (Life Technologies), and sequenced.

The 5' end was amplified using a cDNA library from *A. mellifera* brain in *λ*ZAP. The specific primer for *AmproPO* was 5'-TTG CGT TGT TGA TTG GTT GT-3' and for the bacteriophage was the M13-forward universal primer. PCR amplification was carried out using the Advantage 2 Polymerase Mix for 40 cycles at 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min. The PCR fragment of ~1.5 kb was cloned into pCR2.1-TOPO and then sequenced.

2.4. Computer analyses of cDNA and genomic structure

The amino acid sequence of ProPO from *A. mellifera* (AmProPO) was deduced and analyzed using a translator program available at www.justbio.com. Sequence identities were verified using the BLASTp program, NCBI database. Conserved domains in AmProPO were

analyzed using CDART (Geer et al., 2002) available at NCBI. CLUSTALW 1.8 (available on GenomeNet CLUSTALW Server (Kyoto Center)—<http://clustalw.genome.ad.jp>) was used to align the AmProPO (GenBank accession no. AAO72539) with known amino acid sequences deposited in GenBank: *Aedes aegypti* (ProPOI: AAG02219; ProPOII: AAG02218), *Anopheles gambiae* (ProPOI: AAC27383; ProPOII: AAB94671; ProPOIII: AAB94672; ProPOIV: CAA09032; ProPOV: CAA09033; ProPOVI: CAA09034; ProPOVII: CAD31059; ProPOVIII: CAD31060; ProPOIX: CAD31061), *Anopheles stephensi* (ProPO: AAC69182), *Armigeres subalbatus* (ProPOI: AAF70320; ProPOII: AAG00991; ProPOIII: AAR88078; ProPOIV: AAR88079), *Bombyx mori* (ProPOI: BAA08368; ProPOII: BAA08369), *Galleria mellonella* (ProPOI: AAK64363; ProPOII: AAQ75026), *Holotrichia diomphalia* (ProPOI: BAC15602; ProPOII: BAC15603), *Hyphantria cunea* (ProPOI: AAC34251; ProPOII: AAC34256), *Manduca sexta* (ProPOI: AAC05796; ProPOII: AAC37243), *Musca domestica* (ProPO: AAR84669), *Pacifastacus leniusculus* (ProPO: CAA58471), *P. hypochondriaca* (POI: CAC04150; POII: CAC04149; POIII: CAC04148), *Sarcophaga bullata* (ProPOI: AAD45526; ProPOII: AAD45527), *Tenebrio molitor* (ProPO: BAA75470). The multiple sequence alignment of the complete sequences was imported to the MEGA program version 2.1 (Kumar et al., 2001) to construct the phylogenetic tree of arthropod ProPOs. Phylogenetic analysis was performed using neighbor-joining. Bootstrap confidence limit probabilities were estimated from 1000 replications. The genomic sequence for *AmproPO* was searched using BLAST in the *A. mellifera* genome at NCBI and the splicing sites were predicted using GENSCAN (Burge and Karlin, 1997; <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>). The local alignment between *AmproPO* and genomic ORFs was performed using a tool in the NCBI (BLAST 2 SEQUENCES).

2.5. Semiquantitative RT-PCR analysis of *AmproPO* expression

AmproPO expression was analyzed by semiquantitative RT-PCR. To compare *AmproPO* expression between castes and sexes, total RNA was isolated from queens, drones, and workers at the end of the pupal stage (Pbd pupae). To examine the tissue-specific expression, total RNA was purified from thoracic integuments (cuticle and subjacent epidermis) and hemocytes from workers at the Pbm pupal stage. Thoracic integuments were thoroughly washed in 0.9% NaCl to eliminate adhered hemocytes and fat body cells.

Total RNA and an oligo (dT)_{12–18} primer (Invitrogen) were used to synthesize the first strand cDNA in reaction mixtures containing SuperScript II, prepared as described above. Specific primers for *AmproPO* were

designed to amplify sequences of 359 bp in the cDNA and 593 bp in the genomic region, serving as control for DNA contamination. The forward primer was 5'-CGT CCT GGG AAA TAT CAT GG-3' and the reverse primer was 5'-GTC CGC GTG ACA AAT CTA CA-3'. PCR was performed using the following conditions: 25 cycles (chosen empirically to avoid saturation), at 94 °C, 1 min; 54 °C, 1 min; 72 °C, 1 min. A 473 bp fragment of *A. mellifera* ribosomal 28S cDNA (GenBank accession no. AJ302936) was used as an internal control for cDNA synthesis and PCR amplification. This fragment was amplified using the forward (5'-TGC TAC TAC CAC CAA GAT CT-3') and reverse (5'-ACG ACC TCA CCT ATT CTC A-3') primers in PCR procedures assayed under the same conditions as defined for *AmproPO* amplification, but using 15 cycles. PCR products were electrophoresed in 1% agarose gel and transferred to nylon membranes. Hybridizations were carried out using *AmproPO* (359 bp) and 28S DNA (473 bp) labeled with fluorescein (Gene Images Random Prime—Amersham Biosciences), and developed with Gene Images CDP-Star (Amersham Biosciences).

2.6. *AmproPO* copy number

To estimate the copy number of the *AmproPO* genes, genomic DNA was isolated from newly ecdysed worker pupae (Pw) using a standard method (Sambrook et al., 1989). Genomic DNA (30 µg) was digested with restriction enzymes *Bcl*I and *Hae*III for 16 h at 50 and 37 °C, respectively. These enzymes were chosen because they did not digest the probe. After digestion, the DNA was electrophoresed on 1% agarose gel and transferred onto a nylon membrane (Biodyne, Pall, 0.45 µm). The probe was a 593 bp fragment amplified in the genomic DNA and labeled with fluorescein. The membrane was developed as described above.

2.7. Relative quantification of *AmproPO* expression by real-time RT-PCR

RNA from whole larvae (2nd–5th larval instar), prepupae, pupae (Pw, Pb, and Pbd pupal phases), and abdomens from adult workers (3–20 days) was isolated using Trizol. All these samples were prepared with at least two individuals. The first strand cDNA was obtained using the SuperScriptII synthesis system. *AmproPO* gene expression during development was quantified by real-time RT-PCR. Primers designed for *AmproPO* (forward 5'-AGA TGG CAT GCA TTT GTT GA-3', and reverse 5'-TTG CGT TGT TGA TTG GTT GT-3') and for the *A. mellifera* actin gene (GenBank accession no. AB023025, forward 5'-TGC CAA CAC TGT CCT TTC TG-3' and reverse 5'-AGA ATT GAC CCA CCA ATC CA-3'), used as internal control, yielded 131 and 156 bp amplicons, respectively.

The *AmproPO* primers were designed to amplify a segment of the gene that contained an intron, thereby serving as control for genomic DNA contamination. The quality of these primers was checked by analysis of melting curves.

PCR amplifications and fluorescence detection were performed using the iCycler iQ™ real-time PCR detection system (Bio-Rad) under the following thermal cycle conditions: 94 °C for 1 min, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s in 40 cycles. The first strand cDNA synthesized as described above served as template in 25 µl PCR assays using iQ™ SYBR® Green I (Bio-Rad). To reach reproducibility, each sample was assayed in triplicate. *AmproPO* transcript abundance was calculated on the basis of the difference in the Ct value (threshold PCR cycle) in relation to actin transcripts, according to the instructions of the User Bulletin #2 from Applied Biosystem (Relative Quantification of Gene Expression; ABI Prism 7700 Sequence Detection System).

3. Results

3.1. Cloning and characterization of *AmproPO*

To obtain the *AmproPO* cDNA, degenerated primers were designed based on the highly conserved amino acid sequences of arthropods ProPO proteins. These primers were used for RT-PCR, in which mRNA from pupal hemocytes was the template. The expected PCR product, a fragment of 1.3 kb, was cloned and sequenced. Specific primers derived from the 1.3 kb fragment were used for RACE in order to obtain the 3' end sequence of the *AmproPO* cDNA. The 5' end was amplified using an *A. mellifera* brain cDNA library. The *AmproPO* full-length cDNA was constructed by assembly of overlapping sequences (Fig. 1). This cDNA contains an open reading frame (ORF) of 2079 bp, starting at nucleotide 209 and ending at nucleotide 2287, encoding 693 amino acid residues. A predicted polyadenylation signal (AATAAA) is located 9 bp upstream from the poly (A)⁺ tail. The molecular mass of the deduced AmProPO protein was predicted to be 80.1 kDa, and the calculated isoelectric point was 6.28.

The predicted proteolytic cleavage site in Fig. 1 is marked with an arrow. Cleavage at this site generates a putative protein (active enzyme) of 74.4 kDa. Two conserved sequences, the putative GCGWPQH thiol ester site (region III) and the region IV at the C-terminal end are also highlighted in Fig. 1.

3.2. Sequence comparisons

The deduced *A. mellifera* ProPO protein revealed high similarity to other arthropod ProPOs. High sequence

identity was found with *M. domestica* (63%), *S. bullata* ProPOI (63%), *A. gambiae* ProPOI (63%), *H. diomphalia* ProPOII (62%), and *T. molitor* (61%). Similarities in conserved protein domains were also observed between AmProPO and hemocyanin, hexamerin, and arylforin, as determined with the CDART program (data not shown).

Similarly to what was observed for all ProPOs characterized to date (including a PO found in the venom gland of the hymenopteran *P. hypochondriaca*), two copper binding sites (CuA and CuB) were also preserved in the deduced amino acid sequence of *A. mellifera* ProPO (Fig. 2). These copper binding regions contain six histidine residues, which are considered to be ligands for the two copper atoms.

Fig. 3 shows the dendrogram constructed by the neighbor-joining method using amino acid sequences of insect ProPOs, and a crustacean ProPO sequence (*Pacisfastacus leniusculus*) as outgroup. The statistical robustness of nodes in the tree was verified by performing a bootstrap analysis of 1000 resampled data sets. The insect ProPOs are grouped into a family, more distantly related to the crayfish ProPO. Six main well-supported groups in the ProPO sequence analysis were identified. Dipteran ProPOs were separated into two distinct groups, one of which containing the majority of the ProPO sequences known to date. The lepidopteran ProPOs were also subdivided into two groups that separate ProPOI from ProPOII. The other two groups included ProPOs from Coleoptera, and POs from the *P. hypochondriaca* hymenopteran, respectively. AmProPO clustered with Diptera (*M. domestica*, *S. bullata*, and *A. gambiae*), and Coleoptera (*H. diomphalia* and *T. molitor*) ProPOs.

3.3. Genomic structure of *AmproPO*

A BLAST search in the *A. mellifera* genome at NCBI revealed similarity between *AmproPO* and the 151613 contig (GenBank accession no. AADG01015613). This contig contains the full-length genomic structure for *A. mellifera* ProPO (4092 nucleotides in length). Comparative analysis of the cDNA and the genomic sequence permitted to characterize 9 exons separated by 8 introns (Fig. 4). The positions of the exons and introns were confirmed when a program for exon-intron prediction (GENSCAN) was used. Exon sequence lengths were: exon I—111; exon II—193; exon III—224; exon IV—203; exon V—418; exon VI—129; exon VII—325; exon VIII—233; exon IX—246 (including the stop codon). The conserved regions were each encoded by a single exon, except copper binding site B, which was found to be encoded by two exons (V and VI). The alignment between the ORFs from the *AmproPO* cDNA and from the genomic sequence showed 99% identity.

```

1 - TCAAATCGAACATTATTCTTATCTGCATTTCCCGTGGATTATATAATAAAAATTTT - 60
61 - ATGAAATTTGAATATTCGTGAAACAATCATATATAAAAAATTTATACAAAACGGCACT - 120
121 - TATTGCGTGAACCTGTCTTGTAGATAATAATAGTTTTCGTTTATTTGCTTTTATTCT - 180
181 - TCATTGACATCAGAACTATCGAGAAAATGGCGTCTGATAAATCGGGTATTTTGTATCT - 240
      M A S D K S G I L Y L
241 - ATTTGATCGACCTTCTGAACAGTTTACGTCCCTAAGGGAGACAATAAAGTCGCTTTGA - 300
      F D R P S E P V Y V P K G D N K V A F D
      ↓
301 - TATTCCACCTGATTATTTGCTGATAGATATCGTTCTGTGGCTACTCAAGTATTTAATCG - 360
      I P P D Y L P D R Y R S V A T Q V P N R
361 - TTTCGGGATGATACCGAACTCGAACTTCCAGTGAAGGCATTACTCTTCGGATCTTTAG - 420
      F G D D T E S K L F V K A I T L P D L S
421 - TATTCCAAATGCACTGAGCCTGCTCAACCTTTTTCATTATTATCCCGGCACATCGAAA - 480
      I P M Q L G E R R Q P P S L P I P A H R K
481 - AATAGCTGCTGATTAATGATATTTTATGGGTATGCGAACAATAGAGACTTCTGTC - 540
      I A A R L I D I P M G M R T Y E D F L S
541 - TGTTGCGATTATTTGCTGCGATCGTTAAATCCAAATTTGTTTATTATGCGCCTACGT - 600
      V A V Y C R D R L N P N L P I Y A L S V
601 - GGCGATCTTCATCGCTGACACGAAAGATTTGCGAGTACCACCGCTTACCGAAGTATT - 660
      A I L H R P D T K D L P V P P L T E V F
661 - TCCAGACAAATATAGATAGTGAATATTTCCAGGGCTAGAGAAAGCTAATGTTGT - 720
      P D K Y M D S G I F S R A R E E A N V V
721 - ACCAGAGGGTGTAGAGTCCAATGAAATCCAAAGAGATTATACCGCATCAGATCTTGA - 780
      P E G A R V P I E I P R D Y T A S D L D
781 - TGTTGAACTCGTGTGCTTATTTGGAGAGAAGATATTTGAAATTAATCTTCATCATGGCA - 840
      V E H R V A Y W R E D I G I N L H H W H
841 - TTGGCACTGGTGTATCCATTGAAAGGTGACATAGAATTTGTTAAACAGGATCGACGTGG - 900
      W H L V Y P P E G D I R I V N K D R R G
      I
901 - AGAACTTTTCTATTATATGCATCAACAGATTATGGCTAGATATAATGOGAACGGCTATG - 960
      E L F Y Y M H Q Q I M A R Y N C E R L C
961 - TATGCTCTTGGACGAGTAAACGATTCAATTAATGGCACGAAACCGATTCCAGAAGCTTA - 1020
      N R L G R V K R P I N W H E P I P E A Y
1021 - CTTCCGAAATAGATTCCCTTGTGCCAGTGGACATGCGCAATTCGACCCGCGGTAC - 1080
      F P R L D S L V A S R T W P F R P S G T
1081 - TGTTCTTAAGACATCAATCGACAGTTGATGATGAACTTTGACACTTACAGATCTAGA - 1140
      V L K D I N E Q V D E L N F D T Q D L E
1141 - AAGATGGCTGATCGTATTACGAGGCAATCCATACAGATCTGTGATTAATACCGGGG - 1200
      R W R D R I Y E A I H T G S V I N T R G
1201 - TGAAGAATTCAAATGACTGAGAAAATGGAATCGACCTCTGGGAAATATCATGGAAGC - 1260
      E R I Q L T E K N G I D V L G N I M E A
1261 - TAGTATCTTTCCCAATCAGAATGCTATGGTATCTCCATAATTTTGGTCATGTCCG - 1320
      S I L S P N O N V Y G D L H N F G H V A
1321 - CATTCTTATATCCATGATCCGGATCATGATATTTGGAGAGTTTGGTGTATGGGTGA - 1380
      P
      II
1381 - TTCAGCAACAGCTATGAGAGATCCTATATTTATAGATGGCATGCAATTTGTGATGACGT - 1440
      S A T A M R D P I E Y R W H A F V D D V
1441 - GTTTCAGGAACATAAAAAATACATTACCTCAGTATACTGTACCAACAGTTAGACTTCCGAG - 1500
      E Q E H K N T L P Q Y T V Q Q L D F P G
1501 - TATCGAAATAGCAGATATCAAATGACAAACCAATCAACACGCAATATTTTAAATACCTT - 1560
      I E I A D I K L T T N Q Q R N I L N T F
1561 - TTGGACAAAAGTGTAGATTGTCACGGGACTCGAATTTCACTCCACGTGGCGCAGT - 1620
      W T K S D V D L S R G L D F T P R G A V
1621 - GCTGCTAGATTTACTCACTGAACCATGCTGATTTTTCATATACGATTGTTATTAATAA - 1680
      L A R F T H L N H A D F S Y T I V I N N
1681 - TCGTAATAATACATCAATGAAAGGCACGCTCGTATCTTTATAGTCTTAAGAAGACGA - 1740
      R N N T S M K G T V R I F I G P K E D E
1741 - GCGTGGATACCTTTACTTTCGAGAGACGAGAATTTAATGATCGAATGGATAGTT - 1800
      R G L P P T F R E Q K N L M I E L D K F
1801 - TCCTATAACACTTCAACAGGAAAATACGATTTGAAACAGAAATCTACGAAATCTTCAGT - 1860
      P I T L Q P G K N T I E Q K S T K S S V
1861 - AACTATACCTTTGAGAGAACTTCCGCAACTTAGATGAAATAGACCAATAGAGAGTGA - 1920
      T I P F E R T F R N L D E N R P I G G D
1921 - TAGTTTGAACGATTOSATTTTGTGGATGGATGGCCGCAACATATGTTATACCAAA - 1980
      S L E R F D F C G C G W P O H M L I P K
      III
1981 - AGGAAATAAAGAGGTTTGCATGGAACCTTTTCTCATGATCAGATTATAAAGATGA - 2040
      G N K E G F A M E L F V M V S D Y K D D
2041 - TCGTGTGAACAAAAGAGCAATTTGTTGTAAGGATGCTCAAGTATTGTTGATTAAG - 2100
      R V E Q N E P I G C K D A S S Y C G L R
2101 - AGATAGAACTATCTGATGACGAGCAATGGATATCCATTGATCGTCAACCTCGTGC - 2160
      D R K Y P D A R A M G Y P E D R Q P R A
      IV
2161 - AGGTGTTGAAACTTTAGCTCAATCTCACCGGAAATATGGCGGTAAGTAAAGTAAAGT - 2220
      G V E T L A Q F L T G N M A V T E V T V
2221 - TCGATTTAGTACAAATGCTACCTAGATCTAGATCTGGAAGTATAAGCAATACCTTTAAC - 2280
      R F S D T I V P R S R S G S I S N T L T
2281 - CTTTATGTAATGAGATTGAGTATCTTTGAATATCTCTTGACATGGCAAATATTGGATA - 2340
      F M *
2341 - TAGACTGCTGGAATATAATATACTTAAGATCATTAATTTGATTGACTTTTACTTTTATA - 2400
2401 - ATATTTAAATGTATTTCTTATTACATATATATATATATATAATAAACTATTGTAA - 2460
2461 - TAAATAAAAAATAAATGAGCAGTCAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATA - 2520

```

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *A. mellifera proPO*. Possible polyadenylation signal (AATAAA) and poly (A)⁺ tail are underlined. The sequence was deposited in the GenBank (GenBank accession no. AY242387). Arrow shows a possible cleavage site for proteolytic activation of the enzyme. Conserved motifs are doubly underlined and numbered. Note in region I: copper binding site A, region II: thiol ester region-like motif and in region IV: a conserved motif at the C-terminal end. *Stop codon.

Copper binding site A

```

Hd_ProPOII  AYFREDLGINLHHHWHHLVYPPEG-AEQVVRKDRRGELFYMHQQ
Hd_ProPOI   AYWRDLGINLHHHWHHLVYPTDG-GEIVTKDRRGELFYYSHQQ
As_ProPOI   AFFREDIGVNLHHHWHHLVYPGDG-PDSVVRKDRRGELFYMHQQ
As_ProPOII  AFFREDIGVNSHHHWHHLVYPGDG-PDSVVRKDRRGELFYMHQQ
Aa_ProPOI   AFFREDIGVNLHHHWHHLVYPGDG-PDQVVRKDRRGELFYMHQQ
Aa_ProPOII  AFFREDIGVNLHHHWHHLVYPGDG-PDAVVRKDRRGELFYMHQQ
Ans_ProPO   AYFREDIGVNLHHHWHHLVYPPEG-PSNVVNRKDRRGELFYMHQQ
Sb_ProPOII  GYFREDIGVNSHHHWHHLVYPGNG-PIEVVKDRRGELFYMHQQ
Hc_ProPOI   AYFREDIGVNLHHHWHHLVYPGEGDM-AIVNKDRRGELFYMHQQ
Ph_POIII    AYFREDIGVNLHHHWHHLVYPYEG-SRDLVNRKDRRGELFYMHQQ
Ph_POI      AYFREDVGINLHHHWHHLVYPPEG-SLDIVKDRRGELFYMHQQ
Ph_POII     AYFREDLGINLHHHWHHTVYPPGG-SYKVVHDKDRRGELFYMHQQ
Sb_ProPOI   WYFREDLGINLHHHWHHLVYPPFAGDRAIVNKDRRGELFYMHQQ
Ag_ProPOI   WYFREDIGVNLHHHWHHLVYPPDASNRAIVDKDRRGELFYMHQQ
Bm_ProPOI   AYFREDIGVNLHHHWHHLVYPPDADRRAIVNKDRRGELFYMHQQ
Ms_ProPOI   AYFREDIGVNLHHHWHHLVYPPDSADRSIVNKDRRGELFYMHQQ
Tm_ProPO    AYFREDLGINLHHHWHHLVYPPFAA-AREVVAKNRKDRRGELFYMHQQ
Hc_ProPOII  AYFREDLGINLHHHWHHLVYPPFAASQREIVAKDRRGELFYMHQQ
Gm_ProPOI   AYFREDIGVNLHHHWHHLVYPPFAAAR-EIVKDRRGELFYMHQQ
Bm_ProPOII  AYWRDIGINLHHHYHHLVYPPPTANDLSIVAKDRRGELFYMHQQ
Am_ProPO    AYWRDIGINLHHHWHHLVYPPPEG-DIRIVNKDRRGELFYMHQQ
Pl_ProPO    SYWRDFGINSHHHWHHLVYPIEM---NVNDRKDRRGELFYMHQQ
: : * * * . * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * *

```

Copper binding site B

```

Hd_ProPOI   LGNIMESS-ELSPNRQLYGNLHGFGHLMLSYIHDPRSHHLEPFQVIGDFTTAMRDPiFYRWHAfVDDVF
Am_ProPO    LGNIMEAS-ILSPNQVYGDLHNFGHVAISYIHDpDHRYLESFGVMGDSATAMRDPiFYRWHAfVDDVF
Sb_ProPOI   LGNILESS-ITSVNRSYGDLHNMGHVFISYAHDPDHRHLESFGVMGDSATAMRDPVfYRWHAfVDDMF
Hd_ProPOII  LGNIVESS-NLSVNRTLYGDLHNMGHVFISYIHDpDHRHLETfGVMGDSATAMRDPVfYRWHAyIDDLf
Ag_ProPOI   LGNIESS-ILSPNRQLYGDMHNMGHVFISYAHDPDHRHLESFGVMGDVATAMRDPVfYRWHSyIDDI f
Tm_ProPO    LGNIMESS-ILSPNRTPFYGDMHNMGHVFISYVHDpDHRHLESFGVMGDSATAMRDPiFYRWHSyIDDI f
Hc_ProPOI   LGNMMEST-ILSPNRSYGDFHNLGHVFISFAHDpDHRHLELFQVMGDSATAMRDPVfYRWHSyIDDLf
Bm_ProPOI   LGNLMESS-ILSRNRPYGDLHNMGHVFISYSHDPDHRHLEQFQVMGDSATAMRDPVfYRWHAyIDDI f
Gm_ProPOI   LGNLMESS-ILSLNRGYGDLHNMGHVFIASSHDPDHRHLEEYQVMGDSATAMRDPVfYRWHAyIDDI f
Ms_ProPOI   LGNLMESS-ILSPNRGYGDLHNMGHVFAAYTHDPDHRHLEQFQVMGDSATAMRDPfFYRWHRfVDDVF
Bm_ProPOII  LGNMLESS-ALSPNREYGSIHNGHSFTAYMHDPEHRYLEQFGVIADEATTMRDPfFYRWHAyIDDVf
Hc_ProPOII  LGNMEAS-ILSPNREYGSIHNGHSFSAYMHDLQHRYLESFVIADEATTMRDPfFYRWHAyIDDTf
Pl_ProPO    LGDAFEADAQLSPNYLFYGDLHNTGHVLLAFCHDNDNSHREEIGVMGDSATALRDPfFYRWHAfVDDI f
Ph_POI      LGNMIEASPVLSPNFGYGSIHNRGHMAISYCHDPDGRYLEQFAVMGDSTAMRDPiFYRWHAfIDEFf
Ph_POII     LGDMIEASSLLSPNFGYGSLHNMGHMAISYCHDPVGRYLEDFAVMGDPATAMRDPiFYRWHAfIDEFf
Ph_POIII    LGNIEGSPVLSVNDYGSIHNKGHMAIASYCHDPDGRYLEKFGVMGSSTAMRDPiFYRWHTyVDEff
Sb_ProPOII  LGDMECT-ILSVNRTYGNLHNEGHNAISYCHDPDARFLEDFGVMGDVTAMRDPfFYRWHAfIDDTf
Aa_ProPOI   LGNIMEPS-SLSVNRQYGSYHGNLHNIAYSHDPEGRFLEGYGVVGEFQTAMRDPTfYRLHAQVDNMf
Aa_ProPOII  LGNIMEPS-SLSVNRQYGSYHGNLHNVIASHDPEGRFLEGYGVVGEFQTAMRDPTfYRLHAQVDNMf
Am_ProPOI   LGNIMEPS-SLSINRQYGSYHGNLHNIASHDPEGRFLEGYGVVGEFQTAMRDPTfYRLHAQVDNMf
Ans_ProPO   LGNIMEPS-ALSVNSQYGNYHGHMHNLIAFSHDPENRFLEGYGVVGEFQTAMRDPAfYRLHAQVDNMf
As_ProPOII  NGNLMEPN-SLSINRQYGLHGNVHNVIASHDPDNRFLEDYGVMGEVTTAMRDPTfYRCHVQIDDMF
* : . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Fig. 2. Multiple sequence alignment of the two copper binding sites (A and B) regions of arthropod ProPOs. Conserved histidine residues (the proposed ligands for copper ions, based on alignment with arthropod hemocyanins) are in bold. Identical amino acids residues are marked with asterisks and other conserved residues are represented with a period or a colon. Aa: *Aedes aegypti*; Ag: *Anopheles gambiae*; Am: *Apis mellifera*; Ans: *Anopheles stephensi*; As: *Armigeres subalbatus*; Bm: *Bombyx mori*; Gm: *Galleria mellonella*; Hc: *Hyphantria cunea*; Hd: *Holotrichia diomphalia*; Ms: *Manduca sexta*; Ph: *Pimpla hypochondriaca*; Pl: *Pacifastacus leniusculus*; Sb: *Sarcophaga bullata*; Tm: *Tenebrio molitor*.

Digestion of the genomic DNA with restriction enzymes *Bcl*I and *Hae*III, followed by Southern blot (Fig. 5) resulted in one band after hybridization with the 593bp probe, suggesting that only one copy of the *proPO* gene is present in *A. mellifera*.

3.4. *AmproPO* expression in tissues, castes and sexes

Semiquantitative RT-PCR was performed to detect the presence of *AmproPO* transcripts and to estimate the

expression level. The amplified products were hybridized with the 359 bp probe in Southern blots. Different levels of *AmproPO* expression were detected in integument and hemocytes as shown by comparisons with the internal control 28S ribosomal cDNA (Fig. 6A). The highest *AmproPO* expression was detected in hemocytes. Comparative analysis of transcript levels in drones, workers and queens at a comparable developmental stage (Pbd pupae) revealed that females have higher amount of *AmproPO* transcripts than males (Fig. 6B).

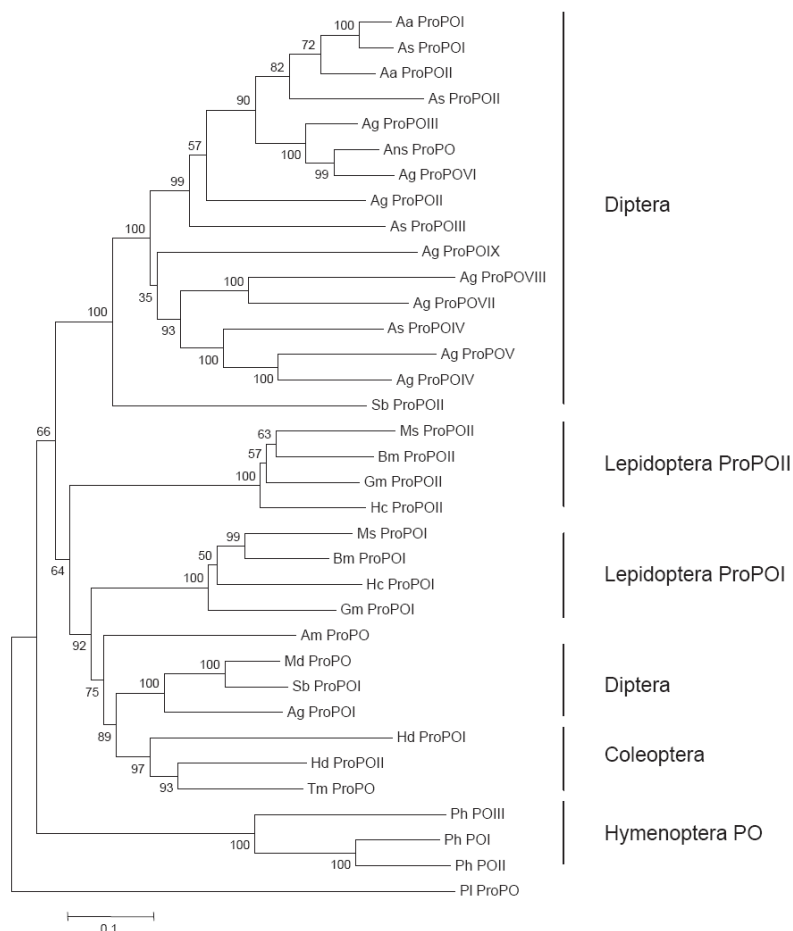


Fig. 3. Neighbor-joining dendrogram showing the relationship among the known arthropod ProPO using a crustacean (*Pacifastacus leniusculus*) ProPO as outgroup. Analysis was performed with multiple alignment from amino acid sequences using ClustalW 1.8. Bootstrap values for each node are shown. Aa: *Aedes aegypti*; Ag: *Anopheles gambiae*; Am: *Apis mellifera*; Ans: *Anopheles stephensi*; As: *Armigeres subalbatus*; Bm: *Bombyx mori*; Gm: *Galleria mellonella*; Hc: *Hyphantria cunea*; Hd: *Holotrichia diomphalia*; Md: *Musca domestica*; Ms: *Manduca sexta*; Ph: *Pimpla hypochondriaca*; Pl: *Pacifastacus leniusculus*; Sb: *Sarcophaga bullata*; Tm: *Tenebrio molitor*.

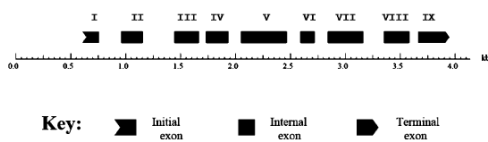


Fig. 4. Schematic representation of the *AmproPO* gene structure. A scale bar is shown at the bottom. Exons are numbered above the bars. Introns are the blank regions between the exons.

Among females, workers showed higher expression than queens.

3.5. *AmproPO* expression during development

AmproPO expression was quantified in four larval stages, prepupae, pupae differing in chronological age and intensity of cuticular pigmentation, and adults using *A. mellifera* actin cDNA as a control. The results

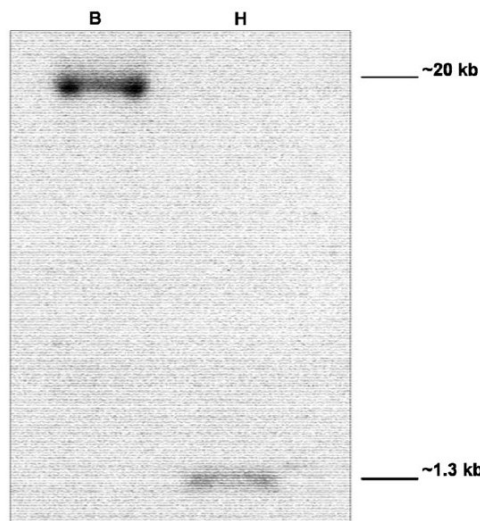


Fig. 5. Southern blot hybridization from the *Apis mellifera* genomic DNA. Thirty micrograms of genomic DNA were digested for 16 h with restriction enzymes: *Bcl*I (B) at 50 °C and *Hae*III (H) at 37 °C. The digestion product was electrophoresed in 1.0% agarose gel, transferred to nylon membrane, and hybridized with the 593 bp fluorescein labeled probe.

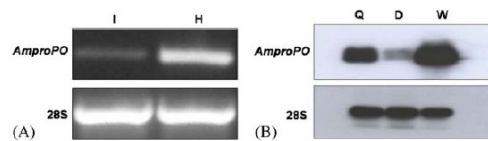


Fig. 6. Semi-quantitative RT-PCR analysis of *A. mellifera proPO* expression. (A) *AmproPO* transcripts were detected in samples of total RNA isolated from thoracic integument (I) and hemocytes (H) from worker pupae (Pbm stage). (B) Gene expression of *AmproPO* in queen (Q), drone (D) and worker (W) pupae (Pbd stage). 28S ribosomal cDNA was used as an internal control for reverse transcription and PCR.

showed relatively low expression in larval and pupal stages, except in the dark pigmented pupae ready to emerge (Pbd). Transcript amounts increased up to ~14-fold at emergence time when compared with the larval and younger pupal stages (Fig. 7).

4. Discussion

A cDNA for ProPO was isolated from an important social insect, the honey bee *A. mellifera*. The fully

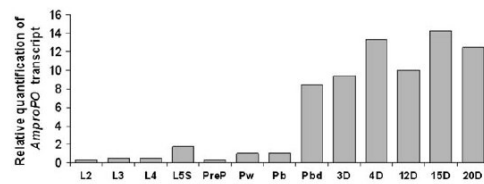


Fig. 7. Relative quantification of *AmproPO* transcripts by real-time RT-PCR during honey bee worker development. Total RNA was isolated from larvae at successive instars (L2, L3, L4, L5S), prepupa (PreP), pupae (Pw and Pb—unpigmented pupae, and Pbd—pigmented pupae ready to emerge) and adults (3, 4, 12, 15 and 20 days post-emergence). Transcript abundance was calculated based on the difference in threshold cycle (Ct) values between *AmproPO* and actin transcripts, using the relative quantification method from Applied Biosystem (Relative Quantification of Gene Expression; ABI Prism 7700 Sequence Detection System, User Bulletin #2).

sequenced *AmproPO* showed an ORF of 2079 bp that encodes a 693 amino acid ProPO protein. As described for other insects, the deduced AmProPO protein contains four conserved regions, illustrated in Fig. 1. Regions I and II correspond to the copper binding sites CuA and CuB, which are highly conserved oxygen-binding sites, common to all invertebrate ProPOs and other closely related proteins, such as the hemocyanins from lower arthropods.

Region III is a thiol ester motif (GCGWPQH) characteristic of α 2-macroglobulin and of C3 and C4 complement proteins, with function in macromolecule binding (Dodds and Day, 1996). The presence of thiol ester motif in ProPO may be related to the function of immobilization of invading organisms during the process of insect defense reactions (Sritunyalucksana et al., 1999). The functional role of the conserved sequence in the C-terminal end (region IV) is still unknown. However, a similar region has been found in arylphorin receptors, hexamerins and hemocyanins. The high similarity and the shared domains of these proteins suggest that they originated from a common ancestor (Beintema et al., 1994; Burmester and Scheller, 1996).

A BLASTp search using the 693 AmproPO amino acid sequence as query entry showed high similarity to the ProPOs of other insects, with higher values (63–61%) for dipteran (*M. domestica*, *A. gambiae* and *S. bullata*) and coleopteran ProPOs (*H. diomphalia* and *T. molitor*). In contrast to POs from other insects, which are synthesized in the form of inactive proenzymes, the PO isoforms from the hymenopteran *P. hypochondriaca* are constitutively active. Amino acid sequence analysis of these constitutive isoforms revealed the absence of sequences for proteolytic activation, typical of the proenzyme. Moreover, the venom POs showed the signal peptide sequences necessary for secretion from endoplasmic reticulum, whereas ProPOs do not have

such sequences thus suggesting that they are released into the hemolymph by hemocyte rupture (Kawabata et al., 1995; Taft et al., 2001). Database searches revealed lower similarity between AmProPO and *P. hypochondriaca* PO isoforms (POI—52%, POII—50%, POIII—47%) than between AmProPO and other insect orders. Neighbor-joining analysis showed that POs of *P. hypochondriaca* and AmProPO clustered into two distinct groups. These results show that the unique characteristics of *P. hypochondriaca* POs not only separate them from dipteran, coleopteran, and lepidopteran ProPOs, but also from ProPO of the hymenopteran *A. mellifera*.

The general topology of the tree shown in Fig. 3 is similar to previously published molecular phylogenies (Park et al., 1997; Müller et al., 1999; Sritunyaluksana et al., 1999; Cui et al., 2000; Parkinson et al., 2001). Lepidopteran, dipteran and coleopteran ProPOs were separated in distinct groups and with exception of *A. gambiae* and *S. bullata* ProPOI, and *M. domestica* ProPO, the degree of sequence identity was generally greater within orders than among orders. AmProPO plus dipteran and coleopteran ProPOs grouped together. This closest relationship may become better resolved as more hymenopteran *proPO* genes are described and included in the analysis. The phylogenetic analysis also showed that lepidopteran ProPOI and ProPOII fell into two groups. The fact that ProPO subunits of a single species are less similar to each other than to those of other species led Cui et al. (2000) to suggest the occurrence of duplication and divergence of the *proPO* gene prior to lepidopteran speciation. Multiple duplications events were also proposed to explain the diversity of members and evolution of the anopheline ProPO family (Müller et al., 1999).

Southern blot analysis of digested genomic DNA of *A. mellifera* suggests the existence of only one *proPO* gene in this species. It is unlikely that we may have missed other *proPO* genes since the probe contains the sequence coding for the copper binding site (CuB) present in all known ProPOs. Using this same procedure, the existence of only one gene was also proposed for *H. cunea* (Park et al., 1997). In contrast, in *A. stephensi*, there seems to be more than one *proPO* gene (Cui et al., 2000). Further evidences that the ProPO of *A. mellifera* is encoded by a single gene is the presence of only one contig (GenBank accession no. AADG01015613) for this protein in the bee genome data bank (<http://hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>), and the existence of a single PO activity in hemocytes (Zufelato et al., 2004).

The genomic sequence of ProPO is known for only a few insects (*A. gambiae*—Ahmed et al., 1999; *A. aegypti*—Taft et al., 2001; *Drosophila melanogaster*—Chase and Sugumaran, 2001). In *A. mellifera*, the genomic sequence is composed of 4092 nucleotides,

which include a putative promoter and nine exons. The conserved regions I (CuA), III and IV are encoded by exons IV, VIII, and IX, respectively. In contrast to *A. gambiae*, where the copper binding site CuB is encoded by only one exon (exon 3) (Ahmed et al., 1999), the *A. mellifera* CuB site (region II) is encoded by two separate exons (V and VI).

Although ProPO proteins, as well as the ProPO activating system, have been consistently identified in the cuticle of different insects (Lai-Fook, 1966; Ashida and Brey, 1998; Asano and Ashida, 2001a), Northern blots failed to demonstrate the presence of *proPO* transcripts in the epidermis of *B. mori* (Asano and Ashida, 2001a). This has led to the assumption that this enzyme is transported from the hemolymph (where the transcript was identified) to the cuticle through the epidermis (Asano and Ashida, 2001a). Evidence for this transport was obtained for *B. mori* (Asano and Ashida, 2001b). Using semiquantitative RT-PCR, we observed *proPO* transcripts in the integument (epidermis plus cuticle) of honey bees. However, we cannot completely exclude the possibility of integument contamination by adhered hemocytes, although integument pieces have been carefully washed in saline before being processed for RT-PCR. The detection of *proPO* mRNAs in the epidermis of *A. stephensi* by in situ hybridization (Cui et al., 2000), and additional data showing *proPO* expression in the midgut of *A. gambiae* (Müller et al., 1999), and in fat body of *A. stephensi* (Cui et al., 2000) suggest other sites of ProPO synthesis besides hemocytes.

Workers, queens and drones showed high, intermediary and low *AmproPO* expression levels, respectively. Particularly interesting was the detection of distinct levels of *AmproPO* transcript in the female castes. Adult workers and queens differ considerably from each other in terms of morphology, physiology, biochemistry and behavior. These differences reflect the divergence in the patterns of gene expression at the end of the larval stage (Evans and Wheeler, 2000). It is known that all young *A. mellifera* larvae have the potentiality to develop as a queen or as a worker. Caste dimorphism is primarily due to differences in the quantity and quality of food received by the larvae, which results in marked differences in the synthesis and fluctuation of juvenile hormone and ecdysteroids, and ultimately in the caste-specific regulation of gene expression (Hartfelder and Engels, 1998). Thus, genes that are potentially functional in workers were observed to be repressed in queens (Severson et al., 1989; Corona et al., 1999; Evans and Wheeler, 1999, 2000; Hepperle and Hartfelder, 2001; Guidugli et al., 2004). Given the higher *AmproPO* transcriptional activity observed in worker bees, we are led to consider whether this gene could have additional functions in physiological processes inherent to workers, but not to queens.

AmproPO is constitutively expressed during honey bee ontogenesis. Its expression was detected in L2, L3, L4 and L5 larval instars, prepupae, unpigmented pupae (Pw and Pb), and pigmented pupae (Pbd), and in 3, 4, 12, 15 and 20 day-old adult workers. In the lepidopteran *H. cunea*, *proPO* mRNAs were not detected in pupae (Park et al., 1997), although expression has been observed in other stages of development. In *A. gambiae*, the expression of six *proPO* genes at different stages of development was assessed using RT-PCR (Müller et al., 1999). These genes were not expressed coordinately, but showed distinct temporal profiles of expression. Explanations for these differences will be possible only when more encompassing data on *proPO* gene expression and PO function during ontogenesis become available.

The fact that *AmproPO* transcripts were detected in all developmental stages but were present in higher amounts in adult bees is of interest. Larvae and pupae develop well protected inside the colony, whereas adult workers are exposed to adverse environmental conditions during their foraging activity. It is thus possible that the larger quantity of transcript (and zymogen) in adult bees may be necessary for a higher efficiency in the defense response. In addition, it is known that cuticular melanin exerts a protective effect against UV damage (Gunn, 1998), and is important for thermoregulation (Ellers and Boggs, 2004), and this could explain the increased amount of *AmproPO* transcript in adult workers.

In our laboratory, a PO activity was recently characterized in hemolymph of *A. mellifera* (Zufelato et al., 2004). The molecular mass of the single *A. mellifera* PO (70 kDa) closely corresponds to that of the cleaved protein (74 kDa) deduced from the nucleotide sequence (this paper). Antibodies raised against the hemolymph PO detected this protein also in integument (Colonello et al., 2003), suggesting that in addition to its well-known function in the defense against invading agents, this enzyme also participates in cuticle pigmentation and sclerotization. The coincidence between the initiation and intensification of melanin deposition into the pupal cuticle and the increase of both, PO specific activity (Zufelato et al., 2004) and amount of *AmproPO* transcripts (this paper), cause this consideration to be quite pertinent.

Treatment of *A. mellifera* with 20-hydroxyecdysone (20E) resulted in changes in the timing and intensity of cuticle melanization (Zufelato et al., 2000). The process of cuticular pigmentation in honey bees is thus regulated by this hormone, similar to the corresponding process in *M. sexta* (Curtis et al., 1984; Hiruma and Riddiford, 1988). During honey bee development, the ecdysteroid titers reach the highest level approximately in the middle of the pupal stage, just before the initiation of cuticle pigmentation (Feldlaufer et al., 1985; Rembold, 1987;

Zufelato et al., 2000; Pinto et al., 2002), suggesting that exposure to a high titer of endogenous ecdysteroids is essential to induce melanin synthesis in the epidermis. In fact, an increase in *AmproPO* transcripts was observed in pupae injected with 20E, using RT-PCR and real-time RT-PCR (Zufelato et al., 2004). Complementing these data, we are here showing that the amount of *AmproPO* transcripts naturally increases at the end of the pupal stage following exposure to the endogenous ecdysteroid peak. We are also showing that the transcript abundance continues to increase even after ecdysteroid level has declined to basal values, in newly emerged and young adult honey bee workers. These data are consistent with the observations made in *M. sexta* and in flies (Hiruma and Riddiford, 1990; Fragoulis and Sekeris, 1975; Kraminsky et al., 1980) that a peak of ecdysteroid is necessary to induce genes involved in cuticle melanization.

In conclusion, cloning and sequencing of a *proPO* gene permitted the study of its expression in an important species representative of eusocial insects. Besides contributing to the investigation of differential gene expression in castes and sexes (a fascinating aspect of the biology of insects living in communities), the present study opens perspectives for the determination of *AmproPO* expression in response to pathogens and parasites that may infest adult bees or immature stages.

Acknowledgments

We are grateful to Luiz Roberto Aguiar for technical assistance in the apiary, Dr. Gene Robinson (University of Illinois, Urbana, USA) for kindly providing a brain λ ZAP cDNA library of *Apis mellifera*, and Drs. Klaus Hartfelder and Maura Helena Manfrin for reading the manuscript and correcting the language. This work was supported by FAPESP (01/00954-7).

References

- Ahmed, A., Martin, D., Manetti, A.G.O., Han, S.-J., Lee, W.-J., Mathiopoulou, K.D., Müller, H.-M., Kafatos, F.C., Raikhel, A., Brey, P.T., 1999. Genomic structure and ecdysone regulation of the prophenoloxidase 1 gene in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 14795–14800.
- Andersen, S.O., Peter, M.G., Roepstorff, P., 1996. Cuticular sclerotization in insects. Comp. Biochem. Physiol. 113, 689–705.
- Asano, T., Ashida, M., 2001a. Cuticular pro-phenoloxidase of silkworm, *Bombyx mori*. J. Biol. Chem. 276, 11100–11112.
- Asano, T., Ashida, M., 2001b. Trans epithelially transported pro-phenoloxidase in the cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Biol. Chem. 276, 11113–11125.
- Ashida, M., 1971. Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. Arch. Biochem. Biophys. 144, 749–762.

- Ashida, M., Brey, P.T., 1995. Role of the integument in insect defense: prophenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10698–10702.
- Ashida, M., Brey, P.T., 1998. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey, P.T., Hultmarck, D. (Eds.), *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. Chapman and Hall, London, pp. 135–172.
- Beintema, J.J., Stam, W.T., Hazes, B., Smid, M.P., 1994. Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (hexamerins). *Mol. Biol. Evol.* 11, 493–503.
- Burge, C., Karlin, S., 1997. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J. Mol. Biol.* 268, 78–94.
- Burmester, T., Scheller, K., 1996. Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin and dipteran arylphorin receptor. *J. Mol. Evol.* 42, 713–728.
- Chase, M.R., Sugumaran, M., 2001. Genomic and cDNA sequence of prophenoloxidases from *Drosophila melanogaster*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 484, 349–362.
- Chase, M.R., Raina, K., Bruno, J., Sugumaran, M., 2000. Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidases from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 953–967.
- Cho, W.L., Liu, H.S., Lee, C.H., Kuo, C.C., Chang, T.Y., Liu, C.T., Chen, C.C., 1998. Molecular cloning, characterization and tissue expression of prophenoloxidase cDNA from the mosquito *Armigeres subalbatus* inoculated with *Dirofilaria immitis* microfilariae. *Insect Mol. Biol.* 7, 31–40.
- Colonello, N.A., Zufelato, M.S., Simões, Z.L.P., Bitondi, M.M.G., 2003. In vitro secretion of ecdysteroid-dependent proteins and of a 70 kDa subunit reactive to anti-prophenoloxidase serum by *Apis mellifera* integument. *Apidologie* 34, 377–388.
- Corona, M., Estrada, E., Zurita, M., 1999. Differential gene expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Exp. Biol.* 212, 929–938.
- Cui, L., Luckhart, S., Rosenberg, R., 2000. Molecular characterization of a prophenoloxidase cDNA from the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Insect Mol. Biol.* 9, 127–137.
- Curtis, A.T., Hori, M., Green, J.M., Wolfgang, W.J., Hiruma, K., Riddiford, L.M., 1984. Ecdysteroid regulation of the onset of cuticular melanization in allatectomized and black mutant *Manduca sexta* larvae. *J. Insect Physiol.* 30, 597–606.
- Dodds, A.W., Day, A.J., 1996. Complement-like proteins in invertebrates. In: Söderhall, K., et al. (Eds.), *New Directions in Invertebrate Immunology*. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA, pp. 303–341.
- Ellers, J., Boggs, C.L., 2004. Functional ecological implications of intraspecific differences in wing melanization in *Colias* butterflies. *Biol. J. Linn. Soc.* 82, 79–87.
- Evans, J.D., 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.
- Evans, J.D., Wheeler, D.E., 2000. Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biol.* 2, research0001.1-0001.6.
- Feldlaufer, M.F., Herbert Jr., E.W., Svoboda, J.A., Thompson, M.J., Lusby, W.R., 1985. Makisterone A: the major ecdysteroid from the pupa of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* 15, 597–600.
- Fragoulis, E.G., Sekeris, C.E., 1975. Induction of dopa (3,4-dihydroxyphenylalanine) decarboxylase in blowfly integument by ecdysone. A demonstration of synthesis of the enzyme de novo. *Biochem. J.* 146, 121–126.
- Fujimoto, K., Okino, N., Kawabata, S.I., Iwanaga, S., Ohnishi, E., 1995. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenoloxidase A₁ of *Drosophila* easter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7769–7773.
- Geer, L.D., Domrachev, M., Lipman, D.J., Bryant, S.H., 2002. CDART: protein homology by domain architecture. *Genome Res.* 12, 1619–1623.
- Guidugli, K.R., Hepperle, C., 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.
- Gunn, A., 1998. The determination of larval phase coloration in the African armyworm, *Spodoptera exempta* and its consequences for thermoregulation and protection from UV light. *Entomol. Exp. Appl.* 86, 125–133.
- Hall, M., Scott, M., Sugumaran, M., Söderhäll, K., Law, J.H., 1995. Proenzyme of *Manduca sexta* phenoloxidase: purification, activation, substrate specificity of the enzyme and molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7764–7768.
- Hartfelder, K., Engels, W., 1998. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr. Top. Dev. Biol.* 40, 45–77.
- Hepperle, C., Hartfelder, K., 2001. Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development. *Naturwissenschaften* 88, 113–116.
- Hiruma, K., Riddiford, L.M., 1988. Granular phenoloxidase involved in cuticular melanization in the tobacco hornworm: regulation of its synthesis in the epidermis by juvenile hormone. *Dev. Biol.* 130, 87–97.
- Hiruma, K., Riddiford, L.M., 1990. Regulation of dopa decarboxylase gene expression in the larval epidermis of the tobacco hornworm by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone. *Dev. Biol.* 138, 214–224.
- Huang, L.H., Christensen, B.M., Chen, C.C., 2001. Molecular cloning of a second prophenoloxidase from the mosquito *Armigeres subalbatus*: prophenoloxidase expression in blood-fed and microfilariae-inoculated mosquitoes. *Insect Mol. Biol.* 10, 87–95.
- Jiang, H., Wang, Y., Ma, C., Kanost, M.R., 1997. Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit ProPO-P1. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 835–850.
- Kawabata, T., Yasuhara, Y., Ochiai, M., Matsuura, S., Ashida, M., 1995. Molecular cloning of insect pro-phenoloxidase: a copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7774–7778.
- Kim, M.S., Baek, M.J., Lee, M.H., Park, J.W., Lee, S.Y., Söderhäll, K., Lee, B.L., 2002. A new easter-type serine protease cleaves a masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia* larvae. *J. Biol. Chem.* 277, 39999–40004.
- Kraminsky, G.P., Clark, W.C., Estelle, M.A., Gietz, R.D., Sage, B.A., O'Connor, J.D., Hodgetts, R.B., 1980. Induction of translatable mRNA for dopa decarboxylase in *Drosophila*: an early response to ecdysterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4175–4179.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Masatoshi, N., 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17, 1244–1245.
- Lai-Fook, J., 1966. The repair of wounds in the integument of insects. *J. Insect Physiol.* 12, 195–226.
- Lee, H.S., Cho, M.Y., Lee, K.M., Kwon, T.H., Homma, K., Natori, S., Lee, B.L., 1999. The pro-phenoloxidase of coleopteran insect, *Tenebrio molitor*, larvae was activated during cell clump/cell adhesion of insect cellular defense reactions. *FEBS Lett.* 444, 255–259.
- Li, D., Scherfer, C., Korayem, A.M., Zhao, Z., Schmidt, O., Theopold, U., 2002. Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 919–928.
- Mason, H.S., 1955. Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzymol.* 16, 105–184.
- Mason, H.S., 1965. Oxidases. *Ann. Rev. Biochem.* 34, 595–634.

- Michelette, E.R.F., Soares, A.E.E., 1993. Characterization of pre-imaginal developmental stages in Africanized bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 24, 431–440.
- Müller, H.M., Dimopoulos, G., Blass, C., Kafatos, F.C., 1999. A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes. *J. Biol. Chem.* 274, 11727–11735.
- Park, D.S., Schin, W., Kim, M.G., Park, S.S., Lee, W.J., Brey, P.T., Park, H.Y., 1997. Isolation and characterization of the cDNA encoding the prophenoloxidase of fall webworm *Hyphantria cunea*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 983–992.
- Parkinson, N.M., Smith, I.R.L., Weaver, R.J., Edwards, E.P., 2001. A new form of arthropod phenoloxidase is abundant in venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 57–63.
- Pinto, L.Z., Hartfelder, K., Bitondi, M.M., Simões, Z.L., 2002. Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J. Insect Physiol.* 48, 783–790.
- Rembold, H., 1987. Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* 17, 1003–1006.
- Rembold, H., Kramer, J.P., Ulrich, G.M., 1980. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee. *Apis mellifera* L. *Apidologie* 11, 29–38.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Severson, D.W., Williamson, J.L., Aiken, J.M., 1989. Caste-specific transcription in the female honey bee. *Insect Biochem.* 19, 215–220.
- Sritunyalucksana, K., Cerenius, L., Söderhall, K., 1999. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 179–186.
- Sugumaran, M., 1998. Unified mechanism for sclerotization of insect cuticle. *Adv. Insect Physiol.* 27, 229–334.
- Taft, A.S., Chen, C.C., Li, J., Christensen, B.M., 2001. Molecular cloning of two prophenoloxidase genes from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 10, 97–103.
- Tozetto, S.de O., 1997. Hormonelle Steuerung in der Entwicklung von Drohnen (*Apis mellifera carnica*). Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors, Erberhard-Karls Universität Tübingen, 122pp.
- Zufelato, M.S., Bitondi, M.M.G., Simões, Z.L.P., Hartfelder, K., 2000. The juvenile hormone analog pyriproxyfen affects ecdysteroid-dependent cuticle melanization and shifts the pupal ecdysteroid peak in the honey bee (*Apis mellifera*). *Arth. Struct. Dev.* 29, 111–119.
- Zufelato, M.S., Lourenço, A.P., Simões, Z.L.P., Jorge, J.A., Bitondi, M.M.G., 2004. Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1257–1268.

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](#)