

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Genes codificadores de peptídeos relacionados à ecdise e ao
controle da síntese do hormônio juvenil e de ecdisteróides em**
Apis mellifera

FERNANDA ANDRADE SILVA TORRES

RIBEIRÃO PRETO, SP

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

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

**Genes codificadores de peptídeos relacionados à ecdise e ao
controle da síntese do hormônio juvenil e de ecdisteróides em
*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: Fernanda Andrade Silva Torres
Orientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

Ribeirão Preto

-2009-

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

Silva-Torres, Fernanda Andrade

Genes codificadores de peptídeos relacionados à ecdise e ao controle da síntese do hormônio juvenil e de ecdisteróides em *Apis mellifera*. / Fernanda Andrade Silva Torres; orientadora Zilá Luz Paulino Simões – Ribeirão Preto – 2009.

136 p.: 27 il., 30cm.

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

1. *Apis mellifera*. 2. Metamorfose. 3. Allostatina. 4. Bombixina.
5. *Ecdysis triggering hormone*. 6. *Ecdysis-triggering hormone*. 7. Peroxidase cuticular.
8. Ecdisteroidogênese. 9. Hormônio juvenil.

PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2009.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

Ao meu marido **Leandro Torres**, por todo amor, apoio, incentivo e por confiar tanto em meu potencial. Você é o amor da minha vida!

Aos meus pais, **Wladimir e Maria Celeste**, por realmente honrarem o título de pais. Vocês me deram o dom da vida, e são responsáveis por eu ser hoje a pessoa que sou. Muito obrigada pela imensa devoção!

Dedico...

Agradecimentos

À minha orientadora, professora **Dra. Zilá Luz Paulino Simões** pela orientação, pelas oportunidades proporcionadas a mim ao longo desses anos e a confiança em mim depositada, além do carinho demonstrado durante nosso convívio.

À professora **Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi** pelas preciosas dicas dadas em relação ao meu trabalho, e pelo carinho que sempre demonstrou por mim.

Aos professores **Drs. Klaus Hartfelder, Lionel Segui Gonçalves, Ademilson Espencer Soares e David de Jong**, pela harmoniosa convivência. Agradeço especialmente ao **Dr. David de Jong** pela oportunidade do estágio PAE.

À Dra. **Maria Dolors Piulachs** por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório no Instituto de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC), Espanha, por ter compartilhado comigo seus conhecimentos, e por ter confiado em mim.

Ao técnico **Luiz Roberto Aguiar** pelo trabalho como técnico de apiário, essencial para a coleta do material biológico. À **Marcela Laure** pelas dissecções realizadas e pelos agradáveis momentos de conversas. À **Vera Figueiredo** por ser tão prestativa em todos os momentos em que precisei e por ser sempre tão carinhosa.

Aos colegas do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas e do Apilab: **Aline Mackert, Alexandre Cristino, Ana Bonetti, Carlos Lobo, David Santos, Érica Tanaka, Flávia Freitas, Gesline Almeida, Gustavo Rosa, Ivan, Juliana Martins, Karina Guidulgi, Liliane Macedo, Marina Lopes, Mônica Florecki, Moysés Elias, Roberto Barchuk, Rodrigo Dallaqua, Rogério Pereira, Tathyanna Mello, Tiago Franco, Weyder Santana** e muitos outros pela agradável convivência e muitos momentos de risadas e conversas.

Gostaria de agradecer especialmente à **Aline Aleixo, Aline Mackert, Michelle Prioli e Moysés Elias**, pelos experimentos, ajuda e resultados compartilhados, de extrema importância para a elaboração dessa tese. Também agradeço à **Ana Bontorim** pela ajuda com programas de análise de seqüências.

Ao meu braço direito na elaboração desta tese, **Francis Nunes**, que tanto me auxiliou na correção da mesma, dando conselhos, palpites, dicas... Você não tem idéia de como sua ajuda foi importante!

Às minhas colegas de laboratório que se tornaram grandes amigas, **Adriana Mendes do Nascimento e Anete Pedro Lourenço**. Vocês foram fundamentais no

início de minha vida científica, e continuam sendo até hoje, sempre me aconselhando, me ensinando e me incentivando. É ótimo saber que também se tornaram minhas amigas e também parceiras de trabalho! Muito obrigada pelas horas e horas de conversas, desabafos, risos e momentos muito bons!

Em especial, gostaria de agradecer também à **Aline Aleixo, Ana Bontorim, Gisele, Michelle Manfrini e Michelle Prioli**. Vocês, mais do que colegas de trabalho também se tornaram amigas especiais!

Ao pessoal do Instituto de Biologia Molecular de Barcelona (Espanha): **Dr. Xavier, Paula Irlés, Laura Ciudad, Olga e Eva** por tornarem minha estadia em Barcelona um agradável período de minha vida e pela colaboração científica. ¡Gracias!

Ao meu marido **Leandro Torres** e aos meus pais **Wladimir e Maria Celeste**. Não tenho palavras capazes de expressar o quanto sou agradecida a vocês, pessoas fundamentais em minha vida e nesta minha jornada. Muito obrigada por todo o apoio que recebi de vocês em todos os momentos, especialmente durante minha estadia fora do país. Saiba que foram vocês os responsáveis por me darem a força que eu necessitava quando estive do outro lado do oceano. E muito obrigada por terem sido fortes também! Muito obrigada por serem meus fãs incondicionais! Amo vocês!

Aos meus irmãos **Patrícia e Ricardo**, por serem meus exemplos de dedicação aos estudos e ao trabalho e por torcerem por mim sempre! Muito obrigada às famílias que vocês formaram. Às minhas sobrinhas **Luísa, Helena e Pietra** por serem as “florzinhas do meu jardim”, as “princesas da titia”, a alegria de minha vida! Ao **Dado**, por sempre me acordar e me receber com felicidade e sinceridade incontestáveis!

Agradeço, enfim, a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente auxiliaram na execução da minha tese, especialmente aquelas que torceram por mim e estiveram ao meu lado.

Ao **programa de pós-graduação** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Ao **Departamento de Genética**.

A **FAPESP** pelo auxílio financeiro que tornou viável a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	x
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvii
Introdução	1
Abelhas <i>Apis mellifera</i>	2
Metamorfose	5
Alatostatina: relação com HJ e outros aspectos	7
Os ecdisteróides	8
Genes relacionados à ecdise	10
Peroxidase e a esclerotização da cutícula	13
Objetivos	16
Objetivos específicos	17
Material e Métodos	18
A- Material Biológico e Experimentos realizados	19
1- Material biológico	19
2- Aplicação de hormônios	20
3- Ligadura abdominal	21
4- Cultivo <i>in vitro</i> de tegumentos torácicos em meio contendo 20E	22
B- Metodologias	23
1- Extração do RNA total, quantificação e tratamento com DNase	23
2- Síntese de cDNA e amplificação por PCR	23
3- Visualização em gel de agarose e purificação do cDNA do gel	24
4- Clonagem e seqüenciamento	25
4.1- Ligação dos fragmentos em plasmídeos, seguido de clonagem	25
4.2- Digestão para extração do fragmento clonado e preparação para reação de eqüenciamento	25
4.3- Análise das seqüências	26
5- RT-PCR semi-quantitativa	27
5.1- Determinação do número de ciclos (curva de saturação) de cada primer	27
5.2- Densitometria	27
6- PCR em Tempo Real (<i>Real Time PCR</i>)	27
7- Análise Estatística	28

Resultados	29
1- Caracterização da região codificadora dos genes <i>alatostatina (Amel-AS)</i> , <i>bombixina (Amel-bomb)</i> , <i>eclosion hormone (Amel-EH)</i> , <i>ecdysis-triggering hormone (Amel-ETH)</i> e <i>peroxidase (Amel-PXD)</i> de <i>A. mellifera</i>	30
1.1- Seqüência da CDS do gene codificador de <i>Amel-AS</i>	31
1.2- Seqüência da CDS do gene codificador de <i>Amel-bomb</i>	34
1.3- Seqüência da CDS do gene codificador de <i>Amel-EH</i>	37
1.4- Seqüência da CDS do gene codificador de <i>Amel-ETH</i>	40
1.5- Seqüência da CDS do gene codificador de <i>Amel-PXD</i>	43
2- Níveis de transcrição dos genes codificadores de <i>Amel-AS</i> , <i>Amel-bomb</i> , <i>Amel-EH</i> , <i>Amel-ETH</i> e <i>Amel-PXD</i> em <i>A. mellifera</i>	49
2.1- Em diferentes tecidos	49
2.2- Em estágios do desenvolvimento pós-embrionário	51
2.3- Em amostras tratadas com HJ e 20E	59
2.4- Em amostras submetidas à ligadura abdominal.....	67
2.5- Em amostras de tegumentos incubadas com 20E e após lavagem	69
Discussão	72
Conclusão	92
Referências Bibliográficas.....	95
Anexo.....	111

Lista de Abreviaturas e Siglas

20E	20-hidroxiecdisona
aa	Aminácidos
<i>Amel-AS</i>	Alatostatina de <i>Apis mellifera</i>
<i>Amel-bomb</i>	Bombixina de <i>A. mellifera</i>
<i>Amel-EH</i>	<i>Eclosion hormone</i> de <i>A. mellifera</i>
<i>Amel-ETH</i>	<i>Ecdysis-triggering hormone</i> de <i>A. mellifera</i>
<i>Amel-PXD</i>	Peroxidase de <i>A. mellifera</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CA	<i>corpora allata</i>
cDNA	DNA complementar
CDS	<i>Coding sequence</i>
ClustalW	Algoritmo usado para alinhamento múltiplo de seqüências
Ct	<i>Threshold PCR cycle</i>
DEPC	Água tratada com dietilpirocarbonato
ECD(s)	Ecdisteróide(s)
EcoRI	Enzima de restrição de <i>Escherechia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>EH</i>	<i>Eclosion hormone</i>
<i>ETH</i>	<i>Ecdysis-triggering hormone</i>
HJ	Hormônio juvenil
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
OGS	<i>Official Gene Set</i>
pb	pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PTTH	Hormônio protoracicotrópico
RNAi	RNA de interferência
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	Transcriptase reversa PCR
SNC	Sistema Nervoso Central
TBE	solução tampão contendo Tris, ácido bórico e EDTA
UTR	<i>Untranslated region</i>

VM
x-gal

Células ventromedianas do cérebro
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

Lista de Figuras

1.	Diferenciação de castas e sexos numa colônia de <i>Apis mellifera</i>	4
2.	Ontogênese de abelhas operárias.....	6
3.	Modelo proposto para as interações de EH e ETH e seus papéis em desencadear os comportamentos de pré-ecdise e ecdise	12
4.	Representação esquemática do gene <i>alatostatina</i> em <i>A. mellifera</i> (<i>Amel-AS</i>).....	32
5.	Representação esquemática do gene <i>bombixina</i> em <i>A. mellifera</i> (<i>Amel-bomb</i>)	35
6.	Representação esquemática do gene <i>EH</i> em <i>A. mellifera</i> (<i>Amel-EH</i>).....	38
7.	Representação esquemática do gene <i>ETH</i> em <i>A. mellifera</i> (<i>Amel-ETH</i>)	41
8.	Representação esquemática do gene <i>peroxidase</i> em <i>A. mellifera</i> (<i>Amel-PXD</i>).....	44
9.	Níveis de transcritos dos genes <i>alatostatina</i> , <i>bombixina</i> , <i>eclosion hormone (EH)</i> , <i>ecdysis-triggering hormone (ETH)</i> e <i>peroxidase</i> em diferentes tecidos de operárias recém-emergidas de <i>A. mellifera</i>	50
10.	Níveis de transcritos dos genes <i>eclosion hormone (EH)</i> e <i>ecdysis-triggering hormone (ETH)</i> em células Inka do quinto estágio larval de <i>A. mellifera</i>	50
11.	Níveis de transcrição do gene <i>alatostatina</i> no quinto estágio larval (S1 a PP3), nos estágios pupais (Pw a Pdp) e de abelhas recém-emergidas (NE) de operárias de <i>A. mellifera</i>	53
12.	Níveis de transcritos do gene <i>bombixina</i> no quinto estágio larval (PP1 e PP2) e pupal (Pw) de operárias de <i>A. mellifera</i>	54
13.	Níveis de transcritos do gene <i>bombixina</i> em operárias e rainhas de <i>A. mellifera</i>	55
14.	Níveis de transcritos do gene <i>eclosion hormone (EH)</i> nos estágios pupais (Pp, Pdp e Pb) de operárias de <i>A. mellifera</i>	56
15.	Níveis de transcritos do gene <i>ecdysis triggering hormone (ETH)</i> nos estágios pupais (Pdp, Pbl e Pbd) de operárias de <i>A. mellifera</i>	57
16.	Níveis de transcritos do gene <i>peroxidase</i> no quinto estágio larvas (PP3) e nos estágios pupais (de Pw a Pbm) de operárias de <i>A. mellifera</i>	58
17.	Efeitos do tratamento de larvas (L5S1) e pupas (Pb) de <i>A. mellifera</i> com HJ, sobre a expressão do gene <i>alatostatina</i>	60
18.	Efeitos do tratamento de pupas (Pb) de <i>A. mellifera</i> com 20E sobre a expressão do gene <i>alatostatina</i>	61

19. Efeitos do tratamento de larvas (L5S1) e pupas (Pb) de <i>A. mellifera</i> com HJ sobre a expressão do gene <i>bombixina</i>	62
20. Efeitos do tratamento de pupas (Pb) de <i>A. mellifera</i> com 20E sobre a expressão do gene <i>bombixina</i>	63
21. Efeitos do tratamento de larvas (L5S1) de <i>A. mellifera</i> com HJ sobre a expressão dos genes <i>EH</i> e <i>ETH</i>	64
22. Efeitos do tratamento de larvas (L5S1) e pupas (Pb) de <i>A. mellifera</i> com HJ sobre a expressão do gene <i>peroxidase</i>	65
23. Efeitos do tratamento de pupas (Pb) de <i>A. mellifera</i> com 20E sobre a expressão do gene <i>peroxidase</i>	66
24. Níveis de transcritos do gene <i>ecdysis-triggering hormone (ETH)</i> em amostras de pupas de operárias submetidas à ligadura abdominal (1° ao 6° dias após ligadura) e amostras controle	68
25. Níveis de transcritos do gene <i>ecdysis-triggerin hormone (ETH)</i> em amostras de tegumentos de pupas de operárias de <i>A. mellifera</i> incubadas em meio com 0,001µg de 20E+etanol e meio apenas com etanol (controle)	70
26. Níveis de transcritos do gene <i>peroxidase</i> em amostras de tegumentos de pupas de operárias de <i>A. mellifera</i> incubadas em meio com 0,001µg de 20E+etanol e meio apenas com etanol (controle)	71
27. Modelo proposto de regulação dos genes envolvidos na ecdise e na regulação da síntese de HJ e 20E em <i>Apis mellifera</i>	94

Lista de Tabelas

I.	Características das fases do desenvolvimento larval e pupal de operárias de <i>A. mellifera</i>	112
II.	Primers usados para os genes <i>actina</i> , <i>alatostatina</i> e <i>bombixina</i>	113
III.	Primers usados para os genes <i>eclosion hormone</i> , <i>ecdysis-triggering hormone</i> e <i>rp49</i>	114
IV.	Primers usados para o gene <i>peroxidase</i>	115

Resumo

SILVA-TORRES, F.A. **Genes codificadores de peptídeos relacionados à ecdise e ao controle da síntese do hormônio juvenil e de ecdisteróides em *Apis mellifera***. 2009. 136 p. Tese de Doutorado – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

As mudas larvais e a metamorfose tornam possível aos insetos mudar de forma durante o ciclo de vida. Assim, além de permitirem que se adaptem a mudanças ambientais, entrando por exemplo em dormência em diferentes estágios do desenvolvimento, também possibilitam polifenismo, sendo estas manifestações fenotípicas divergentes a partir de um mesmo genótipo. A progressão ordenada das mudas depende dos ecdisteróides (ECD) e do hormônio juvenil (HJ), produtos de glândulas endócrinas protorácicas e retrocerebrais, respectivamente, que, por sua vez, têm a sua atividade controlada por neuropeptídeos. Neste contexto, nosso objetivo principal foi caracterizar a estrutura e expressão dos genes *alatostatina* (*Amel-AS*), inibidor da síntese de HJ; *bombixina* (*Amel-bomb*), potencial estimulador da síntese de 20E (principal ecdisteróide dos insetos); *eclosion hormone* (*Amel-EH*) e *ecdysis-triggering hormone* (*Amel-ETH*), promotores dos comportamentos pré-ecdise e ecdise; e *peroxidase* (*Amel-PXD*), que participa do processo de esclerotização da cutícula nova após o desprendimento da cutícula velha. Além disso, através de estudos de aplicações hormonais de HJ e 20E, ligadura abdominal e cultivo de tegumentos com 20E *in vitro*, comprovamos as ações destes hormônios sobre os genes estudados.

A partir da seqüência do genoma de *A. mellifera* (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) foi realizado o seqüenciamento dos cDNAs referentes aos genes em estudo, com exceção de *Amel-ETH*, que já havia sido seqüenciado e depositado no GenBank (NM_001142607). A estrutura e arquitetura dos genes foram caracterizadas, e com exceção de *Amel-ETH* e *Amel-PXD*, todos são formados por 2 *exons* e 1 *intron*. Os tamanhos das seqüências de aminoácidos deduzidas variam de 73 aminoácidos para a *bombixina* até 678 aminoácidos para a *peroxidase*. Dos motivos e domínios característicos destes peptídeos foram localizados os motivos YSFGL e YHFGL, que classificam a *alatostatina* de *A. mellifera* como do tipo-A; os domínios: *insulin/insulin-like growth factor/relaxin* (pfamcl02453) na seqüência da *bombixina*; *eclosion hormone*

(pfam04736) na seqüência de *eclosion hormone*; e *animal peroxidase* (pfam03098) na seqüência da *peroxidase*.

As taxas de transcrição dos genes aqui descritos foram analisados em cérebro, ovário e corpo gorduroso de operárias recém-nascidas. Transcritos de *Amel-AS* foram identificados principalmente no cérebro e menos intensamente nos ovários. Transcritos de *Amel-EH* foram localizados somente no cérebro. Transcritos de *Amel-bomb* e *Amel-PXD* foram encontrados em todos os tecidos, embora em níveis baixos no caso de *Amel-bomb*. Transcritos de *Amel-ETH* não foram encontrados nesses tecidos. Analisamos então cDNAs de células Inka de larvas e encontramos transcritos de *Amel-ETH*.

Os níveis de transcritos dos genes estudados são modulados durante a metamorfose. A presença de transcritos de *Amel-AS* está restrita a fase pupal, onde há baixos títulos de HJ. Transcritos de *Amel-bomb* são encontrados em estágios onde há altos títulos de 20E, próximos à pupação. Transcritos de *Amel-EH*, *Amel-ETH* e *Amel-PXD* são identificados nas fases em que os títulos de 20E estão em declínio. Com a finalidade de investigar se esses genes são regulados por hormônios, foram realizados experimentos de manipulação hormonal. HJ foi aplicado em larvas e pupas, 20E foi injetado em pupas e usado para cultivo de tegumentos *in vitro*. Também foi realizado o experimento de ligadura abdominal em pupas. Os resultados indicam que 20E estimula a transcrição de *Amel-AS*, e inibe a transcrição de *Amel-bomb*. Um pulso de 20E e seu posterior declínio são necessários para a transcrição de *Amel-EH*, *Amel-ETH* e *Amel-PXD*. Já o HJ estimula a transcrição de *Amel-ETH* e inibe a de *Amel-EH*.

Em conjunto os resultados mostram que as estruturas dos genes são conservadas de modo geral, se comparadas às mesmas seqüências em outros insetos. Os perfis de expressão dos genes ao longo do desenvolvimento são compatíveis com os de outros insetos já descritos. Os genes estudados são modulados principalmente pelos títulos de 20E, e somente *Amel-EH* e *Amel-ETH* também pelos títulos de HJ. Estudos destes genes em abelhas devem contribuir para o conhecimento da metamorfose dos insetos sociais.

Palavras-chave: *Apis mellifera*. Metamorfose. Allostatina. Bombixina. *Eclosion hormone*. *Ecdysis-triggering hormone*. Peroxidase cuticular. Ecdisteroidogênese. Hormônio Juvenil.

Abstract

SILVA-TORRES, F.A. **Genes codifying for ecdysis related peptides and for the control of JH and 20E synthesis in *Apis mellifera***. 2009. 136 pp. PhD. Thesis – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The larval molts and metamorphosis enable insects to change form during their life cycles. This permits them to adapt to environmental changes, for example by entering into dormancy states during different stages of their life cycles, as well as to express polyphenisms, that is different phenotypes as manifestations of the same genotype. The coordinated progression of molts depends on ecdysteroids (ECD) and juvenile hormone (JH) produced by the prothoracic and by retrocerebral glands, respectively. The activity of these glands themselves is controlled by neuropeptides.

In this context our main objective was to characterize the gene structure and expression of *allatostatin* (*Amel-AS*), a JH biosynthesis inhibitor; *bombyxin* (*Amel-bomb*), a potential 20E (the main insect ecdysteroid) biosynthesis stimulator; *eclosion hormone* (*Amel-EH*) and *ecdysis-triggering hormone* (*Amel-ETH*), both trigger the pre-ecdysis and ecdysis behaviors; and *peroxidase* (*Amel-PXD*), which participates in the sclerotization process from the new cuticle, after the shedding of the old one. Additionally, we investigated the actions of these hormones on the above listed genes by JH and 20E treatments studies, abdominal ligature and *in vitro* incubation of integument with 20E.

Based on the *A. mellifera* genome sequence (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) we sequenced the cDNAs of these genes, with the exception of *Amel-ETH* that had been already sequenced and deposited in GenBank (NM_001142607). The structure and architecture of these genes was characterized, showing that, with the exception of *Amel-ETH* and *Amel-PXD*, all are composed of two exons and one intron. The deduced amino acid sequences varied in size between 73 amino acids for bombyxin and 678 amino acids for peroxidase.

We located the following characteristic motifs and domains: the YSFGL and YHFGL motifs which are typical for the type-A allatostatins; and the *insulin/insulin-like growth factor/relaxin* (pfamcl02453) in the *bombyxin* sequence; *eclosion hormone*

(pfam04736) in the *eclosion hormone* sequence; and *animal peroxidase* (pfam03098) in the *peroxidase* sequence.

The transcription rates of these genes were analyzed for brain, ovary and fat body tissue of newly-emerged workers. *Amel-AS* transcripts were identified mainly in the brain and only to a lesser extent in the ovaries. *Amel-EH* transcripts were detected in the brain only. *Amel-bomb* and *Amel-PXD* were found in all tissues, although the levels for *Amel-bomb* were rather low. *Amel-ETH* transcripts were detected exclusively in the Inka cells of larvae.

The transcript levels of the studied genes vary during metamorphosis. The presence of *Amel-AS* transcripts was restricted to the pupal stages, where JH titers are basal. *Amel-bomb* transcripts were found shortly before pupation, when 20E titers are high. *Amel-EH*, *Amel-ETH* and *Amel-PXD* were detected in stages where the 20E titers are declining. With the purpose of investigating whether and how these genes may be regulated, we performed hormone manipulation experiments by topically applying JH to larvae and pupae, injecting 20E into pupae, and by culturing integument in vitro in the presence of 20E. In addition, we performed abdominal ligation experiments in pupae. The results indicate that 20E may stimulate *Amel-AS* and inhibit *Amel-bomb* transcription. A 20E peak and its posterior decline seem to be necessary for *Amel-EH*, *Amel-ETH* and *Amel-PXD* transcription. JH apparently stimulates *Amel-ETH* transcription and inhibits *Amel-EH* transcription.

Taken together, the results show that the genes are conserved structurally in a general manner when compared to their orthologs in other insects. The developmental expression profile of these genes are in accordance with t. The studied genes are modulated primarily by 20E, and only *Amel-EH* and *Amel-ETH* are also affected by the JH titers as well. Studies of these genes in honeybees may, thus, contribute to the knowledge on metamorphosis in social insects, especially on how polyphenisms are generated.

Key-words: *Apis mellifera*. Metamorphosis. Allatostatin. Bombyxin. Eclosion hormone. Ecdysis-triggering hormone. Cuticular peroxidase. Ecdysteroidogenesis. Juvenile hormone.

Introdução

Abelhas *Apis mellifera*

O gênero *Apis* é nativo da Eurásia e África. A espécie mais conhecida é a abelha melífera comum, *Apis mellifera*, que foi introduzida na maior parte do mundo como produtora de mel e cera, bem como pela sua atividade de polinizadora (Michener, 1974). No Brasil, primeiramente ocorreu a introdução da subespécie *Apis mellifera mellifera*, original da Alemanha, em 1839, na região Sul. Em 1870 foi trazida também para o Sul do país, a subespécie *A. mellifera ligustica*, original da Itália. Mais tarde, em 1956, foi trazida a abelha africana *A. mellifera scutellata*. A abelha africana, na natureza, se reproduziu com as abelhas européias, formando um híbrido, que denominamos abelha africanizada, hoje encontrada em todo o país e em grande parte do continente americano (Lionel Segui Gonçalves, comunicação pessoal).

As abelhas desta espécie vivem em colônias compostas de milhares de indivíduos e pertencem a um grupo altamente social dentre os Hymenoptera (Winston, 1987), caracterizado pela divisão de trabalho, diferenciação de castas e sobreposição de gerações. Em uma colônia de *A. mellifera* são encontrados três tipos de indivíduos: os zangões, a rainha e as operárias, os quais exercem papéis distintos nessa sociedade, cuja determinação de sexo ocorre por haplodiploidia (Figura 1). Os zangões, que se desenvolvem a partir de ovos não fertilizados, são os machos aos quais compete principalmente a atividade reprodutiva. Dentre as fêmeas, que se desenvolvem a partir de ovos fertilizados, existe duas castas: rainha e operária, cuja determinação depende do tipo de alimentação recebido durante a fase larval. As larvas de rainhas são alimentadas apenas com geléia real (mistura de secreções glandulares), enquanto que as larvas de operárias são alimentadas com geléia real até o terceiro estágio larval, passando a seguir para uma mistura de secreções glandulares suplementada com pólen e néctar (Rembold,

1987a). Essa diferença na alimentação larval ocasiona diferenças nos títulos de hormônio juvenil (HJ), um dos principais hormônios dos insetos, entre as duas castas (Rembold, 1987b). As diferenças que a partir deste momento se estabelecem entre as rainhas e as operárias abrangem a morfologia, a fisiologia e o comportamento (Evans & Wheeler, 2000).

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 através dos feromônios, sintetizados por glândulas especiais. Esse controle exercido por sinais químicos, também influencia na fisiologia das operárias, fazendo com que permaneçam estéreis (Michener, 1974). As operárias realizam todo o trabalho de manutenção da colméia, incluindo alimentação da cria e da rainha, construção de favos, coleta e processamento do alimento, defesa e limpeza da colônia e muitas outras tarefas. A divisão do trabalho entre as operárias está relacionada com a idade das mesmas e compreende tarefas intra e extra nidais (Winston, 1992).

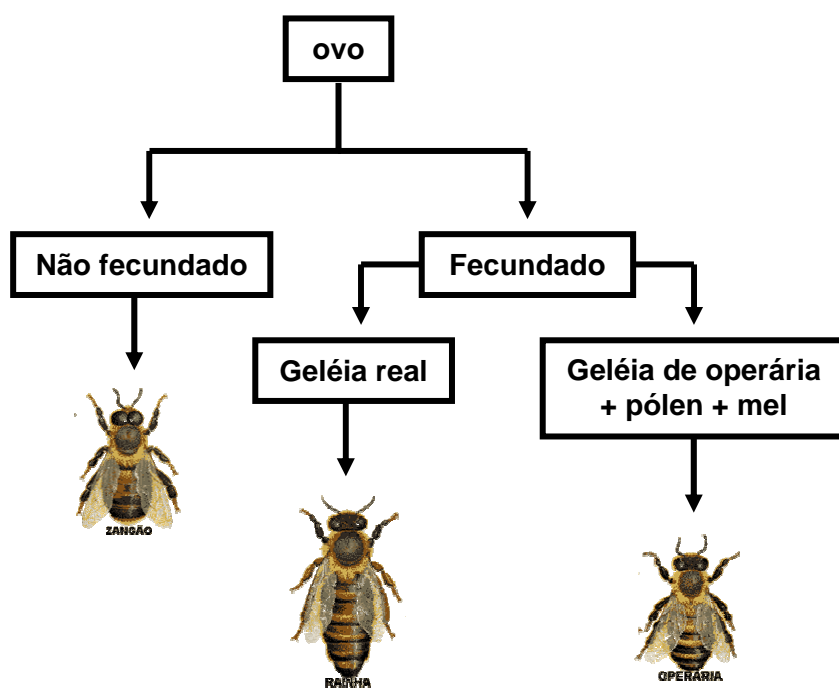


Figura 1 – Diferenciação de castas e sexos numa colônia de *A. mellifera* (modificado de Winston 2003).

Metamorfose

O fenômeno da metamorfose consiste em uma drástica reorganização do desenvolvimento, neste uma forma larval imatura se transforma em uma adulta (Gilbert, 1996). A larva possui características únicas muito diferentes das do adulto, frequentemente assumindo formas especializadas para o exercício de alguma função, como o crescimento. Durante a metamorfose, os processos do desenvolvimento são modulados por hormônios específicos, como conseqüência, o organismo altera sua forma, fisiologia e comportamento para se preparar para um novo modo de existência (Gilbert, 2006).

O processo metamórfico nos insetos ocorre dentro do contexto dos ciclos de crescimento caracterizados por mudas, ou seja, substituição periódica da velha cutícula por uma nova, recém sintetizada. Há três condições metamórficas nos insetos: ametábola, hemimetábola e holometábola (Nijhout, 1994). As abelhas possuem a condição holometábola. Como todos os insetos holometábolos, padrões corporais distintos - embrionário, larval, pupal e adulto – emergem sucessivamente durante a ontogênese da abelha (Figura 2) (Michelette & Soares, 1993).

O ciclo de muda e a metamorfose são processos ligados ao crescimento e nutrição. Um conjunto de variáveis fisiológicas e ambientais afeta esses processos. O controle e a coordenação desses episódios de rápida mudança no desenvolvimento são feitos por um conjunto de hormônios, cujos principais são o HJ e os ecdisteróides (ECD) (Nijhout, 1994).

Desenvolvimento de abelhas operárias

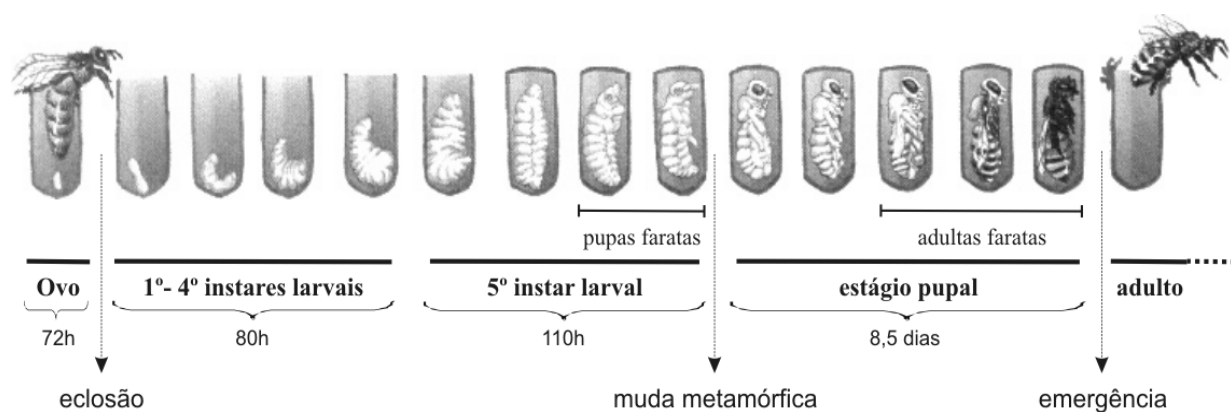


Figura 2 – Ontogênese de abelhas operárias. Eclosão da larva, muda metamórfica e emergência da abelha adulta são eventos que indicam a mudança de uma etapa para a outra no decorrer do tempo. Esquema redesenhado a partir de Winston (1987). A duração das etapas foi obtida de Michelette e Soares (1993).

Alatostatina: relação com HJ e outros aspectos

O HJ é provavelmente o hormônio mais versátil do reino animal. Isto ocorre devido a suas funções pleiotrópicas: orquestrando a metamorfose junto com o hormônio indutor da muda, ECD; regulando a reprodução e gerando polimorfismos sofisticados em insetos sociais (Hartfelder, 2000). O HJ governa a maioria dos aspectos da integração dos insetos com o ecossistema e afeta parâmetros decisivos da sua história de vida. Visões emergentes a partir de estudos em insetos sociais indicam que o papel do HJ está profundamente bem estabelecido em praticamente todos os aspectos da vida social, afetando a geração não apenas de diferentes morfos, mas também na organização neural e resultando numa plasticidade comportamental (Hartfelder, 2000). O sítio praticamente exclusivo de síntese do HJ são os *corpora allata* (CA), um par de glândulas localizadas no complexo retrocerebral ligado ao cérebro via dois ou três pares de nervos (Hartfelder, 2000).

O controle dos CA via nervos descendentes foi proposto e os principais agentes, os neuropeptídeos alatostáticos (inibidores da síntese de HJ), foram identificados há 20 anos primeiramente na barata *Diploptera punctata* (Woodhead *et al.*, 1989).

Neuropeptídeos com atividade alatostática foram isolados e caracterizados de uma variedade de espécies de insetos. Esses peptídeos podem ser classificados em três diferentes famílias peptídicas, baseado na similaridade de suas seqüências cujos membros freqüentemente possuem funções similares (Audsley *et al.*, 2008): 1- Tipo-A, a superfamília YXFGL-amida alatostatina (alatostatinas das baratas); 2- Tipo-B, as W(X₆)W-amida alatostatinas (alatostatinas dos grilos); e 3- Tipo-C, as alatostatinas de Lepidoptera (*Manduca sexta*).

Além de inibir a síntese de HJ, as alostatinas têm função pleiotrópica e são encontradas em diversos tecidos além do cérebro, como intestino e sistema muscular, por exemplo (Audsley *et al.*, 2008).

Os Ecdisteróides

O hormônio esteróide polihidroxilado, 20-hidroxicdisona (20E) é o principal fator regulador da muda e metamorfose. 20E é produzido a partir da ecdisona. O hormônio protoracicotrópico (PTTH), um neuropeptídeo do cérebro, regula a fisiologia da glândula protorácica, onde 20E é produzido (Rybczynski, 2005).

O PTTH é um hormônio que está caracterizado completamente apenas em poucas espécies de Lepidoptera (Wei *et al.*, 2005; Sehnal *et al.*, 2002; Sauman & Reppert, 1996; Kawakami *et al.*, 1990). Embora métodos de biologia molecular tenham sido empregados com êxito para clonar o cDNA relativo ao gene codificador do PTTH em inúmeros Lepidoptera, o mesmo sucesso não ocorreu na identificação desse gene em outras ordens de insetos. Isto pode indicar que “PTTHs” com diferentes propriedades estruturais ainda precisam ser identificados (Gäde & Hoffmann, 2005).

Duas espécies de Lepidoptera, *Bombyx mori* e *M. sexta*, foram as primeiras espécies modelo no estudo da endocrinologia da muda e metamorfose dos insetos. Evidências sugeriam que, nestas espécies, a atividade PTTH era exercida por duas proteínas de pesos moleculares distintos, um de 4-7 kDa (PTTH pequeno) e o segundo de 20-30 kDa (PTTH grande). O primeiro trabalho com extrato de cérebro de *B. mori* utilizou um ensaio cruzado para determinar a atividade do PTTH. Esse ensaio utilizou pupas de *Samia cynthia ricini* descerebrada, os resultados sugeriram que o PTTH de *B. mori* mais efetivo era o 4K-PTTH, a proteína menor. Porém, o mesmo ensaio feito em

pupas de *B. mori* sem cérebros, mostrou que o PTTH efetivo nesta espécie é a molécula maior, enquanto que o PTTH pequeno não foi efetivo em doses fisiológicas (Ishizaki *et al.*, 1983a; Ishizaki *et al.*, 1983b). Este resultado foi confirmado quando os PTTHs pequeno e grande foram usados para estudo de seus efeitos ecdisteroidogênicos *in vitro* em glândulas protorácicas de *B. mori* (Kiriishi *et al.*, 1992). A molécula maior de PTTH é denominada, em publicações recentes de 22K-PTTH, ou simplesmente PTTH. A molécula menor é denominada bombixina (Rybczynski, 2005).

Em todos os casos em que já foi determinada a seqüência do cDNA da bombixina, os peptídeos maduros deduzidos da análise desses cDNAs consistem de cadeias A e B cujas seqüências mostram homologia com as da insulina, e suas moléculas precursoras exibem a mesma organização do domínio da pré-proinsulina. Os padrões gerais dos peptídeos insulina-relacionados dos não vertebrados e seus genes são, portanto, bem conservados. Mas, a seqüência de aminoácidos e as estruturas gênicas desses peptídeos mostram variedade maior do que as insulinas dos vertebrados (Kimura-Kawakami *et al.*, 1992).

A bombixina tem um efeito semelhante ao PTTH quando administrada ao Lepidoptera *S. cynthia*. O desenvolvimento adulto, suspenso nas pupas de *S. cynthia* por remoção do cérebro, pode ser retomado por injeção de bombixina (Ishizaki & Ichikawa, 1967) através da ação trófica desta proteína nas glândulas protorácicas que dirigem a síntese e liberação de ecdisona (Nagasawa *et al.*, 1984). Em *B. mori* a quantidade de bombixina no cérebro aumenta significativamente perto da pupação, onde há um pico nos títulos de 20E (Adachi *et al.*, 1989). Estes dados tornam a bombixina interessante no estudo da regulação de 20E.

Genes relacionados à ecdise

O sucesso da ecdise depende de uma expressão coordenada de genes, controlada por ECDs e HJ responsáveis pela formação da nova cutícula e outros tecidos apropriados ao próximo estágio do ciclo de vida. Os ECDs disparam uma cascata de sinalização peptídica que regula a seqüência da ecdise ao fim da muda. Níveis elevados de ECDs trazem um fim a intermuda e o início da muda associada com a produção da nova cutícula (Zitnan & Adams, 2005). A seqüência de eventos fisiológicos e comportamentais que precedem a ecdise é estereotipada, e está sob o controle de esteróides e hormônios peptídicos (Park *et al.*, 2002). Ao final de cada ciclo de muda, os insetos realizam comportamentos estereotipados espécie-específicos para liberar a cutícula do estágio anterior num processo denominado ecdise. Um outro termo, eclosão, é reservado para a ecdise do adulto (Mesce & Fahrbach, 2002).

A seqüência da ecdise é constituída pelas seguintes fases:

- 1 – Alimentação e crescimento: se inicia logo após a ecdise do estágio anterior;
- 2 – Início da muda induzido por aumento nos níveis de ECDs junto com HJ para regular a expressão gênica importante para o desenvolvimento do novo fenótipo;
- 3 – A ecdise propriamente dita, regulada por diminuição dos níveis de esteróides e secreção de hormônios peptídicos;
- 4 – Término da muda durante processos pós-ecdise, importante para a definição da forma do novo estágio.

A seqüência da ecdise é regulada por uma cascata de sinalizações peptídicas, entre estas, *Eclosion hormone (EH)*, um peptídeo que induz a eclosão, produzido nas células ventro-medianas do cérebro (VM) e *Ecdysis-triggering hormone (ETH)* secretado pelo sistema endócrino epitraqueal e pelas células Inka. O *ETH* age

diretamente no sistema nervoso central (SNC) e ativa pequenos circuitos neuronais da pré-ecdise e ecdise. Outros neuropeptídeos, como corazonina, FLRFamidas e peptídeos mioinibitórios estão envolvidos na coordenação da seqüência da ecdise (Zitnan & Adams, 2005).

Para a ecdise ter sucesso, ela deve ocorrer no momento apropriado relativo à digestão da cutícula velha regulada pelo ECD que ocorre no final da muda. Uma vez que a ecdise se iniciou, entretanto, não pode ser interrompida ou reiniciada (Ewer *et al.*, 1997)

O *EH* foi o primeiro peptídeo identificado como um iniciador da ecdise (Zitnan & Adams, 2005). Funciona tanto como um hormônio circulatório quanto como um neuromodulador dentro do SNC. *EH* estimula a liberação de *ETH* pelas células Inka (Kingan *et al.*, 1997). *ETH* age diretamente no SNC iniciando uma cascata de neuropeptídeos que regula passos seqüenciais na ecdise, incluindo a liberação de *EH* tanto na hemolinfa quanto no SNC (Figura 3) (Zitnan & Adams, 2005).

As células Inka liberam seu conteúdo hormonal na hemolinfa, e assim é iniciada e regulada a ecdise da cutícula velha. Nos insetos holometábolos as células Inka persistem no adulto e continuam a produzir *ETH* e outros hormônios relacionados. A via de sinalização de *ETH* é conservada em diferentes grupos de insetos e talvez em todos os insetos (Zitnan & Adams, 2005).

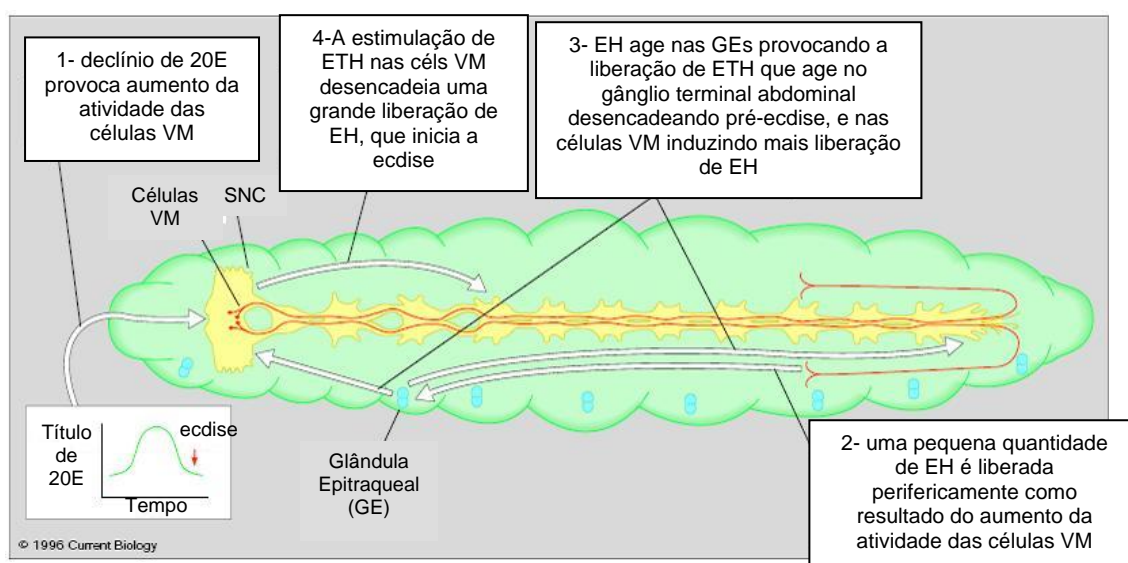


Figura 3 – Modelo proposto para as interações de EH e ETH e seus papéis em desencadear os comportamentos de pré-ecdise e ecdise. (modificado de: Hesterlee & Morton, 1996).

Peroxidase e a esclerotização da cutícula

A cutícula cobre o corpo inteiro dos insetos como uma barreira efetiva entre o animal e o meio externo; fornece proteção contra dessecação, microorganismos e predadores, e como um exoesqueleto funciona como locais de ligação aos músculos. A esclerotização da cutícula é um processo químico no qual certas regiões da cutícula do inseto são irreversivelmente transformadas de um material flexível em uma estrutura mais rígida, cuja matriz de proteínas é, até certo ponto, indeformável e resistente à degradação enzimática (Andersen, SO, 2005).

Durante o processo de esclerotização, ocorre a oxidação de catecol para *o*-quinona. A existência de várias rotas diferentes para este processo pode ser vantajosa para o inseto, especialmente se elas podem ser reguladas independentemente em várias regiões do corpo. A atividade da peroxidase pode fornecer uma rota alternativa. A atividade peroxidase já foi demonstrada na cutícula, além de intracelularmente em outros tipos celulares (Andersen, 2005). A distribuição de uma peroxidase associada com a formação de uma cutícula rígida foi estudada na larva em desenvolvimento de *Calpodex ethlius* (Lepidoptera). A peroxidase ocorre em grânulos de vários tipos celulares. Foi encontrada também nas vesículas secretoras que liberam seu conteúdo para produzir a cutícula na superfície apical (Locke, 1969).

A enzima peroxidase catalisa a oxidação de resíduos de tirosina das proteínas em radicais tirosina, que interagem para formar ditirosina, levando, com isso, à ligação cruzada de proteínas (Heinecke *et al.*, 1993). A peroxidase foi encontrada catalisando a formação de ligações cruzadas de tirosina em nematódios como *Gordius villoti* (Brivio *et al.*, 2000) e *Brugia pahangi* (Sayers *et al.*, 1984). Além disso, foi observada que a peroxidase catalisa essas ligações *in vitro* na presença de peróxido de hidrogênio em

Caenorhabditis elegans (Lassandro *et al.*, 1994). O uso de RNAi para estudo da função de uma peroxidase expressa nas células abaixo da cutícula de larvas de *C. elegans* resultou em anormalidade grosseira na cutícula, devido a desestabilização da matriz celular cuticular (Edens *et al.*, 2001).

Além disso, as quinonas presentes no processo de esclerotização, e seus derivados passam por reações redox e geram espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS), potencialmente citotóxicos para tecidos endógenos (Ottaviani, *et al.*, 2002). Evidências sugerem que ROS causa dano a todas grandes classes de macromoléculas biológicas, levando à oxidação protéica, peroxidação lipídica, modificação de base de DNA e quebras nas fitas de DNA (Limauro *et al.*, 2006). Como proteção contra ROS tóxico, organismos aeróbicos desenvolveram um número de sistemas antioxidantes que funcionam como mecanismos de proteção, especialmente superóxido dismutases, catalases, peroxidases, tioredoxina e glutathione (Storz & Imlay, 1999).

O estudo de uma peroxidase relacionada à cutícula e conseqüentemente ao processo de esclerotização é importante como complemento ao estudo dos processos de ecdise de insetos.

Assim, com base no genoma de *A. mellifera* (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006), foi possível a obtenção dos cDNAs totais dos genes *alatostatina*, *bombixina*, *eclosion hormone* e seqüenciamento parcial do cDNA de uma *peroxidase* com papel na esclerotização da cutícula da abelha. O gene *ecdysis-triggering hormone* já se encontra depositado no GenBank (NM_001142607). Destes genes, foi caracterizada a expressão em diferentes tecidos e ao longo do desenvolvimento de operárias, no caso de *bombixina*, em rainhas também, bem como, foi investigada uma possível modulação hormonal sobre cada um deles. Dessa forma, pudemos constatar

que todos os genes estudados estão relacionados aos processos de muda e metamorfose. Alguns desses genes nunca haviam sido estudados em abelhas anteriormente, como *EH* e *ETH*, genes chave na indução dos processos de pré-ecdise e ecdise. Os demais genes já haviam sido estudados, mas não com a abordagem aqui mostrada. O presente estudo pretende esclarecer pontos importantes do intrincado processo de desenvolvimento de *A. mellifera*. Procuramos analisar uma possível relação entre os genes estudados, e estes com os principais hormônios dos insetos, HJ e 20E. A caracterização dos genes, tanto molecular quanto de transcrição encontra-se bem definida, e fornece dados para estudos posteriores de caracterização morfológica e protéica, bem como abre novas possibilidades, tais como, outros estudo funcionais, com o auxílio de ferramentas como RNAi.

Objetivos

Objetivo Geral

O presente trabalho visou contribuir para o entendimento do processo de ecdise de *A. mellifera*. Para isto a expressão dos genes *alatostatina*, *bombixina*, *eclosion hormone*, *ecdysis-triggering hormone* e *peroxidase* foi estudada e caracterizada em relação aos processos de muda e metamorfose e em relação aos títulos de hormônio juvenil e ecdisteróide com a finalidade de verificar possível regulação hormonal das atividades desses genes.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho consistiram em:

- I- Clonar e seqüenciar os cDNAs dos gene codificadores de *alatostatina*, *bombixina*, *eclosion hormone* e *peroxidase*;
- II- Verificar a presença de transcritos destes genes e de *ecdysis-triggering hormone* em diferentes tecidos de operárias e atribuir possíveis funções a eles;
- III- Verificar os níveis de transcritos destes genes em algumas fases do desenvolvimento larval e pupal importantes para o entendimento da ecdise;
- IV- Relacionar os perfis de expressão desses genes aos títulos endógenos de HJ e 20E na hemolinfa de operárias;
- V- Testar se a expressão desses genes é regulada por HJ através de aplicação hormonal em larvas e pupas. Testar se a expressão desses genes é regulada por 20E através de experimentos de aplicação hormonal em pupas, ligadura abdominal e cultivo de tegumentos *in vitro*;
- VI- Elaborar um modelo de regulação entre os genes estudados e entre os genes e os hormônios HJ e 20E em *A. mellifera*.

Material e Métodos

A. Material Biológico e Experimentos realizados

1. Material Biológico

Abelhas africanizadas *A. mellifera* foram obtidas de colônias mantidas no apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Dessas colônias foram coletadas abelhas operárias de diversas idades, bem como algumas rainhas, identificadas de acordo com padrões pré-estabelecidos por Michelette & Soares, 1993 e Rembold *et al.*, 1980 (Tabela I - Anexo). Dessa forma, as larvas foram identificadas de acordo com o nível de alimentação visível no intestino e as pupas de acordo com a pigmentação dos olhos e da cutícula torácica. O quinto estágio larval (L5) é o mais longo e é subdividido em três fases: de alimentação (L5F1, 2, e 3), de tecelagem de casulo (L5S1, 2 e 3) e .pré-pupal (PP1, 2 e 3), que representa o estágio de transição entre o estágio larval e o pupal.

Para estudo da expressão dos genes de interesse ao longo do desenvolvimento por RT-PCR semi-quantitativa foram usados os corpos inteiros de operárias em algumas das fases larvais de quinto estágio, fases pupais e recém-emergidas (NE), de *A. mellifera*. Para estudo de expressão do gene *bombixina* em algumas fases larvais e pupais de operárias e rainhas por *Real Time* PCR, foram usados os corpos inteiros das abelhas. A escolha das fases para o estudo de níveis de transcrição de cada gene foi feita baseada na provável função de cada um, e, portanto no momento mais adequado para o estudo desta função.

Ovários, corpos gordurosos e cérebros de abelhas NE de operárias e células Inka de larvas de quinto estágio de rainha foram dissecados para estudo da expressão dos genes de interesse por RT-PCR semi-quantitativa.

Para verificar possível ação do hormônio juvenil sobre os genes estudados foi realizada aplicação tópica de HJ-III em larvas e pupas de operárias. Com o mesmo objetivo foi realizada injeção de 20E em pupas de operárias e um experimento clássico de ligadura abdominal e cultivo de células.

2. Aplicação de hormônios

Para análise da modulação hormonal dos genes em estudo, operárias na fase larval L5S1 receberam aplicação tópica de 10 µg de HJ-III (Fluka, diluído em 1 µl de acetona). Os controles foram topicamente tratados com 1 µl de acetona, ou não receberam tratamento. As larvas tratadas e não-tratadas foram mantidas em uma estufa a 34°C e 80% de umidade relativa por 24 horas (h). Após esse período, o que corresponde ainda ao quinto estágio larval, o intestino foi removido e o RNA foi extraído seguindo o protocolo do reagente TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies).

Pupas de olho marrom (Pb) de operárias também receberam aplicação tópica de HJ ou injeção de 20E (Fluka), e os níveis de transcrição dos genes *alatoestatina*, *bombixina* e *peroxidase* foram analisados no corpo gorduroso. Todos os grupos, controles e tratados, foram mantidos em estufa (34°C, 80% de umidade relativa, condições similares às verificadas nas colméias) por 12 e 24 h após os tratamentos. Esta fase foi escolhida, pois nela as concentrações dos ecdisteróides caem, após um pico elevado em pupas de olho rosa (Pp). Nesta fase os títulos de HJ são basais. Assim procedendo, poderíamos verificar se a manutenção dos altos títulos destes hormônios teria efeito sobre expressão dos genes mencionados acima. Neste caso pupas receberam uma injeção intra-abdominal contendo 5µg de 20E, a forma ativa deste hormônio em abelhas, diluída em 2µl de etanol+ringer. Outro grupo de pupas recebeu topicamente

10µg de HJ-III (a forma encontrada em himenópteros) diluído em 2µl de acetona. Os grupo controles receberam cada um os respectivos volumes apenas dos solventes. A quantidade de hormônio utilizada foi determinada com base em experimentos realizados anteriormente por Barchuk et al. (2004). O nível de transcritos foi analisado através de *Real Time* PCR. Foram utilizados *primers* para o gene da proteína ribossomal rp49 (AF441189) como controle endógeno, adequado para estudos em que manipulações hormonais são realizadas (Lourenço *et al.*, 2008). O corpo gorduroso foi coletado a partir de incisão longitudinal no abdômen das pupas, em seguida colocados em placas de cultivo contendo solução salina (0,9% v/v) sob agitação. As solução contendo corpo gorduroso de pupas de operárias foram submetidas a centrifugação leve (3000 x g – 1 minuto (min)) e os *pellets* formados foram utilizados para extração do RNA e para posterior *Real Time* PCR.

3. Ligadura Abdominal

Em uma série de três experimentos independentes, um total de 240 pupas de operárias foram submetidas à ligadura abdominal. Para tanto, foram apoiadas ventralmente em suportes plásticos individuais e atadas por elástico ortodôntico no limite das regiões torácica e abdominal. Tal procedimento objetivou impedir a passagem de ecdisteróides endógenos provenientes das glândulas protorácicas, situadas próximo à cabeça, para o abdome. Um grupo igualmente representado de pupas controle não sofreu nenhum tipo de intervenção. Todos os indivíduos foram mantidos em estufa a 34°C e 80% de umidade relativa para que o desenvolvimento pudesse ser acompanhado.

Indivíduos ligados e controles foram selecionados diariamente. Alguns tiveram as regiões torácica e abdominal separadas e homogeneizadas individualmente em TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies) para posterior extração do RNA.

Como as células Inka estão anexas às traquéias e estas estão presentes no abdômen das abelhas, analisamos os níveis de transcritos do gene *ETH* nos grupos controle e tratado através de RT-PCR semi-quantitativa, seguida de visualização em gel de agarose 1%, e densitometria, usando como gene endógeno a *actina*.

4. Cultivo *in vitro* de tegumentos torácicos em meio contendo 20E

Para a incubação *in vitro*, tegumentos torácicos de pupas Pw, livres do corpo gorduroso, foram coletados e dissecados em solução de Ringer, em uma capela esterilizada, com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Conjuntos de cinco tegumentos foram incubados em 1 ml de meio de cultivo próprio para abelhas (Rachinsky & Hartfelder, 1998), contendo ou não 20E (0,001µg) dissolvido em etanol absoluto (Merck). Para otimizar a solubilização de 20E, o meio contendo o hormônio foi agitado durante 12 min. As alíquotas de meio de cultivo controle, contendo ou não etanol, foram também agitadas. Na condição de solvente de 20E, ou quando utilizados separadamente, etanol nunca excedeu 0,5% do volume total do meio de cultivo. Os tegumentos foram submetidos à ação contínua ou a pulsos de 20E (incubação em meio contendo o hormônio com subsequente lavagem do tegumento em meio sem hormônio) durante diferentes períodos de tempo: 6 h, 20 h e 30 h de incubação em meio com 20E; 6 h de incubação em meio com 20E seguido de 15 h de incubação em meio livre. Após o cultivo, os tegumentos foram transferidos para tubos contendo 1 ml de TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies) e armazenados a -80°C.

B. Metodologias

1. Extração do RNA total, quantificação e tratamento com DNase

O RNA total foi isolado usando TRIzol® Reagent (Invitrogen, Life Technologies) conforme as instruções do fabricante. A pureza e a quantidade de RNA total foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000). Para estimar a concentração do RNA, considera-se que uma unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 40 µg/ml de RNA (Sambrook *et al.*, 1989). O grau de pureza foi estimado através da razão entre os valores das leituras a 260 nm e a 280 nm. Os resultados desta relação entre 1,8 – 2,0 indicam que o extrato obtido é puro. Foi utilizado de 1 a 2,5 µg de RNA para a construção do cDNA. A este volume foi adicionado uma quantidade de água DEPC (livre de RNase) perfazendo um volume total de 9 µl. Essas amostras foram tratadas com 1µl de DNase (3U) por 40 min a 37°C e 15 min a 70°C para inativação da enzima. Este tratamento é importante para a degradação de DNA genômico que poderia estar presente nas amostras mesmo após o isolamento do RNA. Dessa forma, a amplificação de DNA genômico pela PCR é evitada.

2. Síntese de cDNA e amplificação por PCR

O RNA total extraído foi usado como molde para a síntese do cDNA através de RT-PCR. *Primer* oligo d(T) (IDT DNA) foi utilizado como iniciador da cadeia simples de cDNA, resultando em uma biblioteca de cDNA não específica. Os demais componentes da reação, assim como o protocolo da mesma pertencem ao kit

SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies). Antes de ser usado, os cDNAs de fita única foram diluídos 1:10.

Para amplificação por PCR utilizamos tais cDNAs, *primers* e demais componentes contidos no kit MasterMix (2,5X) (Eppendorf ou Promega). As condições de PCR foram: 94°C por 5 min seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, T (°C) do *primer* por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando com 72°C por 7 min e 4° por tempo indefinido. Os *primers* usados para amplificação de cada gene estão apresentados nas Tabelas II, III e IV (Anexo).

3. Visualização em gel de agarose e purificação do cDNA do gel

Os produtos da PCR foram testados em géis de agarose 1,0% (m/v) em tampão 1X TBE (0,45 M Tris-base; 0,45 M ácido bórico; 0,5 M EDTA; pH 8,0) contendo brometo de etídeo (0,3 µL/mL de agarose). O gel foi submetido à eletroforese em corrente constante de 100 V (volts), por aproximadamente 1 h. Os resultados foram digitalizados e documentados digitalmente com o uso do foto-documentador KODAK EDAS 290. O peso molecular dos fragmentos produzidos foi inferido através de comparação com a migração do marcador de peso molecular de 100pb (Promega).

Após eletroforese, as bandas formadas pelos fragmentos amplificados e de peso molecular esperado foram recortadas para extração do DNA. Para extração e purificação dos fragmentos de DNA usou-se o kit de extração QIAquick® Gel Extraction Kit® (QIAGEN) segundo as instruções que acompanham o produto.

4. Clonagem e Sequenciamento

4.1. Ligação dos fragmentos em plasmídeos, seguido de clonagem

Os fragmentos de DNA obtidos no processo de extração foram clonados no sítio EcoRI do vetor pGEM®-T Easy (Promega), segundo protocolo que acompanha o produto.

Após a ligação, o DNA recombinante foi usado para transformar uma linhagem de células competentes de bactérias *Escherichia coli* (linhagem DH5α). O método de escolha para transformação foi o de choque de temperatura. As células transformadas foram plaqueadas em meio sólido de LB-Ágar (USB) suplementado com ampicilina (100 µg/ml), adequado para seleção apenas de colônias transformadas, cuja identificação foi feita pelo método *blue/white* (X-gal e IPTG foram usados como marcadores de transformação).

As colônias transformadas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 3 ml de meio LB líquido suplementado com ampicilina (100 µg/ml) e incubadas a 37°C sob agitação. Após 20 h de crescimento, as culturas foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml e centrifugadas a 5000 x g por 3 min. A seguir o DNA plasmidial foi obtido através de mini preparações utilizando-se o kit QuickLyse Miniprep Kit (QIAGEN) segundo as instruções que acompanham o produto. Parte do meio contendo as bactérias foi mantida em glicerol 80% e conservada a -80°C.

4.2. Digestão para extração do fragmento clonado e preparação para reação de sequenciamento

Para testar a presença do DNA de interesse uma alíquota do plasmídeo foi digerida com a enzima EcoRI (Invitrogen, Life Technologies) a 37°C, para extração do

fragmento, sendo em seguida, aplicada em um gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo. As alíquotas que continham os plasmídeos de interesse foram preparadas para seqüenciamento.

O seqüenciamento do DNA foi feito pelo método de Sanger *et al* (1977), com moléculas de DNA dupla fita marcadas fluorescentemente, utilizando-se o kit BigDye Terminator v3 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems). Para marcação do DNA foi usada a reação de PCR e para seqüenciamento o aparelho ABI-Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Ambas as fitas foram seqüenciadas usando-se os *primers* universais M13F (5' - CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3') e M13R (5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3').

4.3. Análise das seqüências

Os eletroferogramas gerados foram interpretados pelo programa *Sequencing Analysis v3.4.1* e então submetidos ao programa *Sequencher™ version 4.7 for Windows (Gene Codes Corporation)* para avaliação da qualidade e edição das seqüências geradas. Posteriormente as seqüências foram anotadas sobre o genoma de *A. mellifera*, com auxílio da plataforma Artemis 7.0 (Rutherford *et al.*, 2000). As seqüências de nucleotídeos e as seqüências deduzidas de aminoácidos foram analisadas usando-se os programas algoritmos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul *et al.*, 1990) diretamente no banco de dados GenBank (National Center of Biotechnology Information, National Institutes of Health) ou do banco de dados do nosso laboratório contendo informações do genoma de *A. mellifera* (disponível em http://zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab/bioinfo_blast).

5. RT-PCR semi-quantitativa

5.1. Determinação do número de ciclos (curva de saturação) de cada *primer*

Após a síntese dos cDNAs, foram realizados testes para a determinação do número de ciclos ideal na PCR para evitar a saturação da reação. O gene codificador da actina (ou rp49) foi usado como controle endógeno da reação e passou pelo mesmo processo. As reações de PCR com cDNAs de operária de todas as fases, bem como dos diferentes tecidos analisados para cada um dos genes foi feita usando-se os *primers* apresentados nas Tabela II, III e IV (Anexo).

5.2. Densitometria

Após a visualização e fotodocumentação dos produtos de PCR em gel de agarose foi feita análise densitométrica utilizando-se sistema *Kodak 1D 3.3.2 Image Analysis Software* acoplado ao digitalizador KODAK EDAS 290. Para construção dos gráficos foi usado o programa *Microsoft Excel 2003 for Windows*.

6. PCR em Tempo Real (*Real Time PCR*)

Os cDNAs de algumas fases larvais e pupais de operárias e rainhas e os cDNAs de operárias tratadas por hormônios foram analisados por *Real Time 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 10 µL de SYBR Green PCR Master Mix; 0,8 µL de cada *primer* 10 µM; 1 µL de cDNA (diluído 10 vezes); 7,4 µL de água Milli-Q autoclavada. Cada

amostra foi analisada em triplicata e a qualidade da amplificação foi determinada pela curva de dissociação. Os *primers* usados para amplificação de cada gene estão apresentados nas Tabelas II, III e IV (Anexo).

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, *rp49* e *actina*, de acordo com instruções do *User Bulletin #2* (Applied Biosystems). Primeiramente são feitas as medidas dos Ct das 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 . Após obtenção do ΔCt foi feita a média de cada tréplica amostral. Posteriormente escolhe-se uma das médias de ΔCt que corresponda a um calibrador e normalizam-se todos os valores subtraindo-os pelo ΔCt escolhido, que neste caso foi sempre a média das amostras controle. 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.

7. Análise Estatística

Nos experimentos de aplicação e injeção hormonal em larvas e pupas, e no experimento de ligadura abdominal, o teste utilizado nas análises de quantificação dos genes estudados foi o teste-t com o uso do programa *SigmaStat 3.1*. Nas amostras tratadas com HJ e 20E em larvas e pupas a comparação para cada gene analisado foi feita entre grupos controle e tratado de cada gene. Nas amostras submetidas à ligadura abdominal a comparação para cada gene analisado foi feita entre o grupo submetido à ligadura abdominal e o grupo que não foi submetido. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

1. Caracterização da região codificadora dos genes *alatostatina* (*Amel-AS*), *bombixina* (*Amel-bomb*), *eclosion hormone* (*Amel-EH*), *ecdysis-triggering hormone* (*Amel-ETH*) e *peroxidase* (*Amel-PXD*) de *A. mellifera*

Dos genes abordados no presente trabalho, apenas o *Amel-ETH* foi experimentalmente seqüenciado e depositado no GenBank (NM_001142607). A fim de cumprir os objetivos propostos, buscou-se seqüenciar a região codificadora (CDS, do inglês: *coding sequence*) dos demais. Para tanto, ortólogos dos genes de interesse já validados em outros insetos foram utilizados como referência para buscas no Official Gene Set (OGS) (Elsik et al., 2007 – Genome Biology). O OGS trata-se de uma base de dados contendo mais de 10 mil CDSs preditas *in silico* (possuem números de acesso iniciados pelas letras “GB”) a partir da seqüência do genoma de *A. mellifera* (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). As seqüências preditas correspondentes a *Amel-AS* (número de acesso no OGS: GB16653-PA), *Amel-bomb* (GB10174-PA) e *Amel-EH* (GB19466-PA) foram identificadas e usadas como entrada para anotação manual sobre suas respectivas regiões cromossômicas (chamadas ‘Group’) da versão 4.0 do genoma de *A. mellifera* com auxílio da plataforma *Artemis 7.0* (Rutherford et al., 2000) e algoritmos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul et al., 1990). O mesmo procedimento foi realizado para a seqüência relativa à *Amel-ETH* (NM_001142607). Para clonagem e seqüenciamento de cDNAs correspondentes a CDS desses genes, foram desenhados primers específicos em regiões adjacentes aos códons preditos para início (ATG, metionina) e fim de tradução (TAA, TGA ou TAG), conforme anotação. Nesse caso, os primers se anelam em regiões hipotéticas 5’ e 3’ não-traduzidas (a partir daqui, chamadas de *UTR*, do inglês: *untranslated region*). Não foi identificada nenhuma predição para *Amel-PXD* na base de dados OGS. Mais detalhes do seqüenciamento e anotação da *peroxidase* encontram na seção 1.5.

1.1. Seqüência da CDS do gene codificador de *Amel-AS*

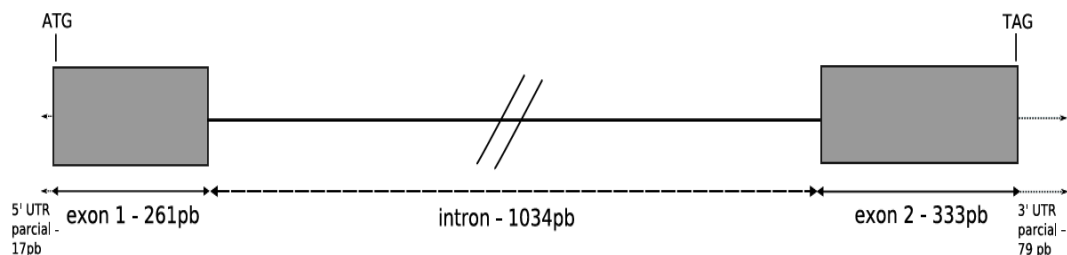
A CDS do gene codificador de *alatostatina* em *A. mellifera* (*Amel-AS*) é composta de dois *exons* que somados perfazem 594 pares de base (pb) e um *intron* de 1034 pb (Figura 4 A). O cDNA clonado e totalmente seqüenciado apresenta, além da CDS, regiões *UTRs* parciais onde foram desenhados os *primers* (Figura 4 B). A dedução a partir da CDS sugere uma proteína de 197 aminoácidos (aa) e confirma com 100% de identidade, a predição (GB16653-PA) do OGS.

Análises por BLASTP revelaram similaridades significativas entre *Amel-AS* e as *alatostatinas* de diversos outros insetos, como por exemplo: *Schistocerca gregaria* (CAA91232.1) (51% de identidade), *Spodoptera frugiperda* (CAD48593.1) (45% de identidade), *Helicoverpa armigera* (AF309090_1) (38% de identidade) e *Drosophila melanogaster* (AF263923_1) (36% de identidade).

O alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos de *Amel-AS* com seqüências de *alatostatinas* de *S. cynthia* (ScAS, AAY68369), *S. frugiperda* (SfAS, CAD32496), *D. melanogaster* (DmAS, NM_078818), *Anopheles gambiae* (AgAs, AAAB01008980.1), *Aedes aegypti* (AeAS, U66841.1) e *Culex quinquefasciatus* (CqAS, DS231818.1) mostrou que não há um domínio conservado encontrado entre todas elas (Figura 4 C), embora o motivo RQCYFNPISCF esteja presente apenas em *S. cynthia*, *S. frugiperda*, *D. melanogaster* e *A. gambiae* no C-terminal. Foram realizadas buscas de domínios *alatostatina*, mas não foram encontrados. No entanto, encontramos em *A. mellifera* o motivo YSFGL que se repete três vezes e o domínio YHFGL que aparece apenas uma vez (Figura 4 C sublinhados em vermelho). Estes motivos são similares ao motivo Y/FXFGL que classifica esse tipo de *alatostatina* na família do tipo-A (Tobe & Stay, 2004).

A

Alatostatina - GB16653 - Group15.27



B

```

gagaggcaggtacagaATGAGGAGCAGGACAAGTGTTCGACATCGAGCTTGGCTTTCCTCTATTTCT
primer F
-----
5' UTR                                     exon 1
TTCGGGATCGTGGGAAGGTCAGCGTTGGCTATGGAAGAAACACCAGCCTCGTCCATGAATCT
-----
exon 1
TCAACATTATAACAATATGTTGAATCCTATGGCGTTCGACGATACCATGCCTGAAAAGAGAG
-----
exon 1
CGTACACTTATGTCTCCGAGTATAAGAGGCTACCCGCTACAACTTTGGTATTGGAAGCGTT
-----
exon 1
GGATCGATACCAATGACAACAAGAGAGGGCGGACTACTCGTTCGGGCTTGGTAAACGAAG
-----
exon 1                                     exon 2
ACAATACAGTTTTCGGGCTGGGAAACGAAACGACAACGCTGACTACCCGCTCAGACTGAAC
-----
exon 2
CTGGATTACCTTCCCGTCGACAATCCCGGTTCCATTCCCAAGAGAACACGGACGACTTTCTC
-----
exon 2
GAGGAGAAACGGGAAGGCAGCCTTACAGCTTCGGATTAGGGAAGAGGGCGGTGCATTACA
-----
exon 2
GCGGTGGACAACCGTTAGGCTCGAAGAGACCGAACGACATGCTCAGTCAGAGATATCATTTTC
-----
exon 2
GGGCTTGGGAAGAGGATGTCCGAGGACGAGGAGGAGTCTCGCAGTAGaaggggccttctccgagggg
-----
exon 2                                     3' UTR
atatcggtcgacgactcgtcaccac ggtgtgcgcc gacgtaaaacgcaattcgtag
-----
primer R
-----
3' UTR
    
```

C

```

ScAS      1  ---MKATYCNVGMGVLMGIVVILLVTVDAAPMELDDEQSE-----NAFVR-PDNDPDLSEQWETI
SfAS      1  ---MKTSAYNVYLGVAAMTALLFVTINAAPMEADDETAE-----NTFVAHPDGDMELSGPDWAI
DmAS      1  ----MMKPVQILLCYGLLTLFFALSEARPSGAETGPDSE-----DGLDGDQDAEDVRGAYGGGYD
AgAS      1  ----MAAPATPSRQILFVIALLFVVKLGTRPQNAIDNQ-----DLPFINPNELRKLYFNYSY
AeAS      1  --MRPSTTPMVLISYLAFVLCILACVAYGSSALGSSSSGSSD-----QSFPGGGAGGGGSSASAESE
AmAS      1  ---MRSRTSLLTSSLAFLYFFGIVGRSALAMETPSSMNLQHYNNMLNPMVFDDTMPEKRAYFVVSSE
CqAS      1  MFSQHRHQWTNLVNLIVLLVFPSSVINHIWAAAEPESLAADQHQQ-----QQHESAPQHSLQKRFHWKNLQ
consensus 1  . . . . .

ScAS      57  DTAALRKLLKLDDEDRMIRATRTWPQP--EPRGWGVRDVEGRLARQWR-----
SfAS      58  NTAALRKLLQLDAEDRMGGVTRSWPQA--EPRGWGLRALDSRLARQWR-----
DmAS      56  MPAQAIYPNIPMDRLQMLFAQYRPTISA--YLRSPTYGNVNLRYRLPE-----
AgAS      56  VSNQLDNYGLDPLQLQLLAQYAQSN---AISGGGGGGWDQLYRAPPE-----
AeAS      59  IGDDRQREISQATFQHMLAVRSPKYNFGLGKERYIIEEDVPGAKRLPHYNFGLGKRARNNLLYDDDSAP
AmAS      67  KRLPVYNFGIGKRWIDTNDNKRGRDYSEFGLGKERQYSEFGLGKRNDNADYPLRLN-----
CqAS      65  GGWGRNRPAPNDPSSSESDPDYYSYPGGGGHGEENPLGDDIPGNDLEKLQTYLIK-----
consensus 71  . . . . .

ScAS      104  -----TDKQVRFRQCYFNPISCFRK-----
SfAS      105  -----ADKQVRFRQCYFNPISCFRK-----
DmAS      102  -----SKQVRFRQCYFNPISCFRK-----
AgAS      99  -----MKQVRFRQCYFNPISCFKK-----
AeAS      129  SWSEDYSSLI PRDGLDYDGDKDKSAEKRASAVRYHFGLGKRKYDFGLGKR--VYEDKRLPNRYNFGLGK
AmAS      121  ---LDYLPVDNPAFHSQENTDDFLEEKRGQYSEFGLGKRVAHYSGGQPLGSKRPNMDSQRYHFGLGK
CqAS      121  -LMNQQRMAQMDTQYDGPDEEYPGAERKRAWNKMGGGWGAWGKREP GWNNLKGGLWGKRSEKWNKLSSSGK
consensus 141  . . . . .

ScAS      -----
SfAS      -----
DmAS      -----
AgAS      -----
AeAS      197  R-----
AmAS      187  RMSEDEEESSQ
CqAS      190  RDSGNSNSY--
consensus 211  . . . . .

```

Figura 4 – Representação esquemática do gene *alatostatina* em *A. mellifera* (*Amel-AS*). **A.** Arquitetura genômica das regiões codificadoras, *introns* e *UTRs* do gene. ATG indica códon de início e TAG o códon de término da transcrição. Os 2 *exons* e 1 *intron* são representados por retângulos e linha inteira, respectivamente. As regiões *UTRs* estão representadas por linhas tracejadas. O número de nucleotídeos está indicado e o tamanho dos *exons* e *introns* são proporcionais. **B.** Seqüência nucleotídica do gene *alatostatina* (apenas *exons* e *UTRs*). As seqüências sublinhadas representam os *primers* utilizados para a amplificação do gene e posterior seqüenciamento. **C.** Seqüência deduzida de aminoácidos do gene *Amel-AS* alinhada com outras seqüências de *alatostatina* de *S. cynthia* (ScAS, AAY68369), *S. frugiperda* (SfAS, CAD32496), *D. melanogaster* (DmAS, NM_078818), *A. gambiae* (AgAs, AAAB01008980.1), *A. aegypti* (AeAS, U66841.1) e *C. quinquefasciatus* (CqAS, DS231818.1). As seqüências possuem um consenso (marcado em preto). Sublinhado em vermelho temos o motivo YSFGK e sua variação, YHFGL. Outras posições conservadas são compartilhadas entre essas seqüências (marcadas em cinza). O símbolo (.) indica substituições semi-conservadas.

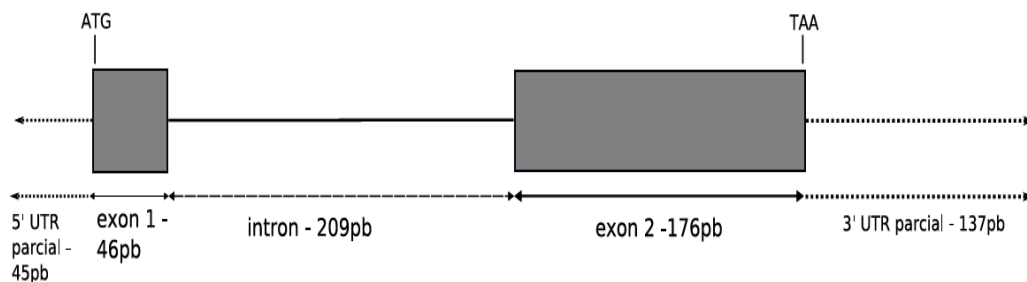
1.2. Seqüência da CDS do gene codificador de *Amel-bomb*

A CDS do gene codificador de *bombixina* em *A. mellifera* (*Amel-bomb*) é composta de dois *exons* que somados perfazem 222 pb e um *intron* de 209 pb (Figura 5 A). O cDNA clonado e totalmente seqüenciado contém, além da CDS, regiões *UTRs* parciais onde foram desenhados os *primers* (Figura 5 B). A dedução a partir da CDS sugere uma proteína de 73 aa e confirma com 100% de identidade, a predição (GB10174-PA) do OGS.

Análises por BLASTP revelaram similaridades significativas entre *Amel-bomb* e os *insulin-like peptides* de outros insetos, como por exemplo: *S. gregaria* (CAP09890.1) (30% de identidade), *D. melanogaster* (AAY54822.1) (28% de identidade) e à *bombixina* de *B. mori* (BAA20145.1) (40% de identidade). Foi encontrado também, o domínio característico da família dos *insulin/insuli-like growth factor/relaxin* (pfamcl02453).

O alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos de *Amel-bomb* com seqüências de *bombixinas* de *B. mori* (BmBomb, D00340.1), *M. sexta* (MsBomb, DQ080209.1) e *S. cynthia* (ScBomb, D13925.1) mostrou pequenas regiões conservadas, com destaque para a presença de cinco cisteínas que formarão as pontes dissulfeto (Figura 5C).

A Bombixina - GB10174 - GroupUn.2782



B



C

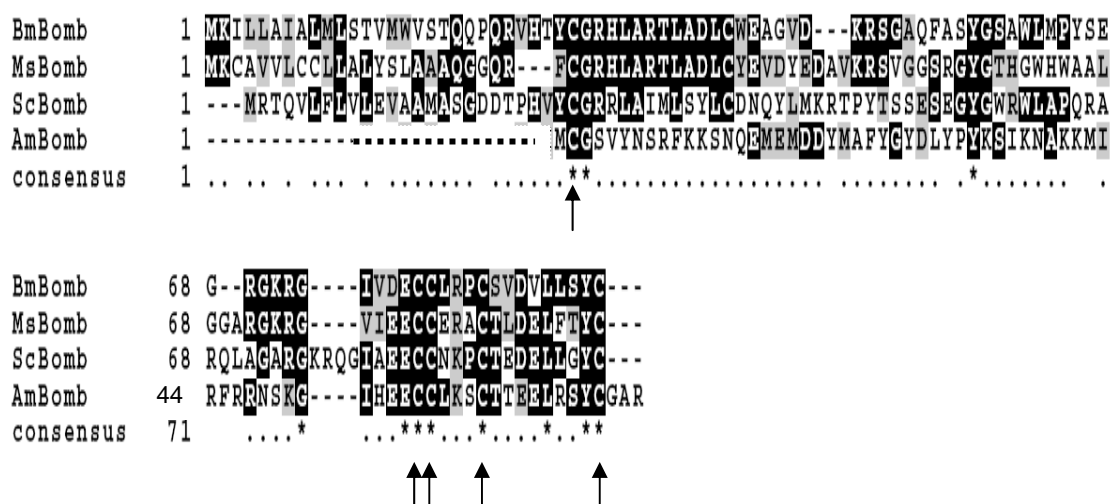


Figura 5 – Representação esquemática do gene *bombixina* em *A. mellifera* (*Amel-bomb*). **A.** Arquitetura genômica das regiões codificadoras, *introns* e *UTRs* do gene. ATG indica códon de início e TAA o códon de término da transcrição. Os 2 *exons* e 1 *intron* são representados por retângulos e linha inteira, respectivamente. As regiões *UTRs* estão representadas por linhas tracejadas. O número de nucleotídeos está indicado e o tamanho dos *exons* e *introns* são proporcionais. **B.** Seqüência nucleotídica do gene *bombixina* (apenas *UTRs* e *exons*). As seqüências sublinhadas representam os *primers* utilizados para a amplificação do gene e posterior seqüenciamento. **C.** Seqüência deduzida de aminoácidos do gene *Amel-bomb* alinhada com outras seqüências de *bombixina* de *B. mori* (BmBomb, D00340.1), *M. sexta* (MsBomb, DQ080209.1) e *S. cynthia* (ScBomb, D13925.1). As seqüências possuem um consenso (marcado em preto). As cinco cisteínas apresentam-se conservadas nos 4 insetos analisados (indicadas por setas). Outras posições conservadas são compartilhadas entre essas seqüências (marcadas em cinza). Os símbolos (*) e (.) indicam, respectivamente, aminoácidos idênticos e substituições semi-conservadas.

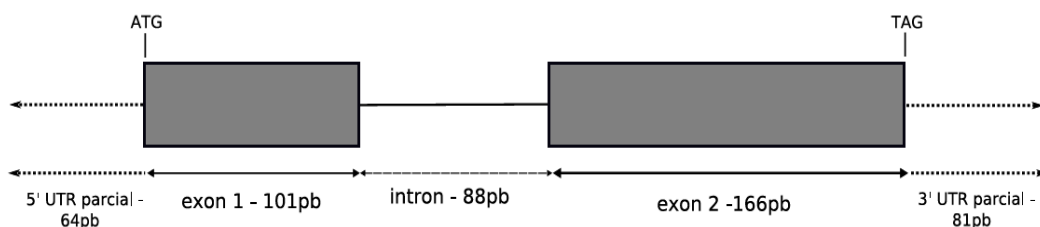
1.3. Seqüência da CDS do gene codificador de *Amel-EH*

A CDS do gene codificador de *eclosion hormone* em *A. mellifera* (*Amel-EH*) é composta de dois *exons* que somados totalizam 267 pb e um *intron* de 88 pb (Figura 6 A). O cDNA clonado e totalmente seqüenciado contém, além da CDS, regiões *UTRs* parciais onde foram desenhados os *primers* (Figura 6 B). A dedução a partir da CDS sugere uma proteína de 88 aa e confirma com 100% de identidade, a predição (GB19466-PA) do OGS.

Análises por BLASTP revelaram similaridades significativas entre *Amel-EH* e os *eclosion hormone* de outros insetos, como por exemplo: *Ostrinia furnacalis* (ABG66962.1) (64% de identidade), *D. melanogaster* (NP_524386.1) (43% de identidade) e *B. mori* (NP_001037307.1) (62% de identidade). Foi encontrado o domínio característico da família dos *eclosion hormone* (pfam04736).

O alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos de *Amel-EH* com seqüências de *eclosion hormone* de *C. quinquefasciatus* (CqEH, EDS40133.1), *A. aegypti* (AeEH, CH477404.1), *M. sexta* (MsEH, AAA29310.1), *H. armigera* (HaEH, AY82476.1), *O. furnacalis* (OfEH, ABG66962.1), *B. mori* (BmEH, NP_001037307) e *D. melanogaster* (DmEH, CAA51051.1) mostrou pequenas regiões conservadas entre todas as seqüências, entre essas os motivos NCAQCKKM e KGKLIP, que fazem parte do domínio da superfamília do *EH* (Kataoka *et al.*, 1992). O motivo ILLVLFLV presente próximo ao N-terminal de *Amel-EH* é a região de aminoácidos hidrofóbicos encontrada em seqüências de *EH* de outros insetos. Também estão presentes seis cisteínas em posições conservadas (Figura 6 C).

A *Eclosion hormone* - GB19466 - Group4.3



B

```

gtaggc aaagaattgttatttaggatg gattaatacgtttc aatttcacgtttggtgc agtcATGAACACTTCGATCCGTTTCGATTTTGCTGGT
primer F
-----
5' UTR                                     exon 1
GCTCTTTTTAGTCTATTCGATGGTATTCGTGCTCGTTGCAGGAAGCGTTTCCTTTCGAACGAGCCATA
-----
exon 1
GGAGTCTGTATCCGAAATTGCGCTCAATGCAAGAAAATGTTCCGGCCCGTACTTCCTTGGACAAAAGT
-----
exon 2
GTGCCGATTCTTGTTTCAAGAACAAAGGAAAACCTATTCCC GACTGCGAGGATGAGGACTCGATCC
-----
exon 2
AACCATTCTCCAAGCGCTTGATAGCGAATATTAGaaaaataagatcgacttgaagttcctcgctgttaacaattattcgcgctaaatata
-----
exon 2                                     5' UTR
acataacataccaaaagtgcgcc
-----
primer R
3' UTR
    
```

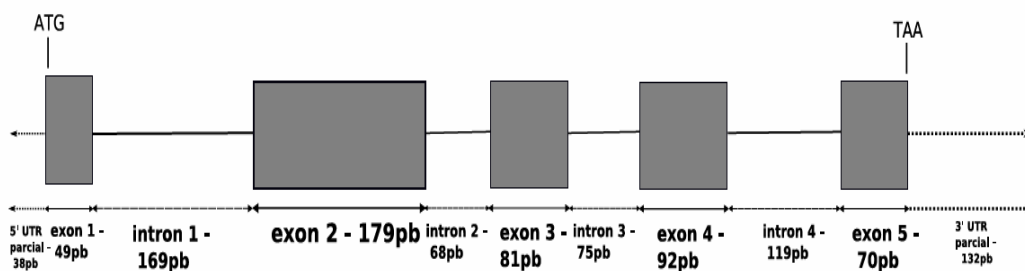

1.4. Seqüência da CDS do gene codificador de *Amel-ETH*

A CDS do gene codificador de *ecdysis-triggering hormone* em *A. mellifera* (*Amel-ETH*) é composta de cinco *exons* que somados totalizam 471 pb e quatro *introns* que somados perfazem 431 pb (Figura 6 A). O cDNA clonado e totalmente seqüenciado contém, além da CDS (Figura 6 B), regiões *UTRs* parciais onde foram desenhados os *primers* utilizados por Roller *et al.*, unpublished. A dedução a partir da CDS sugere uma proteína de 88 aa e confirma com 100% de identidade, a predição (GB19466-PA) do OGS.

Análises por BLASTP revelaram similaridades significativas entre *Amel-ETH* e os *ecdysis-triggering hormone* de outros insetos, como por exemplo: *Nasonia vitripennis* (NM_001142635.1) (45% de identidade), *A. aegypti* (ABI93272.1) (35% de identidade), *D. melanogaster* (NP_524699.1) (32% de identidade). Não foi localizado nenhum domínio.

O alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos de *Amel-ETH* com seqüências de *ETH* de *N. vitripennis* (NvETH, NM_001142635.1), *A. aegypti* (AaETH, ABI93272.1) e *D. melanogaster* (DmETH, NP_524699.1) mostrou pequenas regiões conservadas entre todas as seqüências (Figura 7C).

A *Ecdysis-triggering hormone* - GB15713 - Group13.10



B

```

ATGACAAGTCTGCGTCTTTGGGATTCGTGCGTTGTTTCTTCGTTGGTGCCATTTGGATCTCAATTTGGCATTG
      exon 1                                exon 2
CTAATCTGTGAAAATGCTTCGATGGCCGATGAAGTGCCTGCCTTCTTCCTGAAAATCGCCAAGAATATTCCTCG
      exon 2
CGTGGGACGCAGCGAAGGTTACGACGATTTCTTTAAATCTCGAAAAAATCTTCGAAACTTGAAAACCACGAT
      exon 2
GGTCAGTCTGAATCTTGCCGCAATATCTGTGCGACGAGCCCTTTTCAAGACCTATAAAAAGCGGGTGGATTT
      exon 3
CCATCGGTTGATGATTGGTCGTGGCAACACTTTCCTCTCGCGATAGAAGGACCACGAGAACTCTGGCGAACTC
      exon 3                                exon 4
TGCTGGTTATTCCAAGGACACGTCGGACGACGTTGACAACGAAATATGAAAACGAAAAAAGAGGACGGGAA
      exon 4                                exon 5
ACGAACCCATGGCTTCCGAGGAGAATTAA
      exon 5
    
```


1.5. Seqüência da CDS do gene codificador de *Amel-PXD*

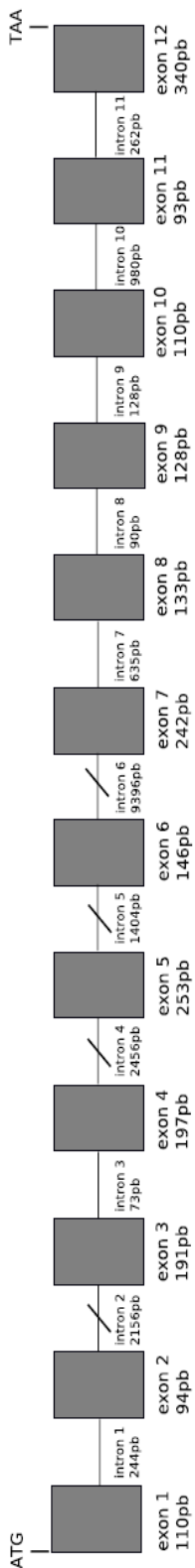
A CDS do gene codificador de *peroxidase* em *A. mellifera* (*Amel-PXD*) é composta de doze *exons* que somados totalizam 2037 pb e onze *introns* que somados perfazem 17824 pb (Figura 8 A). O cDNA foi clonado e parcialmente seqüenciado através do uso de *primers* desenhados ao longo do gene (Figura 8 B). Os aminoácidos deduzidos do trecho já seqüenciado mapeia-se no GroupUn.1287 e Group4.3 do genoma de *A. mellifera* (versão 4).

Análises por BLASTP da seqüência total predita da proteína revelaram similaridades significativas entre *Amel-PXD* e os genes da *peroxidase* de outros insetos, como por exemplo: *Pediculus humanus* (EEB19573.1) (85% de identidade), *A. aegypti* (EAT46477.1) (83% de identidade), *D. melanogaster* (NP_650627.1) (82% de identidade) e *C. quinquefasciatus* (EDS26535.1) (82% de identidade). Encontramos em *A. mellifera* o domínio característico da superfamília peroxidase de animais (pfam03098).

O alinhamento da seqüência parcial deduzida de aminoácidos de *Amel-PXD* com seqüências de *peroxidases* de *A. aegypti* (AaPer, EAT46477.1), *C. quinquefasciatus* (CqPer, EDS26535.1) e *A. gambiae* (AgPer, AY752910.1) mostrou a presença de uma extensa região conservada entre todas elas (Figura 8C), entre essas, os motivos REHNRIA, NPHW, QHITYNE e AAFRFGHSL que fazem parte do domínio da superfamília da peroxidase (Marchler-Bauer *et al.*, 2007).

A

Peroxidase - GroupUn.1247 + Group4.3



B

ATGTTAACTTTCTGTTTCTTCATTTTTCAGCCCACCGACAGCCGGATCACAGACATGCATCACTTACGATGCCGTG

éxon 1
 AATCGAGCGTATATCGAAGCGAGAAAACGCATCAATGTGGCGCAACCCAAGAACAAAATGTGGAGACCAGAGG

éxon 1 *éxon 2*
 ATTTAGCCACGGTTGGAGAACTTTTATTGGATATCAGTGGCAACCTTGTACAAACTACGGCCTAACCTTCGAAGA

primer 1F

éxon 2 *éxon 3*
 AATCGAAAAAGTCTACCCTTAATCGACACTTCGAAGACCTTAATTCGCGAGGTGTGCCCTGCTTTTGGAGCAA

éxon 3
 CGTGGAATGTCGTGCTGGTAAATATAGAAGAAACGATGGCTTGTGCACAAATTTACAAAATCCGACATGGGGCG

éxon 3
 CCACATTAGCGCCCTTTCAAAGAGTGCTGAGTCCACGATTCGCGGACGGTCTAACAGCGCCTAGAATATCGGTGA

éxon 3 *éxon 4*
 CCAGTCATGATTACCATTATCAGCATAGTGTCACGCACTATGCATCCTGACGAGGGTTATCAGCATCATGCTG

primer 1R e primer 2F

éxon 4
 GTACAGTCATGGTCATCGCCTGGGGGAGTTTATGGATCAGACTATACGCTAACTGGAACGCCTCTAGATCCTT

éxon 4 *éxon 5*
 TGAACCGAAACGACCCGGAGGAATGTTGCCATCGGCCACCGCACCTGAAGAATCCCTATTGCAACGAGATTCTT

primer 2R e primer 3F

éxon 5
 ATACCGAAGACGATTATTTCTACAGACTGTTCAACGTGAAATGCATGGACTTCGTTTCGCCTTTCCTGCTGTAC

éxon 5
 GACCTGGATGCCGACTCGGCTCTCGTGTGCCTTTCAATCTTCTTACCGGTGTGCTCGATGGAAACACGGTGTATGGA

éxon 5
 ATCACGGAATCATTGCTAGGAAGCTACGGGCTGGTTATGGAGGATTGTTACGCATGAATCCAGTGTTCAGAATA

éxon 5 *éxon 6*
 CGGACTGAAGGATTTATTACCGCTCAAGCTGGATATCCGGACGAGGGATGCACCCGGCCGAATCGATCGATGTAC

éxon 6
 TGTTCGAGGCGGGTGAGATAAGAGTGAACGAGCAGCTAGTGTTAACCTGCATGCATACTTTGATGGCACGTGAGC

éxon 6 *éxon 7*
 ATAATCGAATTGCGAAGACGTTAATTCAAATAAATCCTCATTGGGACGATGAAACGCTGTATCAAGAAGCAAGAAG

primer 4F

éxon 7
 AATCGTTATTGCTGAAATTCACATATCACTTATAATGAATTTCTACCCATTTTACTTGCAAAGATGTCATGGAAA

éxon 7

AATTTGGGCTCCTCCTTGAAAAAATAGCTATTGGGATGGTTACGACGAAAGCGTGAATCCATCTGTGA
primer 3R

éxon 7
éxon 8

 TCGATGCTTTTCGCTTCTGCAGCCTTCAGATTCGGACACTCATTATTGCCAACGGCAGTAGAAAGGTGG

éxon 8

 AGTAAAGCTCATAAATTTATTGCTTCGAAAAGACTATCAGATTTGATTAGAAGACCGTTTGATTGTATC

éxon 8
éxon 9

 GTGCTGGAGTTTTTCGACGAATACATTATGGGGTTGATGAACCAAGTTGCTCAAGCTATGGACGATTCT

éxon 9
éxon 10

 ATCACGCAAGAGGTGACAAATCATTATTTAAAAAAGTTGGAGCTAAGTTTGGATTGGATCTGGTCTCA

éxon 9
éxon 10

 TTTAATATGCAACGAGGACGTGAATTTGGTATTCCAAGTTATATGGAATTCAGAAAATTCTGTGGACTTC

primer 4R

éxon 10
éxon 11

 CTGGGTAGACACTTTTGACGAGCTTCACGGTTCATGCCAAACGAAACGATCAGACGCTATAGCTCG

éxon 11

 ATTTTTGAGCATCCAGCTGACGTCGATCTCTGGTCCGGTGGTGTATCCGAGAGACCACTTCCGGGTAG

éxon 11
éxon 12

TATGCTCGGCCCAACCTTCGCCTGTATAATCGCCACGCAATTCAGTTATCCCGTCGAGGCGACCGAT

éxon 12

 TTTGGTACGAGTTGCCGAACCAGCCATCGTCCTCACTCTCGGTAAGAGATTTTTCCAATATCCTAAAT

éxon 12

 ATTCCAACAGATTGAAATTTATATATAAATTTTAGAGAAATCGGTTCCAACCTGCGAATAGAATTCC

éxon 12

 CAAATAGAATTACTTAAATAAAATTATTCTTAAAATTATTAGAATACTAATCGGAATAAGTAATAATTTTAA

éxon 12

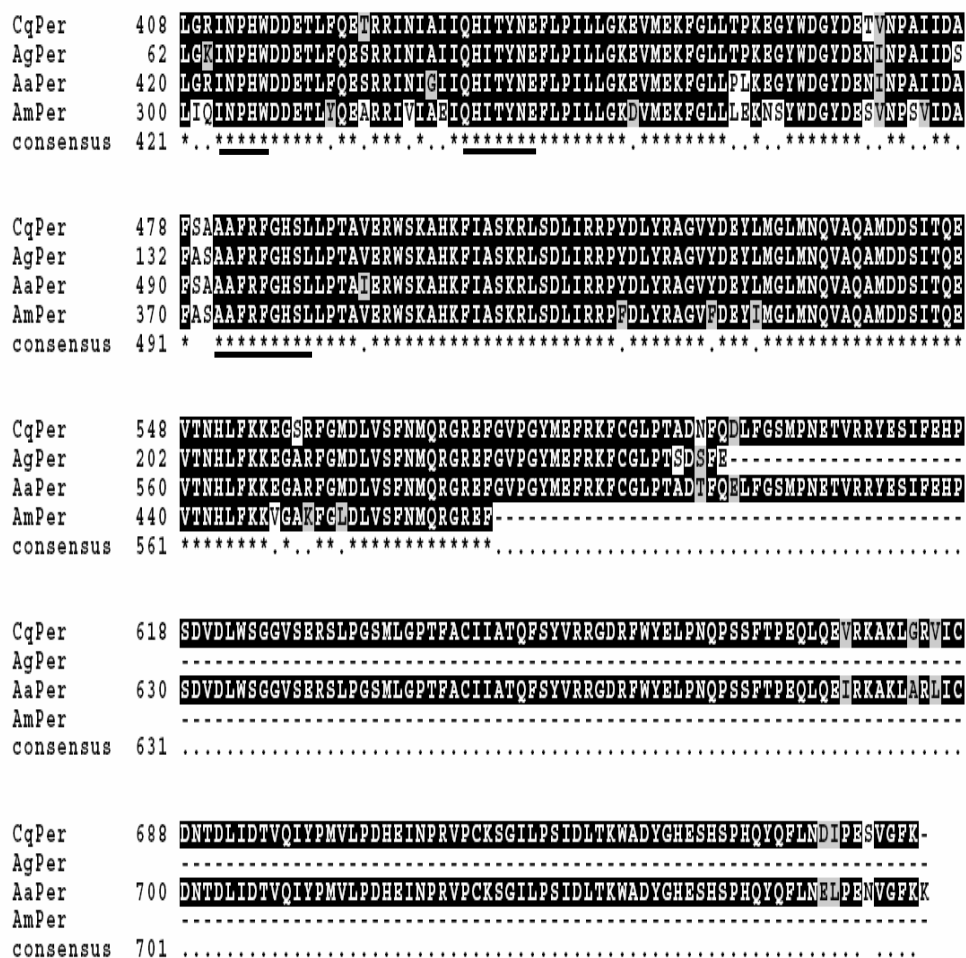


Figura 8 – Representação esquemática do gene *peroxidase* em *A. mellifera* (*Amel-PXD*). **A.** Arquitetura genômica das regiões codificadoras e *introns* do gene. ATG indica códon de início e TAA o códon de término da transcrição. Os 12 *exons* e 11 *introns* são representados por retângulos e linhas inteiras, respectivamente. O número de nucleotídeos está indicado. Os tamanhos dos *exons* e *introns* não estão proporcionais. **B.** Seqüência nucleotídica do gene *peroxidase* (apenas *exons*). As seqüências sublinhadas representam os *primers* utilizados para a amplificação do gene e posterior seqüenciamento. **C.** Seqüência deduzida de aminoácidos do trecho validado por seqüenciamento do gene *Amel-PXD* alinhada com outras seqüências de *peroxidase* de *C. quinquefasciatus* (CqPer, EDS26535.1), *A. gambiae* (AgPer, AY752910.1) e *A. aegypti* (AaPer, EAT46477.1). As seqüências possuem um consenso (marcado em preto). As regiões sublinhadas representam motivos encontrados no domínio característico da superfamília das peroxidases. Outras posições conservadas são compartilhadas entre essas seqüências (marcadas em cinza). Os símbolos (*) e (.) indicam, respectivamente, aminoácidos idênticos e substituições semi-conservadas.

2. Níveis de transcrição dos genes codificadores de *Amel-AS*, *Amel-bomb*, *Amel-EH*, *Amel-ETH* e *Amel-PXD* em *A. mellifera*

2.1. Em diferentes tecidos

Após testes da eficiência e especificidade dos *primers*, foram realizados estudos de expressão dos genes mencionados, nas alíquotas de cDNAs de amostras de cérebro (cér), corpo gorduroso (cg) e ovário (ova) de operárias recém-emergidas (NE), através de RT-PCR semi-quantitativa.

Os resultados obtidos mostraram que os transcritos de *bombixina* e *peroxidase* estão presentes em todos os tecidos analisados. Contudo, os níveis de transcritos de *bombixina* são baixos e os níveis de transcritos de *peroxidase*, menor em ovário do que em cérebro e corpo gorduroso. A *alatoestatina* é transcrita em cérebro e com menor intensidade em ovário, no entanto não foram detectados transcritos no corpo gorduroso. Transcritos de *Eh* foram encontrados apenas no cérebro (Figura 9).

Foram analisados então, no quinto estágio larval, os níveis de transcritos de *ETH*, presentes nas células Inka. Este estágio foi escolhido devido à facilidade de dissecação das traquéias, e conseqüentemente, das células Inka que se encontram associadas às mesmas. Como esperado, há transcritos de *ETH* nas células Inka (Zitnan & Adams, 2005). Como controle negativo foram usados *primers* para o gene *Eh* e como controle positivo o gene *actina* (Figura 10).

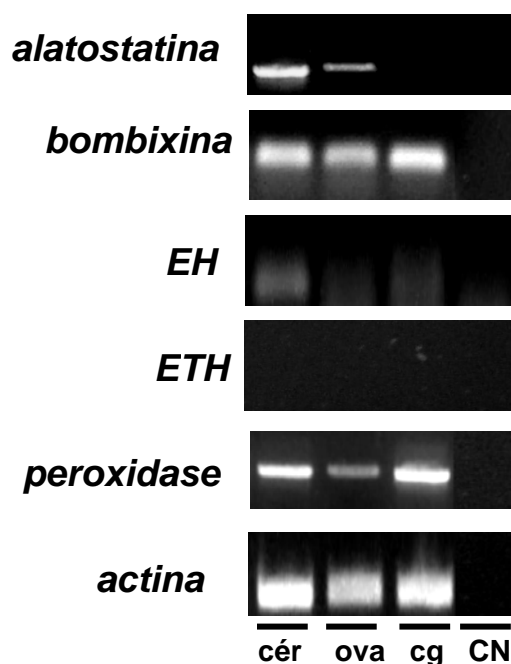


Figura 9 – Níveis de transcritos dos genes *alatostatina*, *bombixina*, *eclosion hormone* (*EH*), *ecdysis-triggering hormone* (*ETH*) e *peroxidase* em diferentes tecidos de operárias recém-emergidas de *A. mellifera*. Os tecidos analisados foram: cérebro (cér), ovário (ova) e corpo gorduroso (cg). A amostra CN se refere ao controle negativo (sem cDNA). Os transcritos de *actina* foram usados como controle endógeno. Amplificação por RT-PCR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

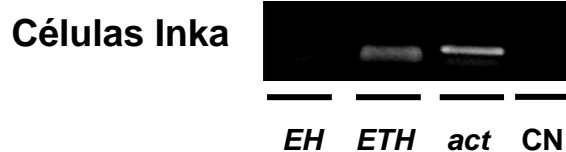


Figura 10 – Níveis de transcritos dos genes *eclosion hormone* (*EH*) e *ecdysis-triggering hormone* (*ETH*) em células Inka do quinto estágio larval de *A. mellifera*. A amostra CN se refere ao controle negativo (sem cDNA). O gene codificar do *EH* foi também usado como controle negativo. Os transcritos de *actina* foram usados como controle endógeno. Amplificação por RT-PCR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

2.2. Em estágios do desenvolvimento pós-embrionário

As análises de níveis de transcritos ao longo do desenvolvimento de operárias foram realizadas por meio de RT-PCR semi-quantitativa e análise densitométrica das bandas do gel de agarose, coradas por brometo de etídeo. Para a análise dos níveis de transcritos de *Amel-bomb* também realizamos *Real Time* PCR em algumas fases larvais e pupais de operárias e rainhas.

Para análise da expressão relativa dos transcritos da *alatostatina* foram realizados experimentos a partir do quinto estágio larval até a emergência dos adultos em operárias. Os transcritos de *alatostatina* foram detectados a partir do primeiro estágio pupal (Pw) até a emergência (NE), fase em que os títulos de HJ estão em níveis basais. Além disso, nos primeiros estágios pupais, fase em que aumentam os níveis de transcritos de *alatostatina* há altos títulos de 20E na hemolinfa de operárias (Figura 11).

As análises realizadas no fim do quinto estágio larval (PP1 a PP2) e no primeiro estágio pupal, pupa de olho branco (Pw) mostraram a presença de transcritos de *bombixina* em operárias. A análise relativa, por densitometria, demonstrou que os níveis de transcritos de *bombixina* aumentam em PP2, ou seja, no fim da fase larval, estágio em que há um pico nos títulos de 20E e anterior à pupação. Os níveis de transcritos de *bombixina* se mantêm altos em Pw, primeiro estágio pupal, onde encontramos o pico de 20E, característico do estágio pupal (Figura 12). As análises de *Real Time* em operárias foram feitas nos estágios F2, S1 e PP2 da fase larval e nos estágios Pp, Pbl e Pbd da fase pupal. O resultado confirmou o obtido com o uso de RT-PCR. Em PP2 encontramos os maiores níveis de transcritos de *Amel-bomb*. Em Pbd, estágio anterior à eclosão os níveis de *Amel-bomb* encontram-se baixos. As análises de *Real Time* em rainhas foram feitas nos estágios larvais F2, S1 e PP2 e no estágio pupal Pp. Os resultados mostram

que os níveis de transcritos de *Amel-bomb* são maiores em S1, ou seja, anteriormente em relação às operárias (Figura 13).

Os transcritos de *EH* foram analisados ao longo do estágio pupal, caracterizado por altos níveis de 20E: Pp, Pdp e Pb. A análise densitométrica relativa mostrou que no estágio Pp, o nível de transcritos é baixo. Nesse ponto, os títulos de 20E são altos. Nos outros estágios analisados (Pdp e Pb), os títulos de 20E caem, e os níveis de transcritos de *EH* são maiores. Neste estágio os títulos de HJ são basais (Figura 14). Os transcritos de *ETH* foram analisados nos estágios Pdp, Pbl e Pbd. A análise densitométrica relativa revelou que no estágio Pdp, onde há altos títulos de 20E, o nível de transcritos de *ETH* é baixo. Nos estágios subsequentes, os níveis de transcritos de *ETH* se elevam, concomitantemente com a queda dos títulos de 20E. Nestes estágios os títulos de HJ são basais (Figura 15).

Os transcritos de *peroxidase* foram analisados no último estágio larval (PP3) e nos estágios pupais (de Pw a Pbm). A análise densitométrica mostrou que em PP3, quando os títulos de HJ são altos em relação ao estágio pupal, os níveis de transcritos da *peroxidase* são baixos. Os níveis de transcritos deste gene se elevam a partir do estágio Pp, logo após o pico nos títulos de 20E na hemolinfa (em Pw) e se mantêm até o final do período analisado. (Figura 16).

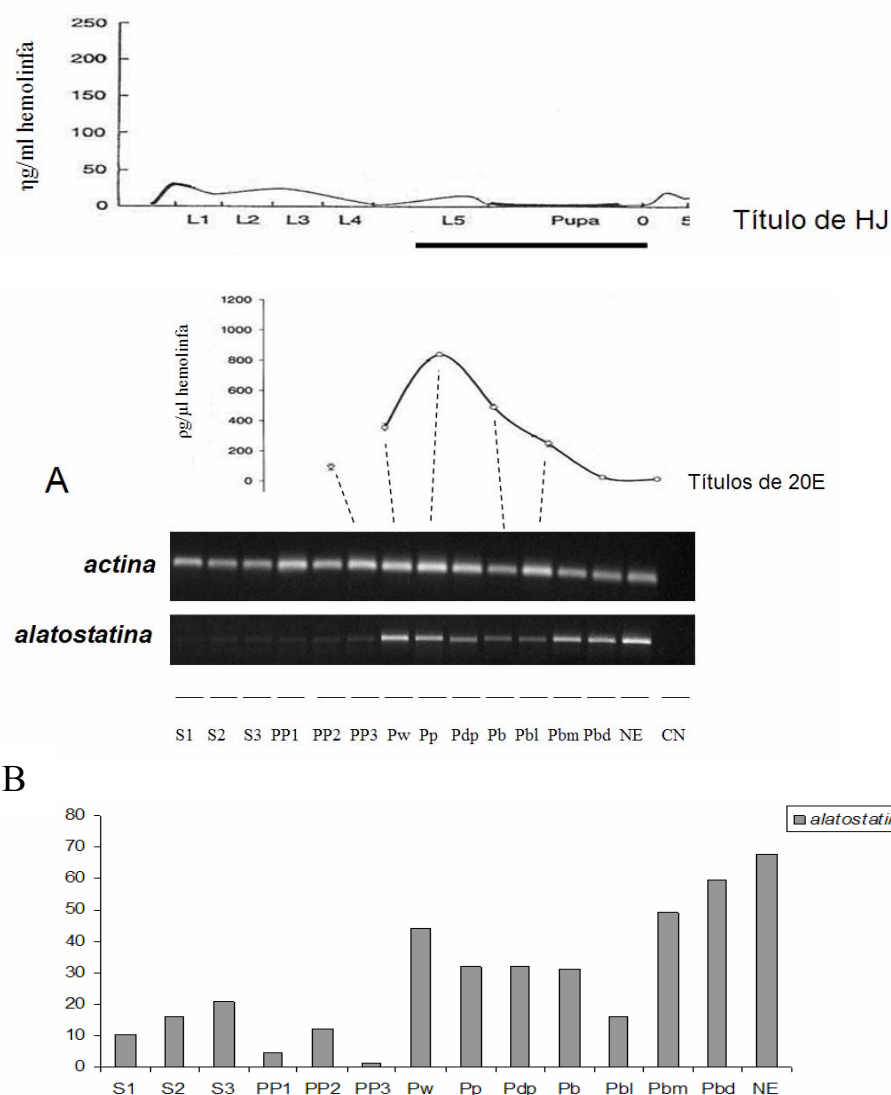


Figura 11– Níveis de transcrição do gene *alarostatina* no quinto estágio larval (S1 a PP3), nos estágios pupais (Pw a Pdp) e de abelhas recém-emergidas (NE) de operárias de *A. mellifera*. A amostra CN se refere ao controle negativo (sem cDNA). Os transcritos de *actina* foram usados como controle endógeno. **A.** Amplificação por RT-PCR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. **B.** Densitometria do gel de agarose mostrado em A. No topo da página: Títulos de HJ em operárias de *A. mellifera* (modificado de: Bloch *et al.*, 2002). Traço abaixo do gráfico dos títulos de HJ: fases analisadas. Títulos de 20E em operárias de *A. mellifera* (modificado de: Pinto *et al.*, 2002). Linhas tracejadas no gráfico dos títulos de 20E: fases analisadas.

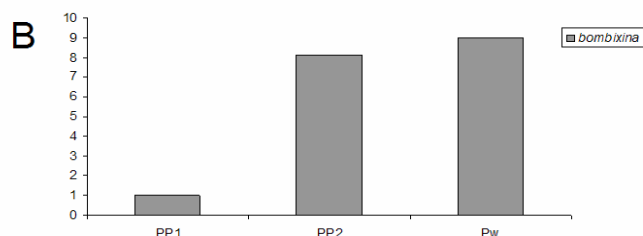
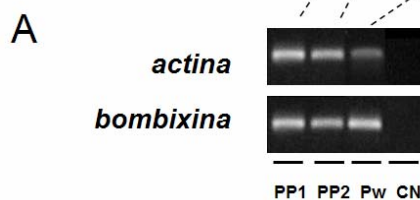
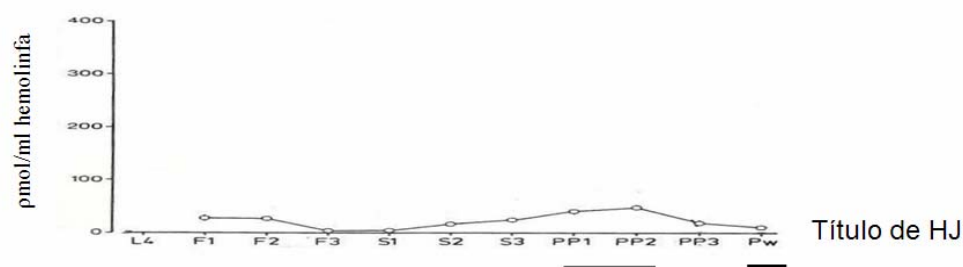
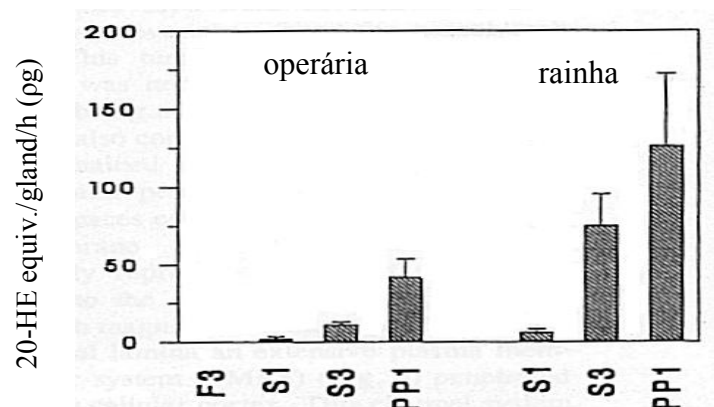
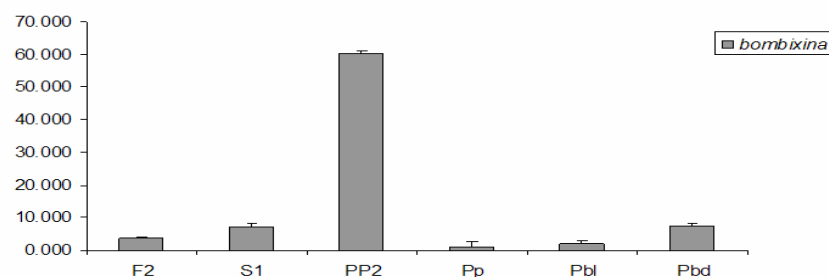


Figura 12– Níveis de transcritos do gene *bombixina* no quinto estágio larval (PP1 e PP2) e pupal (Pw) de operárias de *A. mellifera*. A amostra CN se refere ao controle negativo (sem cDNA). Os transcritos de *actina* foram usados como controle endógeno. **A.** Amplificação por RT-PCR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. **B.** Densitometria do gel mostrado em A. No topo da página: Títulos de HJ e 20E em operárias de *A. mellifera* (modificado de: Rachinsky *et al.*, 1990). Traços abaixo do gráfico dos títulos de HJ: fases analisadas. Linhas tracejadas no gráfico dos títulos de 20E: fases analisadas.



A



B

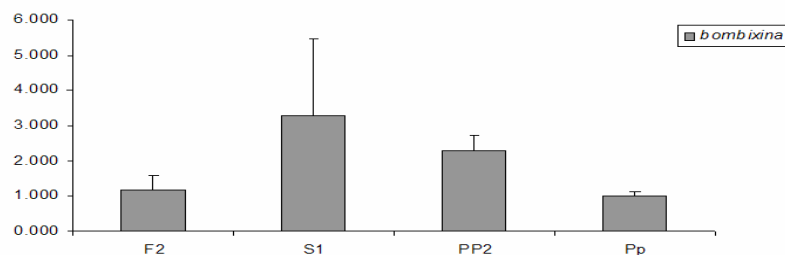


Figura 13– Níveis de transcritos do gene *bombixina* em operárias e rainhas de *A. mellifera*. Amplificação por *Real Time* PCR. O gene codificador da *actina* foi usado como controle endógeno. Os gráficos foram gerados a partir da quantificação de três amostras independentes. Gráficos: média mais erro padrão. **A.** Análise em amostras do quinto estágio larval (F2, S1 e PP2) e da fase pupal (Pp, Pbl e Pbd) de operárias. **B.** Análise em amostras do quinto estágio larval (F2, S1 e PP2) e do estágio pupal Pp de rainhas. No topo da página: títulos de 20E liberados pelas glândulas protorácicas de *A. mellifera* (Hartfelder, 1993).

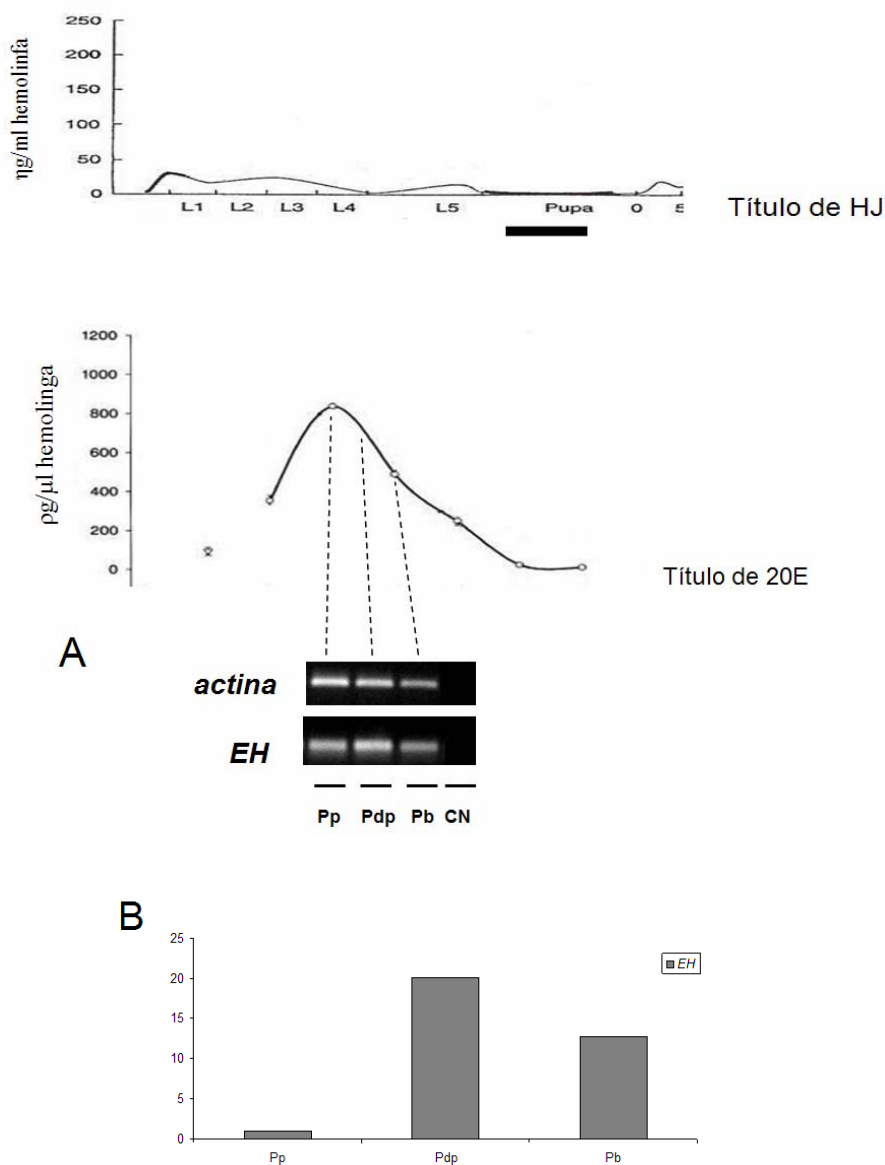


Figura 14– Níveis de transcritos do gene *ecllosion hormone* (*EH*) nos estágios pupais (Pp, Pdp e Pb) de operárias de *A. mellifera*. A amostra CN se refere ao controle negativo (sem cDNA). Os transcritos de *actina* foram usados como controle endógeno. **A.** Amplificação por RT-PCR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. **B.** Densitometria do gel mostrado em A. No topo da página: Títulos de HJ em operárias de *A. mellifera* (modificado de: Bloch *et al.*, 2002). Traço abaixo do gráfico dos títulos de HJ: fases analisadas. Títulos de 20E em operárias de *A. mellifera* (modificado de: Pinto *et al.*, 2002). Linhas tracejadas no gráfico de títulos de 20E: fases analisadas.

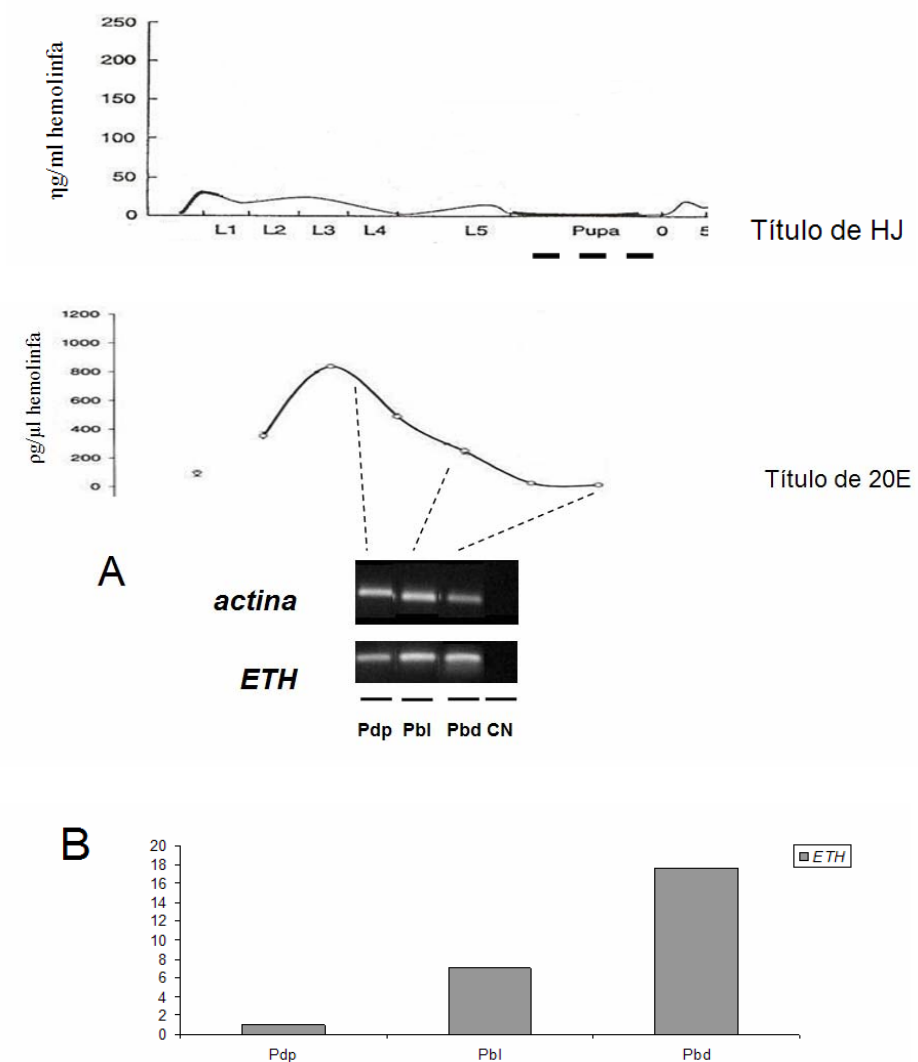


Figura 15 - Níveis de transcritos do gene *ecdysis triggering hormone* (*ETH*) nos estágios pupais (Pdp, Pbl e Pbd) de operárias de *A. mellifera*. A amostra CN se refere ao controle negativo (sem cDNA). Os transcritos de *actina* foram usados como controle endógeno. **A.** Amplificação por RT-PCR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. **B.** Densitometria do gel mostrado em A. No topo da página: Títulos de HJ em operária de *A. mellifera* (Bloch *et al.*, 2002). Traço abaixo do gráfico de títulos de HJ: fases analisadas. Títulos de 20E em operárias de *A. mellifera* (modificado de: Pinto *et al.*, 2002). Linhas tracejadas no gráfico de títulos de 20E: fases analisadas.

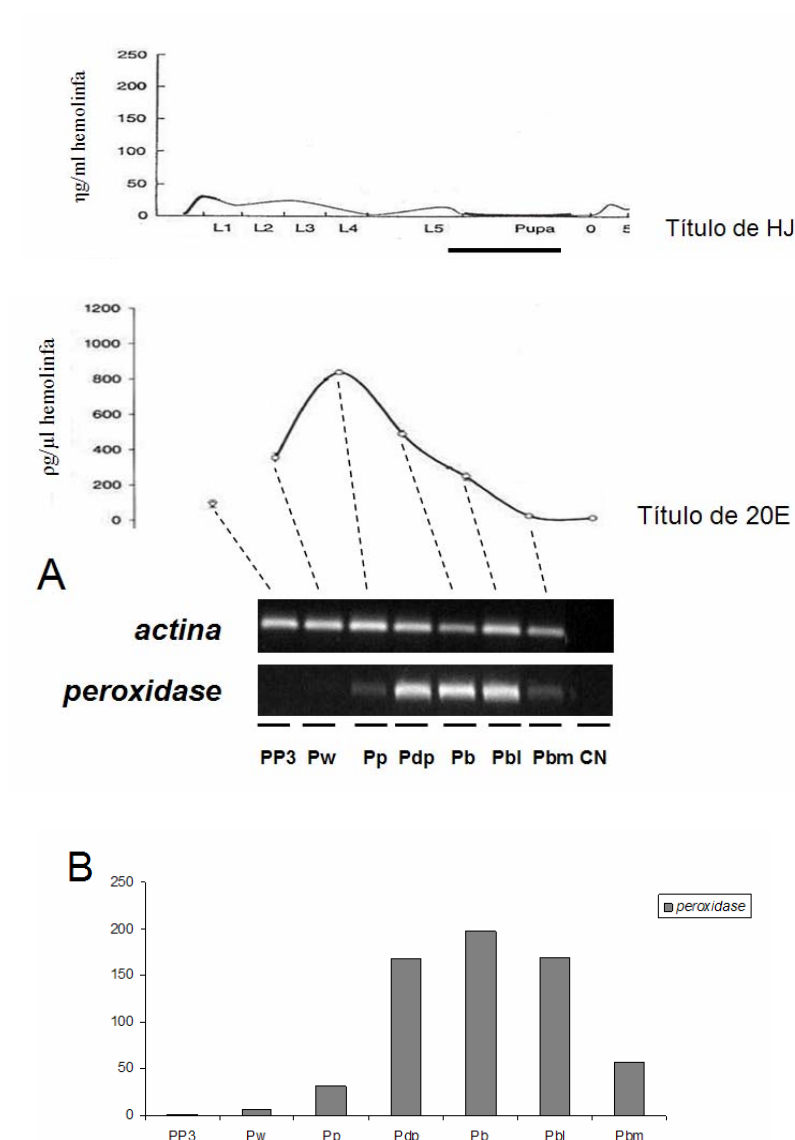


Figura 16– Níveis de transcritos do gene *peroxidase* no quinto estágio larvas (PP3) e nos estágios pupais (de Pw a Pbm) de operárias de *A. mellifera*. A amostra CN se refere ao controle negativo (sem cDNA). Os transcritos de *actina* foram usados como controle endógeno. **A.** Amplificação por RT-PCR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. **B.** Densitometria do gel mostrado em A. No topo da página: Títulos de HJ em operárias de *A. mellifera* (modificado de Bloch *et al.*, 2002). Traço abaixo do gráfico de títulos de HJ: fases analisadas. Títulos de 20E em operárias de *A. mellifera* (modificado de: Pinto *et al.*, 2002). Linhas tracejadas no gráfico de títulos de 20E: fases analisadas.

2.3. Em amostras tratadas com HJ e 20E

Larvas do quinto estágio (L5S1) de operárias foram tratadas topicamente com HJ e os níveis de transcritos dos genes *alatostatina*, *bombixina*, *EH*, *ETH* e *peroxidase* foram analisados em abelhas inteiras, 24h após o tratamento. Um grupo de pupas (Pb) de operárias foi tratado topicamente com HJ e em outro, as pupas receberam injeção de 20E, para análise dos níveis de transcritos de *alatostatina*, *bombixina* e *peroxidase* no corpo gorduroso. As pupas que receberam HJ foram analisadas 24h após o tratamento e as tratadas com 20E, 12 h após o tratamento. Todos os dados foram obtidos através de *Real Time* PCR. O nível de transcritos de *rp49* foi usado como controle endógeno.

Os níveis de transcritos da *alatostatina* não sofreram alterações significativas, em relação ao grupo controle, em amostras de operárias tratadas com HJ (Figura 17). A injeção de 20E em pupas de operária mostrou que este hormônio provocou aumento nos níveis de transcritos de *alatostatina* em relação ao grupo controle (Figura 18).

Quando aplicado topicamente em larvas e pupas de operárias, HJ parece não exercer efeito significativo no nível de transcritos de *bombixina* (Figura 19). Porém, 20E quando aplicado em pupas, provoca uma queda de quase 60% nos níveis de transcritos em relação ao grupo controle (Figura 20).

Os níveis de transcritos de *EH* sofreram uma queda abrupta após aplicação de HJ em larvas. Porém, os níveis de transcritos de *ETH* aumentaram cerca de cinco vezes em relação ao grupo controle após o mesmo tratamento (Figura 21).

Os níveis de transcritos da *peroxidase* não sofreram alterações significativas, em relação ao grupo controle, em amostras de larvas e pupas de operárias tratadas com HJ (Figura 22). Após tratamento com 20E em pupas, verificamos que houve um aumento de cerca de duas vezes nos níveis de transcritos em relação ao grupo controle (Figura 23).

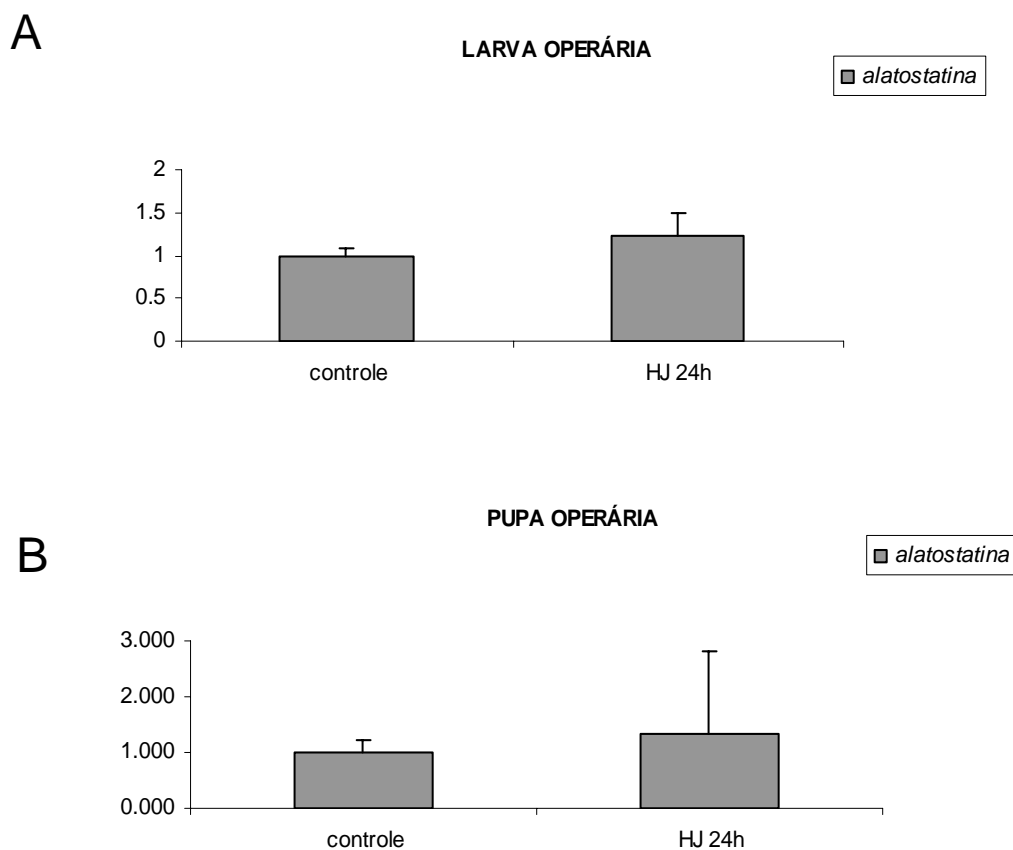


Figura 17– Efeitos do tratamento de larvas (L5S1) e pupas (Pb) de *A. mellifera* com HJ, sobre a expressão do gene *alatostatina*. Amplificação por *Real Time* PCR. O gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi usado como controle endógeno. Os gráficos foram gerados a partir da quantificação de três amostras independentes. Gráficos: média mais erro padrão. **A.** Tratamento em larvas (L5S1) de operárias. Amostras controle e 24h após aplicação tópica do hormônio (HJ 24h). **B.** Tratamento em pupas (Pb) de operárias. Amostras controle e 24h após aplicação tópica do hormônio (HJ 24h).

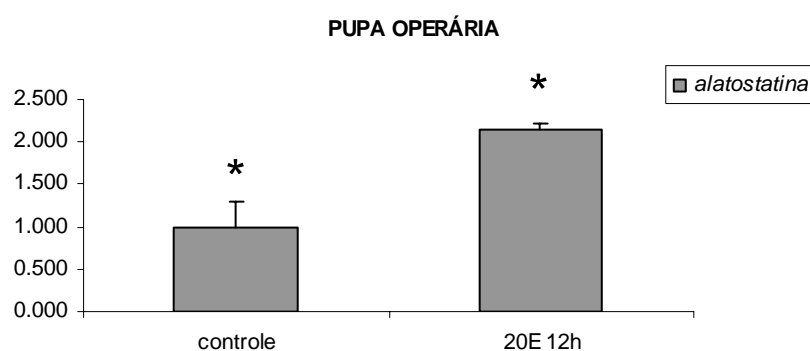


Figura 18– Efeitos do tratamento de pupas (Pb) de *A. mellifera* com 20E sobre a expressão do gene *alatostatina*. Amplificação por *Real Time* PCR. O gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi usado como controle endógeno. Os gráficos foram gerados a partir da quantificação de três amostras independentes. Gráficos: média mais erro padrão. Tratamento em pupas (Pb) de operárias. Amostras controle e 12h após injeção do hormônio (20E 12h). *diferença estatística entre os grupos ($p=0,023$; teste-t).

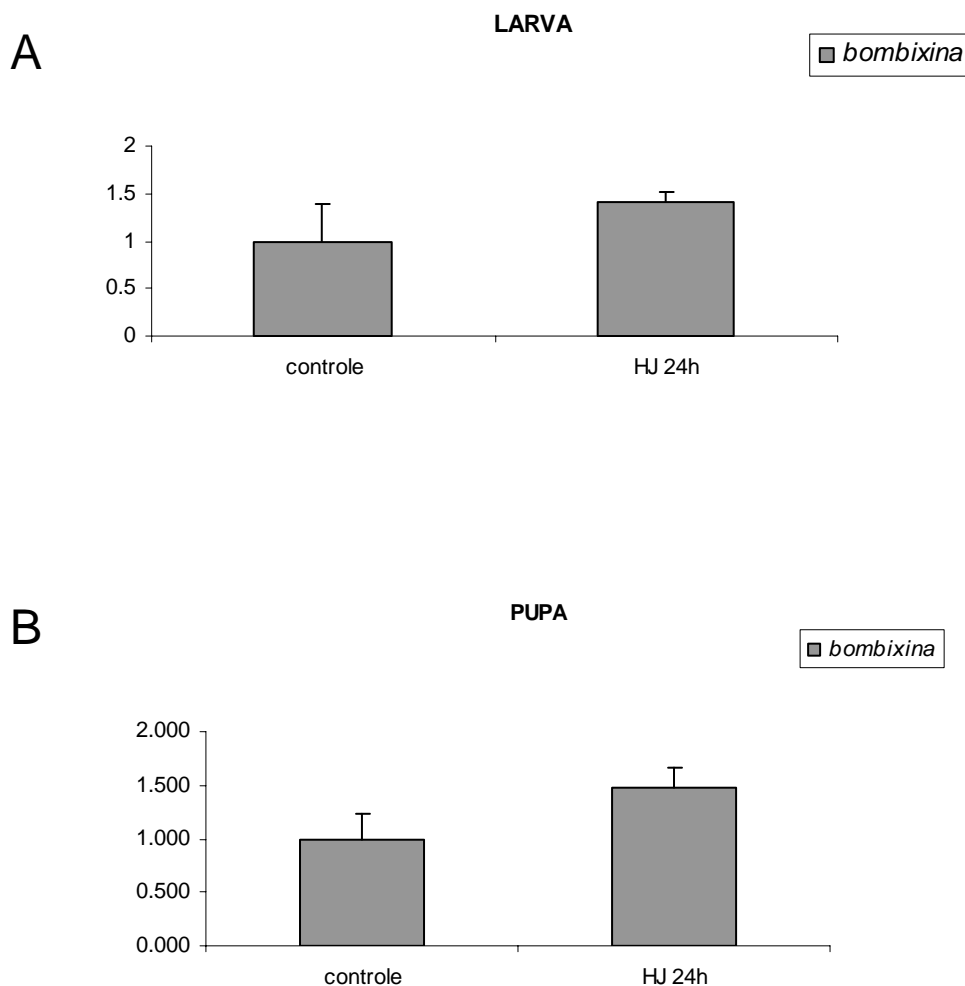


Figura 19– Efeitos do tratamento de larvas (L5S1) e pupas (Pb) de *A. mellifera* com HJ sobre a expressão do gene *bombixina*. Amplificação por *Real Time* PCR. O gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi usado como controle endógeno. Os gráficos foram gerados a partir da quantificação de três amostras independentes. Gráficos: média mais erro padrão. **A.** Tratamento em larvas (L5S1) de operárias. Amostras controle e 24h após aplicação tópica do hormônio (HJ 24h). **B.** Tratamento em pupas (Pb) de operárias. Amostras controle e 24h após aplicação tópica do hormônio (HJ 24h).

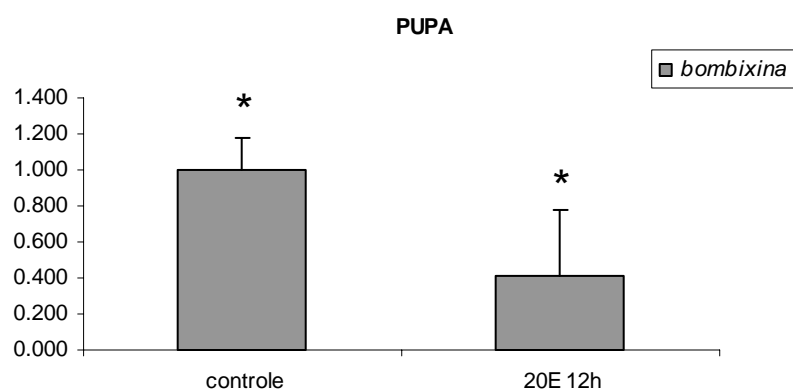


Figura 20– Efeitos do tratamento de pupas (Pb) de *A. mellifera* com 20E sobre a expressão do gene *bombixina*. Amplificação por *Real Time* PCR. O gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi usado como controle endógeno. Os gráficos foram gerados a partir da quantificação de três amostras independentes. Gráficos: média mais erro padrão. Tratamento em pupas (Pb) de operárias. Amostras controle e 12h após injeção do hormônio (20E 12h). *diferença estatística entre os grupos ($p=0,034$; teste-t).

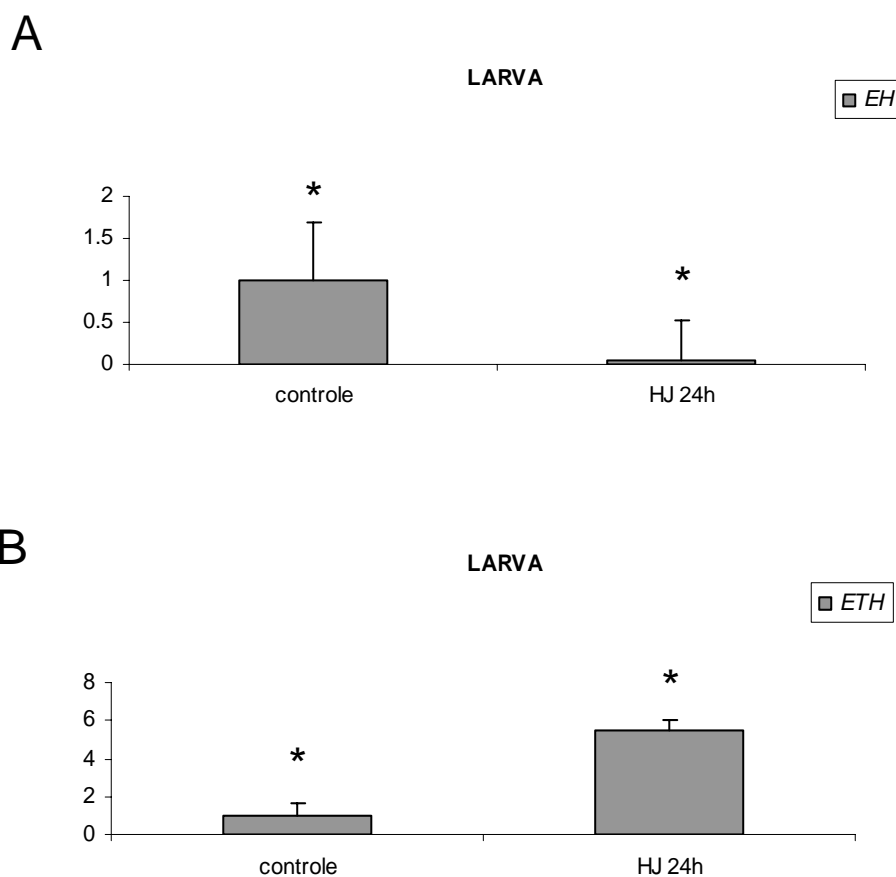


Figura 21– Efeitos do tratamento de larvas (L5S1) de *A. mellifera* com HJ sobre a expressão dos genes *EH* e *ETH*. Amostras controle e 24h após aplicação tópica do hormônio (HJ 24h). Amplificação por *Real Time* PCR. O gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi usado como controle endógeno. Os gráficos foram gerados a partir da quantificação de três amostras independentes. Gráficos: média mais erro padrão. **A.** Nível de transcritos do gene *eclosion hormone* (*EH*). *diferença estatística entre os grupos ($p=0,007$; teste-t). **B.** Nível de transcritos do gene *ecdysis-triggering hormone* (*ETH*). *diferença estatística entre os grupos ($p=0,033$; teste-t).

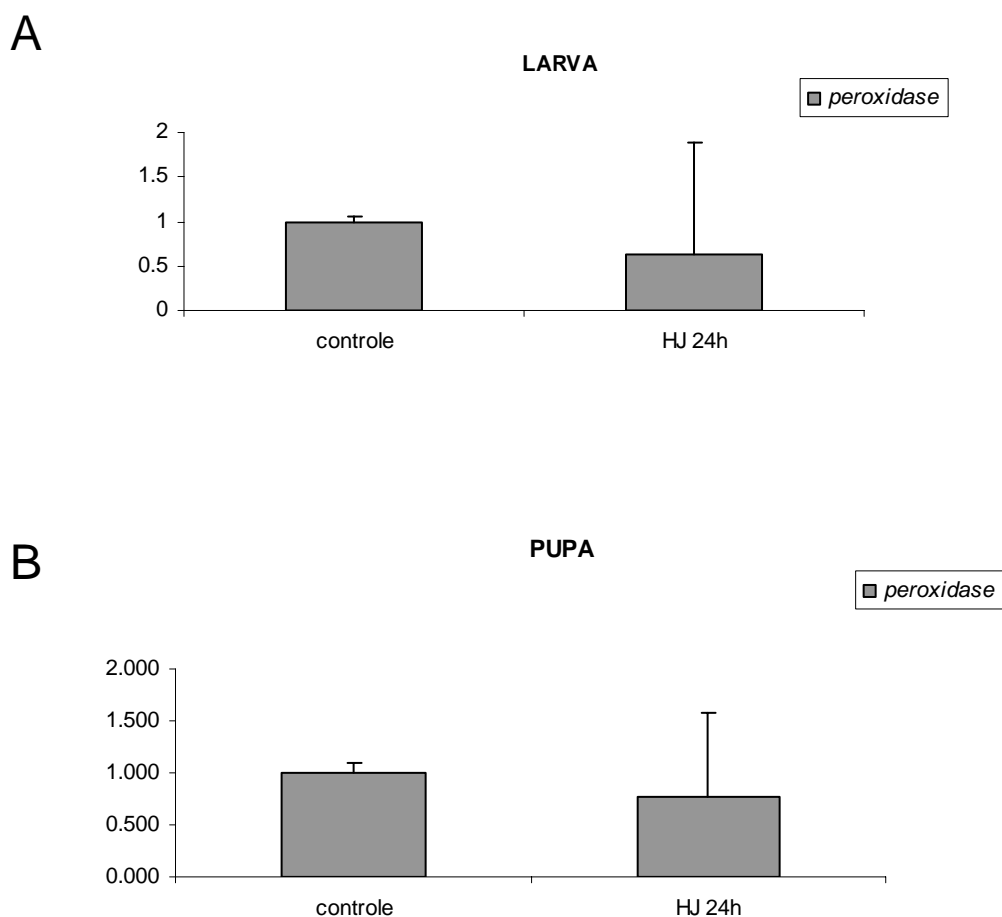


Figura 22– Efeitos do tratamento de larvas (L5S1) e pupas (Pb) de *A. mellifera* com HJ sobre a expressão do gene *peroxidase*. Amplificação por *Real Time* PCR. O gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi usado como controle endógeno. Os gráficos foram gerados a partir da quantificação de três amostras independentes. Gráficos: média mais erro padrão. **A.** Tratamento em larvas (L5S1) de operárias. Amostras controle e 24h após aplicação tópica do hormônio (HJ 24h). **B.** Tratamento em pupas (Pb) de operárias. Amostras controle e 24h após aplicação tópica do hormônio (HJ 24h).

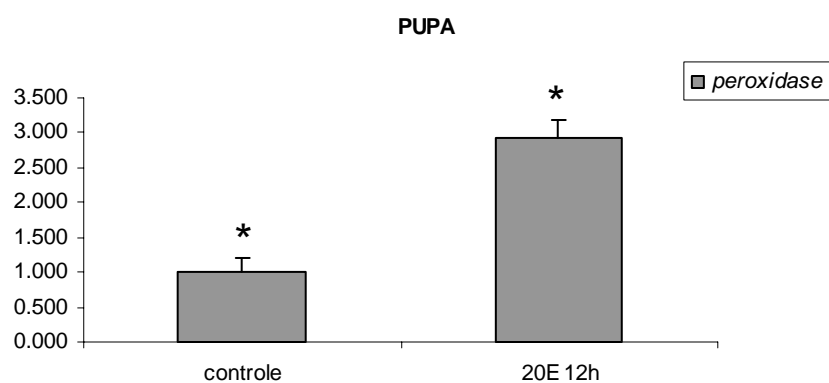


Figura 23– Efeitos do tratamento de pupas (Pb) de *A. mellifera* com 20E sobre a expressão do gene *peroxidase*. Amplificação por *Real Time* PCR. O gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi usado como controle endógeno. Os gráficos foram gerados a partir da quantificação de três amostras independentes. Gráficos: média mais erro padrão. Tratamento em pupas (Pb) de operárias. Amostras controle e 12h após injeção do hormônio (20E 12h). *diferença estatística entre os grupos ($p=0,011$; teste-t).

2.4. Em amostras submetidas à ligadura abdominal

Para verificar se a ausência de ecdisteróides é importante para o aumento no nível de transcritos de *ETH* em abelhas, pupas Pw foram submetidas à ligadura abdominal. Esta ligadura foi efetuada antes do período programado para a ocorrência do pico de ecdisteróides. Este procedimento teve por objetivo prevenir o fluxo de hemolinfa e, conseqüentemente, a passagem de ecdisteróides de seu local de síntese (na glândula protorácica) para o abdômen. Assim, a ligadura deveria impedir a exposição do tegumento abdominal ao pico de ecdisteróides que ocorre na fase Pp. Apenas analisamos a expressão de *ETH* pelo fato deste gene ter mostrado uma alta sensibilidade aos títulos de 20E.

A quantidade de transcritos de *ETH*, cai principalmente nos 3º, 4º e 5º dias após a ligadura, nas amostras controle, que equivale as fases Pb, Pbl e Pbm do desenvolvimento pupal. Neste período encontramos níveis altos de ecdisteróides na hemolinfa das amostras controle analisadas. No 6º dia podemos ver que a expressão de *ETH* se recupera nas amostras controle, mesmo dia em que os níveis de ecdisteróides caem, no grupo controle. Nas amostras submetidas à ligadura, e, portanto, sem influência dos ecdisteróides, os níveis de transcritos de *ETH* se mantêm, de modo geral, os mesmos ao longo de todo o período analisado. Os títulos de ecdisteróides se mantêm mais baixos em relação aos das amostras controle (Figura 24).

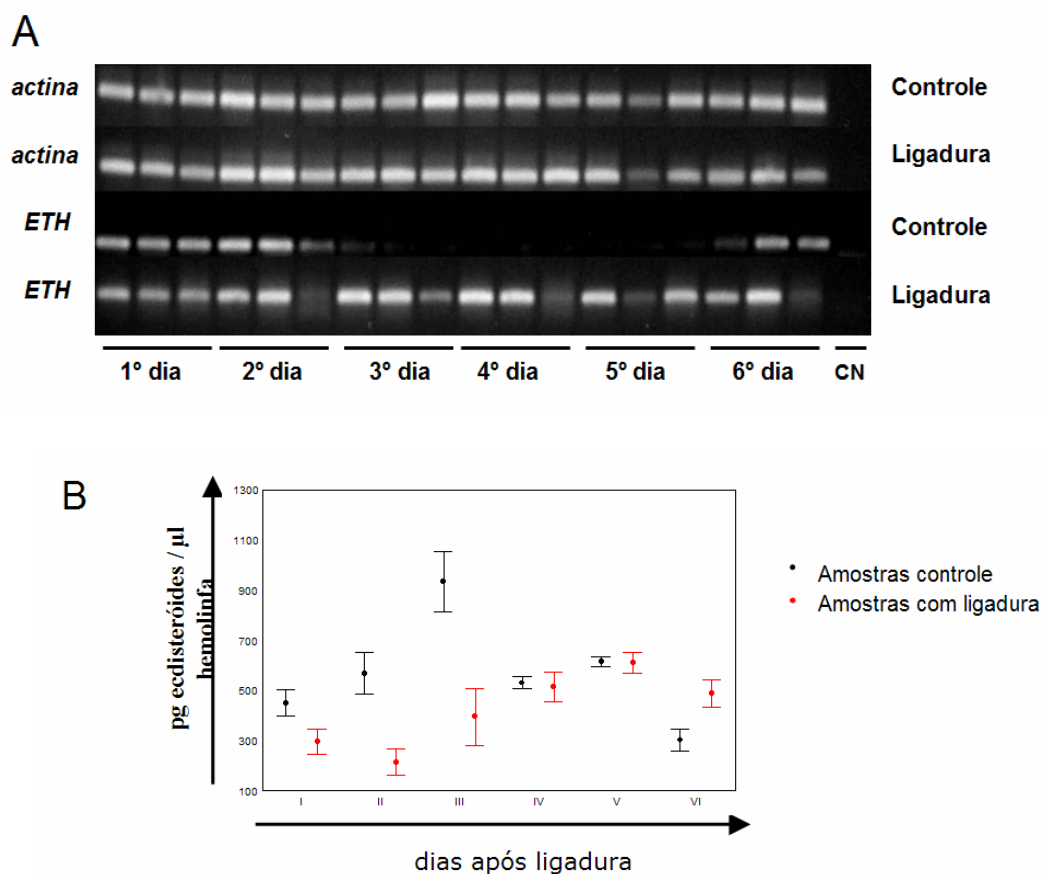


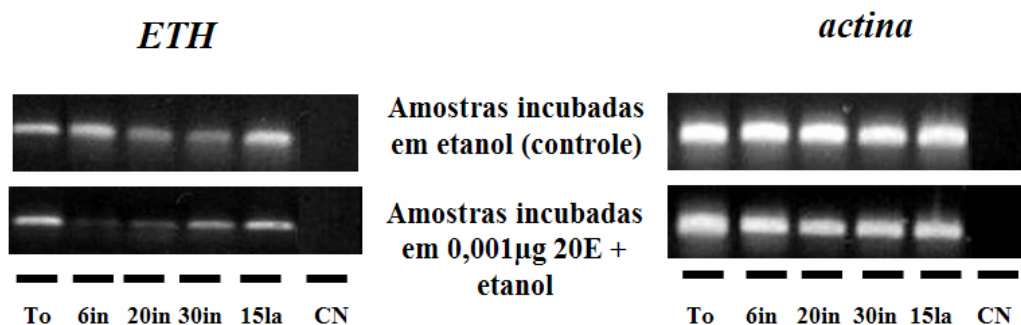
Figura 24– Níveis de transcritos do gene *ecdysis-triggering hormone* (*ETH*) em amostras de pupas de operárias submetidas à ligadura abdominal (1° ao 6° dias após ligadura) e amostras controle. O procedimento de ligadura foi realizado em pupas Pw (1° dia). Os gráficos foram gerados a partir da quantificação de três amostras independentes. Gráficos: média mais erro padrão. **A.** Amplificação por RT-PCR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. O gene codificador da *actina* foi usado como controle endógeno. **B.** Títulos de ecdisteróides (μ g/ μ l) na hemolinfa das amostras submetidas à ligadura abdominal (círculos vermelhos) e das amostras controle (círculos pretos) medidos por RIA. Círculos e barras representam, respectivamente, às médias e erros padrões (modificado de: Elias-Neto, M, 2008).

2.5. Em amostras de tegumentos incubadas com 20E e após lavagem

Na tentativa de compreender a ação dos ecdisteróides na regulação da expressão de *ETH* e *peroxidase*, foi realizada a incubação de tegumentos torácicos em meio de cultivo contendo 0,001 μ g de 20E + etanol por ml. Estes foram deixados nesse meio por 6, 20 ou 30 h. Alguns destes tegumentos incubados por 6 h foram subsequentemente lavados por um período prolongado de tempo de 15 h, para remoção do hormônio. Amostras cultivadas em etanol (solvente de 20E) foram utilizadas como controle.

Os níveis de transcritos de *ETH* e *peroxidase* caem após 6 h de incubação. Porém, no próximo estágio analisado, 20 h após a incubação em meio com 20E, há uma recuperação nos níveis de transcritos de *ETH* e *peroxidase*. Nos estágios subsequentes os níveis de transcritos aumentam ainda mais. Após 15 h de lavagem, o aumento é ainda mais pronunciado (Figuras 25 e 26).

A



B

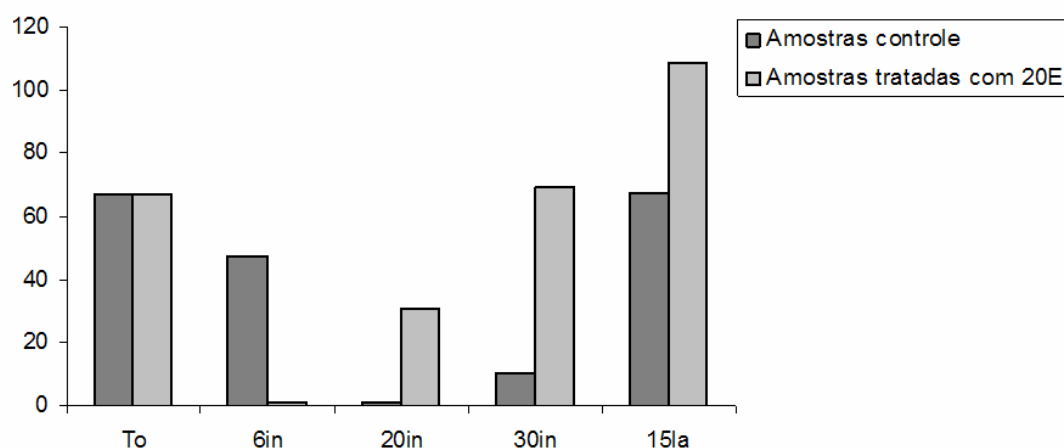
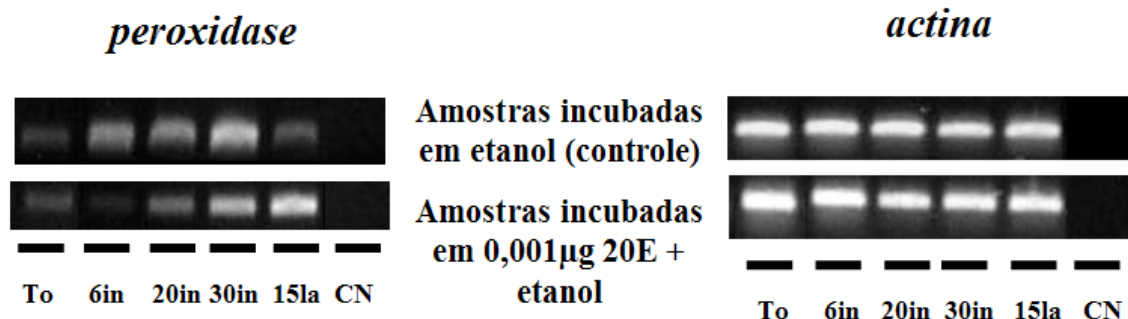


Figura 25 – Níveis de transcritos do gene *ecdysis-triggerin hormone* (ETH) em amostras de tegumentos de pupas de operárias de *A. mellifera* incubadas em meio com 0,001µg de 20E+etanol e meio apenas com etanol (controle). O tratamento iniciou-se em pupas Pw. As amostras eram individuais. O gene codificador da *actina* foi usado como controle endógeno. Os tempos de exposição foram: T₀: tempo zero; 6in: 6 horas de incubação em 20E+etanol ou etanol (controle); 20in: 20 horas de incubação em 20E+etanol ou etanol (controle); 30in: 30 horas de incubação em 20E+etanol ou etanol (controle); 15la: 6 horas de incubação em 20E+etanol ou etanol seguido de 15 horas de incubação em meio livre (lavagem). **A.** Amplificação por RT-PCR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. **B.** Densitometria do gel mostrado em A.

A



B

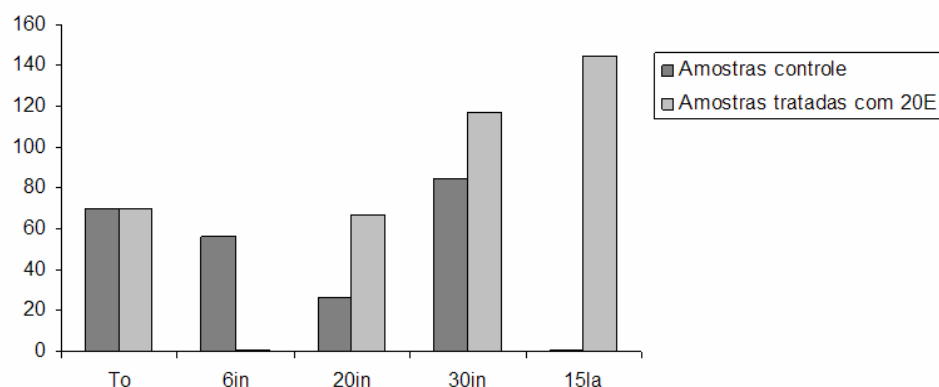


Figura 26 – Níveis de transcritos do gene *peroxidase* em amostras de tegumentos de pupas de operárias de *A. mellifera* incubadas em meio com 0,001µg de 20E+etanol e meio apenas com etanol (controle). O tratamento iniciou-se em pupas Pw. As amostras eram individuais. O gene codificador da *actina* foi usado como controle endógeno. Os tempos de exposição foram: T₀: tempo zero; 6in: 6 horas de incubação em 20E+etanol ou etanol (controle); 20in: 20 horas de incubação em 20E+etanol ou etanol (controle); 30in: 30 horas de incubação em 20E+etanol ou etanol (controle); 15la: 6 horas de incubação em 20E+etanol ou etanol seguido de 15 horas de incubação em meio livre (lavagem). **A.** Amplificação por RT-PCR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. **B.** Densitometria do gel mostrado em A.

Discussão

A história de vida dos holometábolos está associada com um padrão complexo de secreção hormonal, onde os ecdisteróides e hormônio juvenil têm papéis primordiais. Os ecdisteróides causam as mudas durante os estágios larvais e o hormônio juvenil é necessário para manter a forma larval. O declínio do HJ no início do último estágio larval permite a preparação para a metamorfose (Truman, 2005). Durante o último estágio larval, pequenos picos de ecdisteróide ocorrem, muito pequenos para induzir a muda, no entanto capazes de dirigir programas pré-metamórficos nos tecidos (Wolfgang & Riddiford, 1986). O maior desses pequenos picos, o “pico do comprometimento”, faz com que a larva pare de se alimentar, se encasule, e comprometa os tecidos larvais para a diferenciação pupal (Riddiford, 1994), o que é muito importante porque faz com que os tecidos larvais se tornem insensíveis à exposição subsequente ao HJ. Um grande pico de ecdisteróides, então, causa o estabelecimento da fase pupal (Truman, 2005).

O hormônio juvenil (HJ) é o principal produto dos *corpora allata* (CA), glândulas endócrinas de origem ectodérmica (Wigglesworth, 1970). Do ponto de vista evolutivo, HJ originalmente estaria envolvido na orquestração de processos reprodutivos tais como o controle do desenvolvimento gonadal e síntese de proteínas vitelogenéticas. O papel do HJ nas ordens de insetos mais derivadas expandiu-se consideravelmente e inclui regulação da metamorfose, determinação de castas, comportamento, diapausa e vários polifenismos (Nijhout, 1994).

O hormônio juvenil naturalmente encontrado em abelhas é o HJ-III (Hagenguth & Rembold, 1978). Um grande progresso foi feito desde 1985 no entendimento da regulação da biossíntese do HJ por neurohormônios, neuromoduladores e neurotransmissores (Feyereisen, 1985). Fatores fisiológicos, principalmente do sistema nervoso central (SNC), estimulam (alatotropina) ou inibem (alatoestatina) a síntese de HJ pelos CA (Goodman & Granger, 2005).

No presente trabalho, analisamos a seqüência gênica e realizamos estudos de expressão do gene da alostatina em *A. mellifera*. As alostatinas podem ser agrupadas em três famílias. Mais de 170 diferentes peptídeos pertencem à maior família, a FGLamida, ou alostatina-A, encontrada em diferentes espécies de insetos e em Crustacea. Esta família é caracterizada pela presença de um pentapeptídeo altamente conservado no C-terminal, Y/FXFGL-amida, com uma variabilidade considerável no tamanho e seqüência de aminoácidos (Tobe & Stay, 2004). A alostatina de *A. mellifera* (*Amel-AS*) cuja estrutura foi determinada por anotação semi-automatizada e tradução a partir do genoma de *A. mellifera*, contém o motivo YSFGL, que aparece três vezes em sua seqüência e YHFGL que aparece uma vez, e, portanto pertence à família A das alostatinas, conforme já proposto por Audsley & Weaver, 2006,

O comprimento e número das seqüências de aminoácidos de alostatinas em várias ordens de insetos mostram grande diversidade. Em ordens de insetos mais inferiores, os precursores são maiores do que nas ordens superiores, com uma correspondente redução no número de alostatinas (Davey *et al.*, 1999), indicando um padrão evolutivo distinto nos precursores da alostatina FGLamida (Yin *et al.*, 2006). Em *A. mellifera*, seqüenciamos uma alostatina, embora possa haver outras isoformas desta proteína. *Amel-AS* é uma alostatina “pequena”, possui 198 aminoácidos, se compararmos com outros insetos mais primitivos como *Periplaneta americana*, por exemplo, que possui 14 alostatinas contendo 379 aminoácidos (Ding *et al.*, 1995).

Em operárias de *A. mellifera*, verificamos que a alostatina provoca uma redução nos títulos de HJ na fase pupal, onde seus transcritos se encontram em níveis muito maiores que em larvas. Nas pupas há um sensível aumento nos títulos de 20E, que como visto no presente trabalho, eleva ao dobro os níveis de transcritos da alostatina quando aplicado em pupas de operárias. Da mesma forma, foi visto que a alostatina pode inibir

completamente a produção de HJ pelos CA em *D. melanogaster* (Goodman & Granger, 2005). Os alvos mais prováveis da ação da alostatina são os primeiros passos essenciais na síntese de HJ-III, ou seja, a transferência de citrato para o citoplasma através da membrana mitocondrial ou a clivagem do citrato para a produção de acetil-CoA citoplasmático, um bloco construtor das unidades isoprenóide e homoisoprenóide (Sutherland & Feyereisen, 1996). A alostatina apresenta inclusive efeito cruzado, pois o peptídeo purificado de *M. sexta*, por exemplo, inibe a produção de HJ via CA em outros insetos, incluindo *A. mellifera* (Rachinsky & Feldlaufer, 2000). A alostatina de *D. punctata* (Dippu AST) inibe a produção de HJ no cupim *Reticulitermes flavipes* (Yagi *et al.*, 2005). O silenciamento da alostatina do tipo-A por meio de RNAi em *Gryllus bimaculatus* e *S. frugiperda* provocou um aumento dos títulos de HJ-III na hemolinfa. Este silenciamento também provocou mortalidade larval aumentada em ambas as espécies (Meyering-Vos *et al.*, 2006). Quando aplicada em *M. sexta*, doses baixas (100nM) de alostatina (*Mas-AS*) resultaram em taxas de produção de HJ não significativamente diferentes dos controles. Em doses mais altas (10µM) a alostatina provoca uma redução de 70% na taxa de biossíntese de HJ, em relação aos controles, valor que pode estar abaixo do limiar no qual este hormônio é fisiologicamente ativo, o que torna *Mas-AS* um inibidor efetivo (Audsley *et al.*, 2000).

A ação da alostatina na biossíntese de HJ pode ocorrer de um modo parácrino, isto é, liberação local dentro dos CA a partir dos axônios das células cerebrais que produzem estes peptídeos, ou de uma maneira verdadeiramente endócrina, pela hemolinfa. De ambos os modos, receptores devem mediar o efeito do neuropeptídeo e, finalmente, é a combinação do título e do receptor que determina o efeito de um neuropeptídeo. Alguns trabalhos indicam que mecanismos de degradação que têm como alvo a alostatina podem controlar os níveis aos quais os CA são expostos. O tipo e

número de receptores para a alostatina nos CA controlam o “timing”, a duração e a potência que este neuropeptídeo terá na biossíntese de HJ. Fatores humorais podem exercer um papel na regulação da sensibilidade dos CA à alostatina (Goodman & Granger, 2005). Outros fatores regulam a biossíntese de HJ como neurotransmissores (octopamina, L-glutamato, dopamina), o próprio HJ e controle interendócrino por ecdisteróides (Goodman & Granger, 2005) cujo efeito vimos em *A. mellifera*, já que os dados obtidos, tanto de aplicação de 20E em pupas, quanto do estudo da expressão ao longo do desenvolvimento nos indicam que 20E estimula a síntese de alostatina, e esta, por sua vez, causa a inibição da síntese de HJ.

O título de HJ em um inseto é o balanço entre síntese, sequestro e degradação, envolvendo numerosos passos e enzimas, alguns dos quais devem ser influenciados por alostatinas e alatotropinas que agem nos CA (Audsley *et al.*, 2000). Como já vimos, há uma forte indicação de que *Amel-AS* iniba a produção de HJ. Os títulos de HJ se encontram em níveis basais em pupas de operárias (Rembold, 1987b), fato que não pode ser atribuído à degradação pela esterase do HJ, já que a expressão gênica desta encontra-se baixa também nesta fase (Mackert *et al.*, 2008). Uma resposta plausível para isso seria os níveis altos de transcritos da alostatina na fase pupal de operárias.

A ação da alostatina não está limitada à modulação da produção de HJ. As funções da alostatina foram agrupadas imprecisamente da seguinte forma: (1) inibição da biossíntese de HJ; (2) modulação da contração muscular no coração e intestino; (3) modulação da atividade neural no SNC; (4) inibição da síntese/liberação da vitelogenina; (5) inibição da produção de ecdisteróides pela glândula protorácica e ovário, *in vitro*; (6) modulação da atividade do sistema digestivo (Bellés *et al.*, 1999; Stay, 2000; Gade, 2002; Tobe & Stay, 2004). A mesma alostatina pode exercer vários efeitos tecido-específicos, diferentes em vários estágios do desenvolvimento e em diferentes espécies

de insetos (Goodman & Granger, 2005). Em *A. mellifera* encontramos expressão do gene codificador da alostatina principalmente em cérebro e menos intensamente nos ovários de operárias. Não foram encontrados transcritos no corpo gorduroso. Células neurosecretoras cerebrais, positivas para a alostatina foram encontradas para as três famílias de alostatina por imunocitoquímica ou hibridação *in situ*, em diferentes insetos estudados. Estas células estão geralmente localizadas no protocérebro lateral, se projetam aos CA no lado contralateral e ramificam nos *corpora cardíaca* (CC) e CA. Com o uso de imunocitoquímica, as alostatinas também foram encontradas em outras regiões, incluindo nervos periféricos, o intestino, o ovário e os ovidutos (Stay, 2000). Imunoreatividade para alostatina foi encontrada em neurônios do cérebro do verme *Procerodes littoralis*, e uma porção significativa de coloração foi localizada no interior e ao redor do trato alimentar (Mousley *et al.*, 2005). A ampla distribuição de alostatinas mostradas por esses resultados reforçam seu papel pleiotrópico (Goodman & Granger, 2005).

Através de imunocitoquímica, foi localizada alostatina no sistema nervoso estomatogástrico de *Blattella germanica* (Maestro *et al.*, 1998) e de crustáceo (Panchan *et al.*, 2003), e em vias neuronais entre regiões do SNC e sistema estomatogástrico de *H. armigera* (Davey *et al.*, 2005), o que sugere funções envolvidas na transdução de sinais relacionados ao *status* nutricional ao SNC e complexo retrocerebral (Maestro *et al.*, 1998). Esse peptídeo parece, portanto, estar envolvido em uma rede de comunicação interneuronal (Davey *et al.*, 2005). A possível existência de transcritos de alostatina no sistema nervoso estomatogástrico em *A. mellifera* ainda necessita ser investigada e poderia ser um *link* entre a qualidade do alimento ingerido e os títulos de HJ. No caso de rainhas, a geléia real administrada às larvas do quarto estágio em diante não ocasionaria a expressão de alostatina, e esta por sua vez não diminuiria os títulos de

HJ na hemolinfa de rainha. Já em operárias, o alimento mais “pobre” ocasionaria a expressão de alostatina, e conseqüentemente, menores títulos de HJ na hemolinfa. Se demonstrada a expressão gênica da *Amel-AS* no sistema nervoso estomatogástrico, este neuropeptídeo pode ser uma peça chave do quebra-cabeça da diferenciação de castas em abelhas.

Uma hipótese integrativa plausível para a atividade da alostatina em processos relacionados à alimentação pode ser a seguinte: um efeito inibitório direto na contração intestinal impediria a passagem de alimento, assim, indiretamente, promovendo a inibição de influxo de comida adicional. Conseqüentemente, o acúmulo de comida em diferentes partes do intestino permitiria uma exposição maior a uma quantidade aumentada de enzimas digestivas, portanto otimizando o processo digestivo. A ocorrência de alostatina nos tecidos intestinais, junto com baixas doses de peptídeos sugere que a alostatina pode estar efetivamente envolvida na regulação dos processos digestivos e de alimentação (Aguilar, *et al.*, 2003). A alostatina de *M. sexta* (*Mas-AS*) inibe a alimentação e, conseqüentemente o crescimento quando injetada em larvas de *Lacanobia oleracea* (Audsley *et al.*, 2001). Se isto ocorre em *A. mellifera* também necessita ser estudado, e pode ser mais um fator que relaciona a diferenciação de castas com a expressão de alostatina.

Tão importante quanto a regulação dos títulos de HJ durante a metamorfose é a regulação dos títulos de 20E. Sabe-se que o PTTH é o hormônio responsável por estimular as glândulas protorácicas a produzirem 20E. Porém, um peptídeo menor, a bombixina também exerce este mesmo papel em algumas espécies de insetos (Rybczynski, 2005). Quando realizamos uma busca no genoma de *A. mellifera* não encontramos o gene do PTTH, porém, encontramos o gene da bombixina, que em

alguns insetos assumiu o papel do PTTH. Assim, decidimos investigar um possível papel deste gene na regulação do processo de muda e metamorfose em *A. mellifera*.

O seqüenciamento do gene da bombixina em *A. mellifera* (*Amel-bomb*) revelou que este possui domínio *insulin-like growth factor* (IGF). A bombixina é uma molécula heterodimérica que consiste de cadeias A e B que são conectadas por pontes dissulfeto exatamente da mesma maneira que a insulina (Nagasawa *et al.*, 1988). A purificação e o seqüenciamento dos aminoácidos da bombixina revelaram que há, na verdade, uma família de proteínas bombixina com seqüência homóloga às cadeias A e B da insulina humana (Ishizaki & Suzuki, 1994). A modelagem tridimensional da estrutura da bombixina assume uma estrutura terciária semelhante à da insulina (Jhoti *et al.*, 1987). O genoma de *D. melanogaster* possui sete genes que, como as bombixinas, contêm motivos característicos de insulina (Brogiolo *et al.*, 2001). Em *Amel-bomb*, encontramos cinco cisteínas em posições bem conservadas. A característica geral dos peptídeos relacionados à insulina de não-vertebrados e seus genes são bem conservados. Por exemplo, a maioria das bombixinas possui seis resíduos de cisteína conservados que formam uma ponte dissulfeto intra e duas inter cadeias, da mesma maneira que a insulina (Nagasawa *et al.*, 1988); MIPs (molluscan insulin-related peptide) de *Lymnaea stagnalis* possuem duas cisteínas extras, que possivelmente formam uma terceira ponte dissulfeto intercadeia (Smit *et al.*, 1988). Além disso, no peptídeo relacionado à insulina em esponja falta uma cisteína, sugerindo a ausência de uma ponte dissulfeto intracadeia neste peptídeo (Robitzki *et al.*, 1989), como em *A. mellifera*.

Em operárias de *A. mellifera* observamos que próximo à pupação o número de transcritos de bombixina aumenta de PP1 a PP2, no quinto estágio larval de operárias, onde também encontramos um aumento nos títulos de 20E na hemolinfa. Os níveis de transcritos se mantêm altos no primeiro estágio pupal (Pw) em operárias, estágio em

que há um pico elevado nos títulos de 20E, assim como demonstrado no cérebro de *B. mori* (Ishizaki *et al.*, 1983a). Em rainhas ocorre uma antecipação de altos níveis de transcritos de *Amel-bomb*, na fase L5S2, em relação às operárias, coincidente com a antecipação dos altos títulos dos ecdisteróides. A flutuação da concentração de peptídeos semelhantes à insulina (*insulin like peptides* - ILPs) na hemolinfa de *Locusta migratoria* está intimamente correlacionada com a concentração de ecdisona na hemolinfa durante a ovôgenese (Sevala & Loughton, 1992). Por isso é postulado que os ILPs estimulam a síntese e liberação de ecdisteróides, ao menos durante este estágio (Iwami *et al.*, 1996b). Tanto o PTTH quanto a bombixina de *B. mori* foram capazes de estimular a síntese de ecdisteróides em *Rhodnius prolixus*, porém o PTTH é mais potente que a bombixina. A responsividade das glândulas protorácicas de *R. prolixus* ao PTTH de *B. mori*, uma espécie distante, indica que os sítios de reconhecimento para o PTTH devem ser similares em ambas as espécies (Vafopoulou & Steel, 1997). O desenvolvimento do adulto de *S. cynthia*, suspenso em pupas que tiveram seus cérebros removidos, pode ser retomado pela injeção de bombixina (Ishizaki & Ichikawa, 1967) através da ação trófica desta proteína nas glândulas protorácicas que leva a síntese e liberação de ecdisona (Nagasawa *et al.*, 1984). O fato dos níveis de transcritos de bombixina aumentarem, concomitante com os títulos de 20E, reforça a hipótese de que a bombixina em *A. mellifera* atue como estimuladora da síntese de 20E. Assim como já foi verificado em *B. mori*, onde o título de bombixina na hemolinfa é baixo durante o quarto e quinto estágios larvais, e aumentam abruptamente um dia após a pupação, atingindo o nível máximo, que dura até a emergência do adulto (Saegusa *et al.*, 1992). Em operárias de *A. mellifera* podemos ver que os níveis de transcritos de bombixina são altos em PP2, próximo à pupação, porém em pupas Pbd, próximo à eclosão os níveis de transcritos são baixos, o que condiz com os resultados obtidos em *M. sexta*, em que um

peptídeo *insulin-like* é responsável pelo aumento de 20E na ecdise larval-pupal, porém na eclosão o PTTH é o responsável pelo aumento nos títulos de 20E (Koyama *et al.*, 2008), o que provavelmente ocorre em *A. mellifera*.

Quando aplicamos HJ em larvas e pupas de operária, no entanto, este hormônio parece não exercer efeito sobre o nível de transcritos da bombixina. Porém, 20E aplicado em pupa provoca uma diminuição significativa de cerca de 60% nos níveis de bombixina, fato já verificado em *M. sexta*, em que, após aplicação de uma alta dose de 20E (10mM) por um curto período nas glândulas protorácicas ocasionou uma inibição de cerca de 75% na ecdisteroidogênese (Song & Gilbert, 1998). A diminuição na expressão gênica de bombixina na presença de 20E faz sentido, pois se a bombixina realmente estimula a produção de 20E, esse seria um mecanismo de, após atingir a quantidade necessária de 20E, este inibir a produção de bombixina e uma possível síntese “extra” de 20E.

Em *A. mellifera* os transcritos de bombixina foram encontrados em todos os tecidos analisados em operárias (corpo gorduroso, ovário e cérebro). Porém, assim como em *B. mori*, a quantidade de transcritos não parece ser muito alta. Em *D. melanogaster*, da mesma forma, a expressão deste gene não está restrita às células neuronais (Brogiolo *et al.*, 2001). Foi encontrada expressão de bombixina por RT-PCR em gânglios, epiderme, testículo, ovário, corpo gorduroso, glândula da seda, túbulo de Malpighi, e intestino em larvas de *B. mori*. Porém, a quantidade de mRNA nestes tecidos parecem também ser baixos (Iwami *et al.*, 1996a). Em abelhas *A. mellifera*, imunoreatividade para PTTH já foi encontrada no cérebro, neurômero subesogafeal, e glândula protorácica, ou seja, tecidos presentes apenas na cabeça de larva e pupa (Paulino Simões *et al.*, 1997). Porém, já haviam sido encontradas moléculas relacionadas à insulina no intestino, além do cérebro (Moreau *et al.*, 1981). Esses

resultados sugerem que a bombixina pode ter um papel próprio nos tecidos, que ainda precisa ser determinado (Iwami *et al.*, 1996a).

Após a produção dos ecdisteróides, este participa como mediador de vários processos fisiológicos nos insetos. A maioria dos eventos durante a muda é regulada por ecdisteróides. O crescimento e metamorfose dos insetos são caracterizados por um número de mudas durante as quais uma nova cutícula é produzida de cada vez. Entretanto, uma série de comportamentos complexos e precisamente cronometrados que, ao final do processo levarão ao desprendimento da cutícula velha (ecdise, ou eclosão quando se trata da muda do adulto), é controlada por neuropeptídeos. Uns dos principais neuropeptídeos envolvidos no controle da ecdise são: *eclosion hormone* (EH) e *ecdysis-triggering hormone* (ETH), que são especificamente importantes no “timing” da ecdise (Gäde & Hoffmann, 2005).

Assim como em *M. sexta* (Horodyski *et al.*, 1989) e *B. mori* (Kamito *et al.*, 1992), a seqüência de aminoácidos de EH deduzida a partir do cDNA clonado e seqüenciado de *A. mellifera* (*Amel-EH*) possui 88 resíduos. A seqüência amino terminal de 26 aminoácidos foi considerada como um peptídeo sinal em *M. sexta* e *B. mori*, e essa possui aminoácidos hidrofóbicos na região central (Horodyski *et al.*, 1989; Kamito *et al.*, 1992), também encontrados em *A. mellifera*. Já em *D. melanogaster*, o cDNA do EH codifica uma proteína de 97 aminoácidos. Uma característica notável das seqüências de EH quando comparadas é a presença de seis cisteínas conservadas, que formam as pontes dissulfeto (Horodyski *et al.*, 1993), também encontradas em *A. mellifera*, o que reflete a conservação da estrutura secundária de EH entre os insetos. Também localizamos o domínio da família de *eclosion hormone* na seqüência obtida em *A. mellifera*. EH é sintetizado por um (ou dois) par(es) de células neurosecretoras ventro-

medianas do cérebro, cujos axônios se projetam ao longo de toda a extensão do SNC (Ewer & Reynolds, 2002).

O EH foi o primeiro peptídeo identificado como um iniciador da ecdise, e parece funcionar tanto como um hormônio circulatório quanto como um neuromodulador do SNC. Um papel bem documentado do EH é o de liberar ETH pelas células Inka, que em *A. mellifera* são numerosas e pequenas (Zitnan & Adams, 2005; Zitnan *et al.*, 2003). As células Inka são glândulas distribuídas em cada segmento torácico e abdominal, encontradas em associação íntima com o sistema traqueal e os espiráculos. O ETH circulante age diretamente no SNC e inicia uma cascata neuropeptídica que regula passos seqüenciais da ecdise. Incluso na cascata *downstream* está a liberação de EH tanto na hemolinfa quanto no SNC. Portanto, EH e ETH se envolvem num *loop* de *feedback* positivo, assegurando a completa depleção de ETH das células Inka. O ETH também provoca uma distensão nas traquéias em *D. melanogaster* antes do início do processo da ecdise. A habilidade do ETH de desencadear alterações nas traqueais e no comportamento depende dos peptídeos *downstream* liberados pelo SNC. Atualmente é sabido que muito outros peptídeos estão envolvidos na regulação da ecdise, como *crustacean cardioactive peptide* (CCAP), *ion transport peptides* (ITPs), *mioinhibitory peptides* (MIPs), corazonina e FRLF-amida (Zitnan & Adams, 2005).

O ETH possui um motivo comum FXPRLamida e o C-terminal amidado (Zitnan *et al.*, 1996). Como podemos ver no alinhamento das seqüências de ETH, as seqüências de Diptera são maiores, contendo pouco mais de 200 aminoácidos, enquanto que em *A. mellifera* (*Amel*-ETH) a seqüência contém 117 aminoácidos, mais semelhante em tamanho à predita de *N. vitripennis*, que possui 142 aminoácidos. O ETH de *B. mori* possui uma seqüência predita de 23 aminoácidos (Adams & Zitnan, 1997), já em *D. melanogaster*, a seqüência predita contém 203 aminoácidos (Park *et al.*, 1999). De

modo geral, as seqüências de ETH comparadas neste trabalho não se assemelham entre si. O motivo FXPRL-amida não é encontrado em nenhuma delas. Portanto como podemos ver as seqüências de ETH são muito variáveis quanto ao tamanho e aos resíduos de aminoácidos (Zitnan *et al.*, 1996).

Um dos comportamentos inatos mais comuns é a seqüência da ecdise necessária para a apólise da cutícula velha durante o desenvolvimento embrionário e larval de nematóides, artrópodes e muitos outros invertebrados classificados no clado Ecdysozoa (Aguinaldo *et al.*, 1997).

A transição do estágio de alimentação para estágio farato durante cada fase do desenvolvimento é induzida pelo aumento dos níveis de ecdisteróides. Os primeiros eventos que ocorrem coincidentes com o pico dos ecdisteróides incluem aquisição de sensibilidade do SNC ao ETH e produção aumentada de ETH nas células Inka. Embora as células Inka acumulem grandes quantidades de ETH durante esta fase, elas são incapazes de liberar seus conteúdos até que os ecdisteróides declinem a baixos níveis, quando EH atua, liberando ETH (Kingan & Adams, 2000). O ETH age diretamente no SNC e ativa circuitos neuronais específicos da pré-ecdise e ecdise. O ETH provoca a liberação de numerosos peptídeos, incluindo EH, e outros que coordenam a seqüência dos comportamentos de pré-ecdise, ecdise e pós-ecdise (Zitnan & Adams, 2000).

Pulsos de ecdisteróide induzem taxas nitidamente aumentadas de produção de ETH em *M. sexta*, *B. mori* e *D. melanogaster* (Zitnan & Adams, 2005). Porém altos níveis de ecdisteróide inibem a ecdise, pois previnem a liberação de ETH das células Inka (Kingan & Adams, 2000), o que pode ser uma maneira de evitar a ecdise prematura (Zitnan & Adams, 2005). Os ecdisteróides em declínio desencadeiam eventos transcrpcionais tardios nas células Inka, cujo produto é a secreção de ETH (Kingan & Adams, 2000). Em *A. mellifera* encontramos níveis maiores de transcritos de EH nas

fases pupais Pdp e Pb de operária, em que há queda dos títulos de 20E na hemolinfa, logo após um pico em Pw. Os níveis de transcritos de ETH encontram-se maiores nos estágios pupais em que há queda nos títulos de 20E. Portanto, os baixos níveis de 20E permissivos para a aquisição de competência correspondem àqueles que permitem a expressão de ETH que ocorre em resposta a um nível alto, seguido de baixos níveis de ecdisteróides. Similarmente, um número de respostas reguladas por ecdisteróides em *M. sexta* requer primeiro a presença e depois a ausência de ecdisteróides (Hegstrom and Truman, 1996). Os ecdisteróides parecem exercer tanto ações regulatórias positivas quanto negativas nas células Inka nos dias e horas antes da ecdise, assegurando uma resposta secretora adequada e sincronizada (Kingan & Adams, 2000). A expressão de ETH em *D. melanogaster* também poderia estar sob controle de ecdisteróides, já que há uma seqüência de EcR na região promotora do gene (Park *et al.*, 1999). 20E previne a aquisição da competência secretória pelas glândulas epitraqueais *in vitro*. Várias linhas de evidência sugerem que este evento mediado por 20E é crítico na determinação do momento da muda. A liberação prematura de ETH seria malsucedida, ou até mesmo fatal, se ocorresse quando a cutícula velha pudesse ser destacada apenas parcialmente. A necessidade de um período prolongado de baixos níveis de ecdisteróides antes da montagem final da cascata preveniria o risco da liberação prematura do ETH e ecdise precoce (Kingan & Adams, 2000). Além disso, podemos observar que um maior número de transcritos de EH provavelmente ocasiona um aumento na expressão de ETH, já que os picos da expressão de ETH ocorrem imediatamente após o aumento da expressão de EH. Há uma relação recíproca excitatória entre EH e ETH. Portanto, parece que as células Inka possuem receptores para o EH circulante e, reciprocamente, os neurônios ventro-medianos no cérebro reconhecem e respondem ao ETH da hemolinfa, ocasionando uma liberação coordenada de ambos os peptídeos, uma vez que

qualquer um deles for liberado. O EH é liberado no SNC e na hemolinfa e ETH é liberado na hemolinfa. Esses sinais são os dispositivos irreversíveis para iniciar a ecdise e assegurar o momento exato da ecdise. O segundo passo deste evento, conhecido como fase efetora, resulta em programas motores estereotipados na pré-ecdise e ecdise (Zitnan & Adams, 2000; Ewer *et al.*, 1997).

Além disso, após aplicação tópica de HJ em larvas de operárias, observamos que o nível de transcritos de EH cai cerca de 90% em relação ao controle. Este seria um mecanismo importante e eficaz para prevenir a ecdise antes do momento adequado, em fases em que as larvas ainda não estão completamente desenvolvidas para passarem para um novo estágio de desenvolvimento. Surpreendentemente, a aplicação de HJ em larvas ocasiona um aumento de cerca de cinco vezes no nível de transcritos de ETH em relação ao controle. Porém, este aumento na expressão do gene ETH não significa que o inseto irá sofrer ecdise, uma vez que é o nível alto de expressão e liberação de EH que ocasionará a liberação do ETH das células Inka. Portanto, os dados obtidos indicam que HJ induz a produção e acúmulo de ETH nas células Inka, e ao mesmo tempo inibe a síntese de EH. Quando os títulos de HJ caem e os de 20E sobem, há estímulo da síntese de EH, e este provoca a liberação de ETH. Com as quedas dos títulos de 20E em pupas, ocorre síntese de EH e ETH. ETH age estimulando a liberação de EH e vice-versa, assim assegurando o esvaziamento total do conteúdo das células Inka, bem como a muda propriamente dita, neste caso, a que ocasionará a mudança de pupa para adulto.

A fim de investigarmos melhor a influência de 20E na expressão gênica de ETH, a expressão deste gene foi analisada após o experimento de ligadura abdominal, em que fatores cerebrais (como 20E) são impedidos de passar para o abdômen da abelha, local onde se encontram as células Inka produtoras de ETH. Os dados obtidos são claros e demonstram que no grupo controle, em que há conexão da cabeça/tórax com o abdômen, os níveis de

transcritos de ETH são altos no primeiro e segundo dias, caem abruptamente no terceiro dia e assim se mantêm até o quinto dia, apresentando uma recuperação da expressão no sexto e último dia analisado. Os dados obtidos são de certa forma, inversamente proporcionais aos títulos de 20E medidos nas mesmas amostras, que são menores nos dois primeiros dias, aumentam no terceiro dia, e diminuem até o fim do experimento. Já no grupo experimental, em que não há passagem de 20E para o abdômen, observamos que os níveis de transcritos de ETH se mantêm relativamente altos ao longo de todo período, assim como os títulos de 20E medidos nessas amostras de modo geral se mantêm baixos em relação ao grupo controle. Mas inesperadamente, no sexto dia, um aumento consistente dos níveis de transcritos destes genes foi observado no tegumento abdominal. É possível que um pulso tardio de ecdisteróides, derivado de fontes alternativas (de células especializadas da epiderme, enócitos, por exemplo) possa estar induzindo a atividade destes genes no sexto dia após a ligadura (Soares, 2007). Diversos autores observaram fontes alternativas de ecdisteróides na etapa final do desenvolvimento pré-imaginal de insetos (Gilbert *et al.*, 2002). Este experimento nos indica que picos de 20E inibem a expressão de ETH, e que títulos baixos desse hormônio parecem ser necessários para a expressão do gene em *A. mellifera*.

Outro experimento que simula uma curva de 20E, com seu pico e sua queda foi realizado e a expressão de ETH foi testada. Neste experimento tegumentos de pupas foram incubadas com 0,001 μ g de 20E + etanol por 6, 20 e 30 horas (h), e depois, tegumentos inicialmente incubados por 6 h com 20E + etanol foram incubados em meio livre de hormônio por 15 h. Verificamos que 6 h após incubação em meio com 20E, a expressão gênica de ETH cai abruptamente, porém com 20h de incubação a expressão já se recupera, e continua aumentando até 30h. Após a lavagem (por 15h), a expressão se recupera bastante, em relação aos tempos de incubação com 20E. Esse experimento

mostra que aparentemente, durante o pico de 20E, o período de maior atividade do hormônio (6h de incubação), a expressão de ETH é inibida, porém conforme o tempo de incubação passa, e provavelmente há uma perda da atividade de 20E, a expressão de ETH se recupera. Parece então que o pico e a queda de 20E são importantes para a expressão de ETH. 20E previne a aquisição da competência secretória pelas glândulas epitraqueais *in vitro*. Várias linhas de evidência sugerem que este evento mediado por 20E é crítico na determinação do momento da muda (Kingan & Adams, 2000).

Em *A. mellifera* encontramos transcritos de EH somente no cérebro. Entre vários tecidos neuronais e não-neuronais avaliados em *M. sexta*, o transcrito do EH foi encontrado apenas no cérebro, embora os dados não possam excluir um baixo nível de expressão de EH em outros tecidos (Horodyski *et al.*, 1989). Em *B. mori*, não foram encontrados transcritos de EH no intestino, glândula da seda ou epiderme de larvas. Nos cérebros de larvas e pupas detectou-se expressão de EH, o que sugere que o EH não é expresso em tecidos não-neuronais (Kamito *et al.*, 1992).

Nossos estudos mostraram que ETH é apenas expresso nas células Inka de *A. mellifera*. Imunocitoquímica com anticorpo específico ao ETH mostrou que esse peptídeo é produzido somente nas células Inka em *M. sexta* e *B. mori* (Zitnan *et al.*, 2002; Zitnan *et al.*, 1999). Extratos de traquéia, contendo ETH, de barata (*Nauphoeta*), grilo (*Acheta*), percevejo (*Pyrrhocoris*), besouro (*Tenebrio molitor*), mosca (*D. melanogaster*) e mosquito (*A. aegypti*) induziram pré-ecdise, seguido de comportamento de ecdise em larvas de *B. mori*. Esse dado sugere que o sistema de sinalização do ETH é conservado em diferentes grupos de insetos, e possivelmente, em todos os insetos (Zitnan & Adams, 2005; Zitnan *et al.*, 2003).

A seqüência da ecdise é composta de duas fases essenciais: preparatória e comportamental. A fase preparatória está associada com atividade transcricional

estágio-específica, mediada por esteróides e múltiplos fatores de transcrição. Em particular, os esteróides induzem a expressão de receptores essenciais em células-alvo e a produção de moléculas reguladoras em órgãos neuroendócrinos, bem como controlam a competência desses órgãos em liberar suas moléculas ativas no momento apropriado. A fase comportamental é caracterizada pela ativação de redes peptidérgicas pelo ETH no SNC para iniciar, executar e finalizar cada passo comportamental. O ETH possui a habilidade exclusiva de ativar os neurônios do SNC e então agir provocando a liberação de vários peptídeos. Esses neuropeptídeos são subsequentemente liberados no SNC, regulando fases comportamentais específicas e na hemolinfa, controlando a atividade de órgãos periféricos associados com esses comportamentos. Durante a seqüência da ecdise, um coquetel de diferentes neuropeptídeos é geralmente co-liberado de um conjunto específico de neurônios, regulando uma subunidade comportamental particular. Por outro lado, o mesmo neuropeptídeo pode ser liberado de neurônios distintos em momentos diferentes regulando várias funções durante o desenvolvimento (Zitnan *et al.*, 2007). Estudos de outros neuropeptídeos que participam dessa rede gênica são necessários para o melhor entendimento dos processos de muda e ecdise em *A. mellifera*.

Sabe-se que os ecdisteróides, além de coordenarem a expressão dos genes EH e ETH, coordenam a expressão de ‘genes cuticulares’ em preparação para a síntese da cutícula do próximo estágio do desenvolvimento holometábolo (Zitnan & Adams, 2005). Neste processo, os títulos de ecdisteróides são determinantes: níveis elevados destes hormônios inibem a ecdise, que só ocorre quando o título de 20E cai. Isto foi primeiramente demonstrado em *T. molitor* (Sláma, 1980 *in* Truman *et al.*, 1983) e em *M. sexta* (Truman, 1981; Truman *et al.*, 1983) onde a manutenção de altos níveis de ecdisteróides atrasou a ecdise. A injeção de uma alta dose de 20E em pupas jovens de abelhas permitiu, mas retardou, a pigmentação da cutícula, além de resultar em

significante diminuição das taxas de eclosão (Zufelato *et al.* 2000), indicando que tal intervenção afetou a ecdise e a diferenciação da cutícula adulta. Uma das proteínas que pode participar do processo de esclerotização da cutícula é a peroxidase.

A atividade peroxidase foi demonstrada em cutículas larval e pupal de insetos, Andersen, (2005) e Hasson & Sugumaran (1987), sugeriram que esta enzima poderia estar envolvida na esclerotização da cutícula. A atividade peroxidase foi também observada intracelularmente em diferentes tipos de células nos insetos, sugerindo que esta enzima pode executar outras funções, embora não seja sabido se a atividade da peroxidase cuticular é idêntica à das enzimas intracelulares, já que a atividade cuticular nunca foi caracterizada propriamente (Andersen, 2005).

A atividade da peroxidase na cutícula sólida pode estar envolvida na produção de ligações cruzadas de ditirosina e na oxidação de catecol para quinona na esclerotização (Andersen, 2005). Porém, quinonas e seus derivados sofrem reações redox e geram espécies reativas de oxigênio (ROS), potencialmente citotóxicos (Ottaviani *et al.*, 2002; Limauro *et al.*, 2006). A peroxidase é um dos sistemas antioxidantes que funciona como mecanismo de proteção contra a toxicidade (Storz and Imlay, 1999), transformando o peróxido de hidrogênio produzido pela superóxido dismutase em água e outras espécies não reativas (Munks *et al.*, 2005).

Neste trabalho nós identificamos uma proteína *peroxidase* de *A. mellifera* que é expressa na cutícula bem como em diferentes tecidos de rainha e operária, sugerindo que ela deve ter papel no processo de esclerotização, bem como função antioxidante.

O gene clonado e seqüenciado parcialmente possui o domínio da superfamília das peroxidases de animais e através do alinhamento comparativo entre a *Amel-PXD* e outras peroxidases de Diptera verificamos que há um longo trecho idêntico entre todas

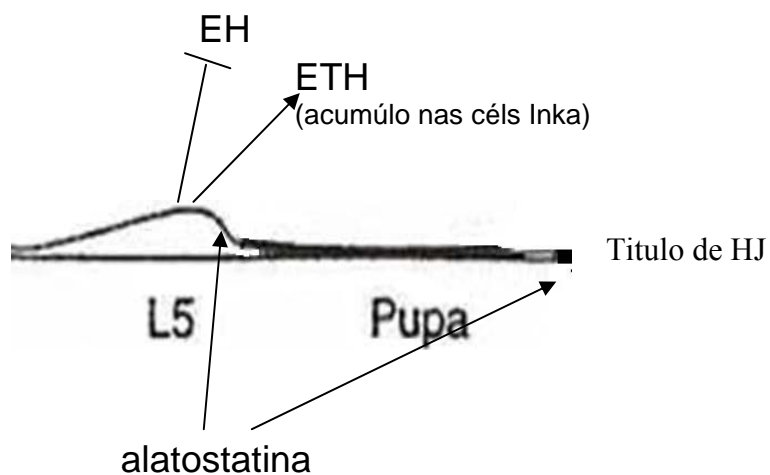
as espécies analisadas, mostrando que este gene possui uma região bem conservada, de provável importância para sua atividade.

A análise da expressão gênica durante o desenvolvimento mostrou que a expressão de *Amel-PXD* é restrita à fase pupal. Sua expressão então poderia ser inibida por altos títulos de HJ presentes na fase larval, porém experimentos de aplicação tópica deste hormônio tanto em larvas quanto em pupas demonstraram que o HJ parece não ter nenhum efeito nos níveis de transcritos da peroxidase. A análise da expressão gênica durante o desenvolvimento também sugere que é necessário haver um pico de 20E e sua subsequente queda nos títulos para que os níveis de transcritos de peroxidase aumentem em ambas as castas. Esse efeito foi confirmado após injeção de 20E em pupas de operárias, que provoca um aumento de duas vezes no nível de transcritos da peroxidase. Um segundo experimento de incubação de tegumento com 20E, seguido da retirada deste hormônio através de lavagem do tecido nos mostra que, após 6 horas de incubação em meio com 20E, provavelmente dentre os períodos analisados o que apresenta maior atividade deste hormônio, os níveis de transcritos de peroxidase diminuem consideravelmente. Após um período maior de incubação (20h e 30h) o nível de transcritos volta a aumentar. E após 6 h de incubação e 15h de lavagem, a diferença entre o grupo controle e o grupo tratado é muito grande. Os dados obtidos neste experimento são muito semelhantes ao que ocorre com a expressão gênica de ETH após incubação de tegumento com 20E, o que indica que a peroxidase deve se comportar como uma proteína cuticular, como já visto em várias outras espécies (Brivio *et al.*, 2000; Lassandro *et al.*, 1994; Heinecke *et al.*, 1993; Sayers *et al.*, 1984), sob influência de 20E, e que provavelmente, dentre as muitas peroxidases encontradas no genoma de *A. mellifera* esta seja uma ligada ao processo de esclerotização, ainda mais se levarmos em conta o fato deste gene ser vizinho ao gene do EH no genoma de *A. mellifera*.

Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem elaborar um modelo de regulação dos genes que levam aos processos de muda e ecdise. Durante o fim do último estágio larval temos baixa expressão do gene da *alatostatina*, e, conseqüentemente, altos títulos de HJ na hemolinfa. O HJ estimula a expressão de *ETH* pelas células Inka, fazendo com que o peptídeo *ETH* fique acumulado nestas células, mas não seja ainda liberado, já que altos títulos de HJ inibem a síntese de *EH*. No fim do último estágio larval e no primeiro estágio pupal, ou seja, ao redor da pupação, os níveis de transcritos de *bombixina* sobem, provocando um aumento da síntese de 20E pelas glândulas protorácicas, e conseqüentemente, um aumento dos títulos de 20E na hemolinfa. No mesmo momento, os níveis de transcritos de *alatostatina* aumentam, provocando uma diminuição na síntese de HJ, e uma conseqüente diminuição nos títulos de HJ, que se mantêm basais ao longo da fase pupal. O aumento do 20E provoca um aumento na transcrição de *EH*. Logo após, os níveis de transcritos de *bombixina* diminuem, bem como os títulos de 20E. Neste período aumenta-se a síntese de *ETH* pelas células Inka. Com a liberação de *EH*, ocorre também a conseqüente liberação de *ETH*, e ambos atuam num *feedback* positivo, até ocorrer a depleção total de *ETH* das células Inka. Este peptídeo é um dos principais que ocasiona os comportamentos de pré-ecdise e ecdise necessários para a muda do inseto. Após a liberação da cutícula velha, provocada pelos comportamentos de pré-ecdise e ecdise, a nova cutícula é formada e sofre esclerotização. Um dos componentes deste processo pode ser a *peroxidase*, que é transcrita também no período pupal, estimulada por altos títulos, seguido de queda de 20E (Figura 27).

Período larval



Período pupal

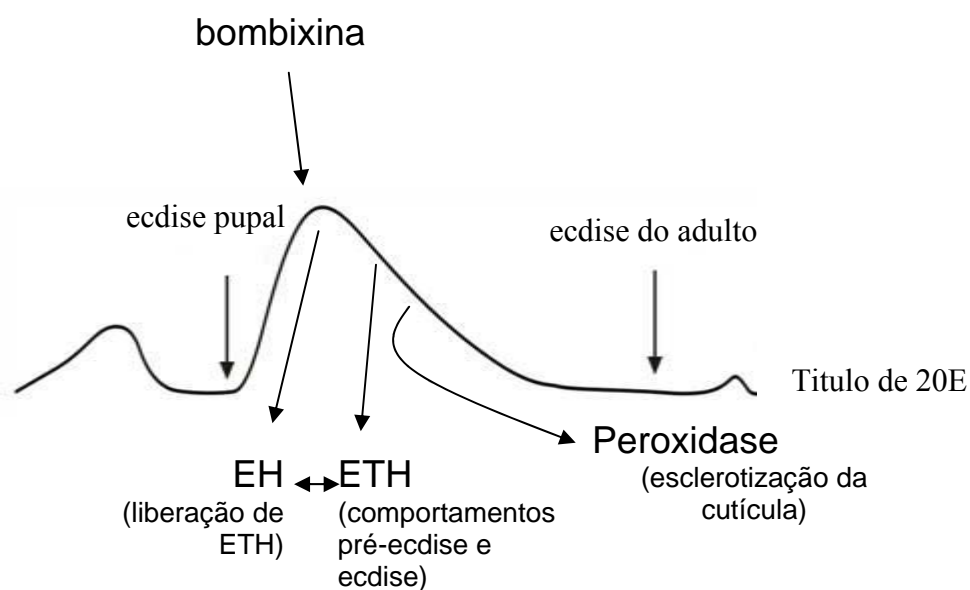


Figura 27 – Modelo proposto de regulação dos genes envolvidos na ecdise e na regulação da síntese de HJ e 20E em *A. mellifera*.

Referências Bibliográficas

Adachi, T; Takiya, S; Suzuki, Y; Iwami, M; Kawakami, A; Takahashi, SY; Ishizaki, H; Nagasawa, H; Suzuki, A. (1989) cDNA structure and expression of bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*. The Journal of Biological Chemistry, 264:7681-7685.

Adams, ME; Zitnan, D. (1997) Identification of ecdysis-triggering hormone in the silkworm *Bombyx mori*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 230:188-191.

Aguilar, R; Maestro, J; Vilaplana, L; Pascual, N; Piulachs, M-D; Bellés, X. (2003) Allatostatin expression in brain and midgut, and activity of synthetic allatostatins on feeding-related processes in the cockroach *Blattella germanica*. Regulatory Peptides, 115:171-177.

Aguinaldo, AM; Tuberville, JM; Linford, LS; Rivera, MC; Garey, JR; Raff, RA; Lake, JA. (1997) Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. Nature, 387:489-493.

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

Andersen, SO. (2005) Cuticular sclerotization and tanning. In: Gilbert, LI; Iatrou, K; Gill, SS, (Eds). Comprehensive Molecular Insect Science, vol 4. Elsevier Pergamon Press.

Audsley, N; Matthews, HJ; Price, NR; Weaver, RJ. (2008) Allatoregulatory peptides in Lepidoptera, structures, distribution and functions. Journal of Insect Physiology, 54:969-980.

Audsley, N & Weaver, RJ. (2006) Analysis of peptides in the brain and *corpora cardiaca-corpora allata* of the honey bee, *Apis mellifera* using MALDI-TOF mass spectrometry. Peptides 27: 512-520.

Audsley, N; Weaver, RJ; Edwards, JP. (2001) *In vivo* effects of *Manduca sexta* allatostatin and allatotropin on larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*. *Physiological Entomology*, 26:181-188.

Audsley, N; Weaver, RJ; Edwards, JP. (2000) Juvenile hormone biosynthesis by *corpora allata* of larval tomato moth, *Lacanobia oleracea*, and regulation by *Manduca sexta* allatostatin and allatotropin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30:681-689.

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

Bellés, X; Graham, LA; Bendena, WG; Ding, Q; Edwards, JP, Weaver, RJ; Tobe, SS. (1999) The molecular evolution of allatostatin precursor in cockroaches. *Peptides*, 20:11-22.

Bloch, G; Wheeler, DE; Robinson, GE. (2002) Endocrine influences on the organization of insect societies. In *Hormones, Brain and Behavior*. Pfaff, D; Arnold, A; Etgen, A; Fahrbach, S; Moss, R; Rubin, R. (Eds). Vol 3. Academic Press.

Brivio, MF; de Eguileor, M; Grimaldi, A; Vigetti, D; Valvassori, R; Lanzavecchia, G. (2000) Structural and biochemical analysis of the parasite *Gordius villoti* (Nematomorpha, Gordiacea) cuticle. *Tissue & cell*, 32:366-376.

Brogiolo, W; Stocker, H; Ikeya, T; Rintelen, F; Fernandez, R; Hafen, E. (2001) An evolutionary conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current Biology*, 11:213-221.

Davey, M; Duve, H; Thorpe, A; East, P. (2005) Helicostatins: brain-gut peptides of the moth, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 58:1-16.

Davey, M; Duve, H; Thorpe, A; East, P. (1999) Characterisation of the helicostatin peptide precursor gene from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29:1119-1127.

Ding, Q; Donly, BC; Tobe, SS; Bendena, WG. (1995) Comparison of the allatostatin neuropeptide precursor in the distantly related cockroaches *Periplaneta Americana* and *Diploptera punctata*. *European Journal of Biochemistry*, 234:737-746.

Edens, WA; Sharling, L; Cheng, G; Shapira, R; Kinkade, JM; Lee, T; Edens, HA; Tang, X; Sullards, C; Flaherty, DB; Benian, GM; Lambeth, JD. (2001) Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *The Journal of Cell Biology*, 154:879-891.

Elias-Neto, M. (2008) Morfogênese do tegumento em *Apis mellifera*: construindo o exoesqueleto adulto. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada), Ribeirão Preto (SP): USP.

Elsik, CG; Mackey, AJ; Reese, JT; Milshina, NV; Roos, DS; Weinstock, GM. (2007) Creating honey bee consensus gene set. *Genome Biology*, 8:R13.

Evans, JD; Wheeler, DE. (2000) Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biology*, online.

Ewer, J; Reynolds, S. (2002) Neuropeptide control of molting in insects. *Hormones, Brain and Behaviour* (Pfaff, D; Arnold, A; Etgen, AM *et al.*, Eds) 3:1-92. Academic Press, San Diego, California.

Ewer, J; Gammie, SC; Truman, JW. (1997) Control of insect ecdysis by a positive feedback endocrine system: roles of eclosion hormone and eclosion triggering hormone. *Journal of Experimental Biology*, 200:869-881.

Feyereisen, R. (1985) Regulation of juvenile hormone titer: Synthesis. In: Kerkut, GA; Gilbert, LI (Eds), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, vol. 7. Pergamon, Oxford, pp 391-430.

Gäde, G; Hoffmann, K-H. (2005) Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. *Physiological Entomology*, 30:103-121.

Gade, G. (2002) Allatoregulatory peptides: molecules with multiple functions. *Invertebrate Reproduction and development*, 41:127-135.

Gilbert, SF. (2006) *Developmental Biology*. 8ed. Sinauer Associates Inc., USA.

Gilbert, LI; Rybczynski, R; Warren, JT. (2002) Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annual Review of Entomology*, 47:883-916.

Gilbert, LI; Tata, JR; Atkinson, BG (Eds) (1996) *Metaorphosis: postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells*. Academic Press, San Diego.

Goodman; WG; Granger, NA. (2005) The juvenile hormones. In: Iatrou, K; Gill, SS; Gilbert, LI (Eds), *Comprehensive Molecular Insect Science, Vol 3 - Endocrinology*. Elsevier.

Hagenguth, H; Rembold, H. (1978) Identification of juvenile hormone 3 as the only JH homolog in all developmental stages of the honey bee. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 33:847-850.

Hartfelder, KH. (2000) Insect juvenile hormone: from “status quo” to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 157-177.

Hartfelder, K. (1993) Structure and function of the prothoracic gland in honey bee (*Apis mellifera* L.) development. *Invertebrate Reproduction and Development*, 23:59-74.

Hasson, C; Sugumaran, M. (1987) Protein cross-linking by peroxidase: possible mechanism for sclerotization of insect cuticle. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 5:13-28.

Hegstrom, CD; Truman, JW. (1996) Steroid control of muscle remodeling during metamorphosis in *Manduca sexta*. *Journal of Neurobiology*, 29:535-550.

Heinecke, JW; Li,W; Daehnke, HL; Goldstein, JA. (1993) Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 268:4069-4077.

Hesterlee, S & Morton, DB. (1996) Insect physiology: the emerging story of ecdysis. *Current Biology* 6: 648-650.

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

Horodyski, FM; Ewer, J; Riddiford, LM; Truman, JW. (1993) Isolation, characterization and expression of the eclosion hormone gene of *Drosophila melanogaster*. *European Journal of Biochemistry*, 215:221-228.

Horodyski, FM; Riddiford, LM; Truman, JW. (1989) Isolation and expression of the eclosion hormone gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86:8123-8127.

Ishizaki, H; Suzuki, A. (1994) The brain secretory peptides that control moulting and metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori*. *The International Journal of Developmental Biology*, 38:301-310.

Ishizaki, H; Suzuki, A; Moriya, I; Mizoguchi, A; Fujishita, M; O'oka, H; Kataoka, H; Isogai, A; Nagasawa, H; Suzuki, A. (1983a) Prothoracicotropic hormone bioassay: pupal-adult *Bombyx* assay. *Development Growth and Differentiation*, 25:585-592.

Ishizaki, H; Mizoguchi, A; Fujishita, M; Suzuki, A; Moriya, I; O'oka, H; Kataoka, H; Isogai, A; Nagasawa, H; Tamura, S; Suzuki, A. (1983b) Species specificity of the insect prothoracicotropic hormone (PTTH): the presence of *Bombix*- and *Samia*-specific PTTHs in the brain of *Bombyx mori*. *Development Growth and Differentiation*, 25:593-600.

Ishizaki, H; Ichikawa, M. (1967) Purification of the brain hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Biological Bulletin*, 133:355-368.

Iwami, M; Tanaka, A; Hano, N; Sakurai, S. (1996a) Bombyxin gene expression in tissues other than brain detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and *in situ* hybridization. *Experientia*, 15:882-887.

Iwami, M; Furuya, I; Kataoka, H. (1996b) Bombyxin-related peptides: cDNA structure and expression in the brain of the hornworm *Agrius convolvuli*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26:25-32.

Jhoti, H; McLeod, AN; Blundell, TL; Ishizaki, H; Nagasawa, H; Suzuki, A. (1987) Prothoracicotropic hormone has an insulin-like tertiary structure. *FEBS Letters*, 219:419-425.

Kamito, T; Tanaka, H; Sato, B; Nagasawa, H; Suzuki, A. (1992) Nucleotide sequence of cDNA for the eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori*, and the expression in a brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 182:514-519.

Kataoka, H; Li, JP; Lui, AS; Kramer, SJ; Schooley, DA. (1992) Complete structure of eclosion hormone of *Manduca sexta*. Assignment of disulfide bond location. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 39:29-35.

Kawakami, A; Kataoka, H; Oka, T; Mizoguchi, A; Kimura-Kawakami, M; Adachi, T; Iwami, M; Nagasawa, H; Suzuki, A; Ishizaki, H. (1990) Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. *Science*, 247:1333-1335.

Kimura-Kawakami, M; Iwami, M; Nagasawa, H; Suzuki, A; Ishizaki, H. (1992) Structure and expression of bombyxin-related genes of the moth *Samia cyntia ricini*. *General and Comparative Endocrinology*, 86:257-268.

Kingan, TG; Adams, ME. (2000) Ecdysteroids regulate secretory competence in Inka cells. *The Journal of Experimental Biology*, 203:3011-3018.

Kingan, TG; Gray, W; Zitnan, D; Adams, ME. (1997) Regulation of ecdysis-triggering hormone release by eclosion hormone. *The Journal of Experimental Biology*, 200:3245-3256.

Kiriishi, S; Nagasawa, H; Kataoka, H; Suzuki, A; Sakurai, S. (1992) Comparison of the *in vivo* and *in vitro* effects of bombyxin and prothoracicotropic hormone on prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Zoological science*, 9:149-155.

Koyama, T; Syropyatova, MO; Riddiford, LM. (2008) Insulin/IGF signaling regulates the change in commitment in imaginal discs and primordia by overriding the effect of juvenile hormone. *Developmental Biology*, 324:258-265.

Lassandro, F; Sebastiano, M; Zei, F; Bazzicalupo, P. (1994) The role of dityrosine formation in the crosslinking of CUT-2, the product of a second cuticlin gene of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and biochemical parasitology*, 65:147-159.

Limauro, D; Pedone, E; Pirone, L; Bartolucci, S. (2006) Identification and characterization of 1-Cys peroxiredoxin from *Sulfolobus solfataricus* and its involvement in the response to oxidative stress. *The FEBS Journal*, 273:721-731.

Locke, M. (1969) The localization of a peroxidase associated with hard cuticle formation in an insect, *Calpodes ethlius* stoll, lepidoptera, hesperiidae. *Tissue & Cell*, 1:355-374.

Lourenço, AP; Mackert, A; Cristino, AS; Simões, ZLP. (2008) Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, 39:372-385.

Mackert, A; Nascimento, AM; Bitondi, MMG; Hartfelder, K; Simões, ZLP. (2008) Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. – Expressional analysis and functional assays. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 150:33-44.

Maestro, JL; Bellés, X; Piulachs, M-D; Thorpe, A; Duve, H. (1998) Localization of allatostatin-immunoreactive material in the central nervous system, stomatogastric nervous system, and gut of the cockroach *Blattella germanica*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 37:269-282.

Marchler-Bauer, A; Anderson, JB; Derbyshire, MK; DeWeese-Scott, C; Gonzales, NR; Gwadz, M; Hao, L; He, S; Hurwitz, DI; Jackson, JD; Ke, Z; Krylov, D; Lanczycki, CJ; Liebert, CA; Liu, C; Lu, F; L, S; Marchler, GH; Mullokandov, M; Song, JS; Thanki, N; Yamashita, RA; Yin, JJ; Zhang, D; Bryant, SH. (2007) CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Research*, 35:237-240.

Mesce, KA & Fahrbach, SE. (2002) Integration of endocrine signals that regulate insect ecdysis. *Frontiers in Neuropeptide Research* 23: 179-199.

Meyering-Vos, M; Merz, S; Sertkol, M; Hoffmann, KH. (2006) Functional analysis of the allatostatin-A type gene in the cricket *Gryllus bimaculatus* and the armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36:492-504.

Michelette, E R de F & Soares, A E E. (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, 24:432-440.

Michener, CD. (1974) The social behavior of the bees. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Moureau, R; Raelison, C; Sutter, BCJ. (1981) An intestinal insulin-like molecule in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 69A:79-83.

Mousley, A; Moffett, CL; Duve, H; Thorpe, A; Halton, DW; Geary, TG; Thompson, DP; Maule, AG; Marks, NJ. (2005) Expression and bioactivity of allatostatin-like neuropeptides in helminths. *International Journal of Parasitology*, 35:1557-1567.

Munks, RJL; Sant'Anna, MRV; Grail, W; Gibson, W; Igglesden, T; Yoshiyama, M; Lehane, SM; Lehane, MJ. (2005) Antioxidant gene expression in the blood-feeding fly *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Molecular Biology*, 14(5):483-491.

Nagasawa, H; Maruyama, K; Sato, B; Hietter, H; Kataoka, H; Isogai, A; Tamura, S; Ishizaki, H; Senba, T; Suzuki, A. (1988) Structure and synthesis of bombyxin from the silkworm, *Bombyx mori*. In *Peptide Chemistry* (Shiba, T; Sakakibara, S. Eds), pp:123-126. Protein Research Foundation, Osaka.

Nagasawa, H; Kataoka, H; Hori, Y; Isogai, A; Tamura, S; Suzuki, A; Guo, F; Zhong, X; Mizoguchi, A; Fujishita, M; Takahashi, SY; Ohnishi, E; Ishizaki, H. (1984) Isolation and some characterization of the prothoracicotropic hormone from *Bombyx mori*. *General and Comparative Endocrinology*, 53:143-152.

Nijhout, HF. (1994) *Insect Hormones*. Princeton, University Press, Princeton, NJ.

Ottaviani, E; Nappi, AJ; Vass, E. (2002) Resistance of the insect cell line IPLB-LdFB to salsolinol-induced apoptosis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 49:1-9.

Panchan, N; Bendena, WG; Bowser, P; Lungchukiet, P; Tobe, SS; Sithigorngul, W; Chaivisuthangkura, P; Rangsiruji, A; Petsom, A; Pewnim, T; Sithigorngul, P. (2003) Immunolocalization of allatostatin-like neuropeptides and their putative receptor in eyestalks of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Peptides*, 24:1563-1570.

Park, Y; Filippov, V; Gill, SS; Adams, ME. (2002) Deletion of the ecdysis-triggering hormone gene leads to lethal ecdysis deficiency. *Development*, 129:493-503.

Park, Y; Zitnan, D; Gill, SS; Adams, ME. (1999) Molecular cloning and biological activity of ecdysis-triggering hormones in *Drosophila melanogaster*. FEBS Letters, 463:133-138.

Paulino Simões, ZL; Boleli, IC; Hartfelder, K. (1997) Occurrence of a prothoracicotropic hormone-like peptide in the developing nervous system of the honey bee (*Apis mellifera* L). Apidologie, 28:399-409.

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

Rachinsky, A; Feldlaufer, MF. (2000) Responsiveness of honey bee (*Apis mellifera*) *corpora allata* to allatoregulatory peptides from four insect species. Journal of Insect Physiology, 46:41-46.

Rachinsky, A; Hartfelder, K. (1998) *In vitro* biosynthesis of juvenile hormone in larval honey bees: comparison of six media. *In vitro* Cellular and Developmental Biology. Animal, 34:646-648.

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

Rembold, H. (1987a) Caste differentiation of the honey bee – fourteen years of biochemical research at Martinsried. In: Erder, J & Rembold, H (Eds), Chemistry and biology of social insects. Verlag J Peperny, München.

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

Rembold, H; Kremer, JP; Ulrich, GM. (1980) Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honeybee, *Apis mellifera* L. Apidologie, 11:29-38.

Riddiford, LM. (1994) Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General considerations and permetamorphic actions. *Advances in Insect Physiology*, 24:213-274.

Robitzki, A; Schröder, HC; Ugarkovic, D; Pfeiffer, K; Uhlenbruck, G; Muller, WEG. (1989) Demonstration of an endocrine signaling circuit for insulin in the sponge *Geodia cydonium*. *The EMBO Journal*, 8:2905-2909.

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

Rybczynski, R. (2005) Prothoracicotropic hormone. In: Iatrou, K; Gill, SS; Gilbert, LI (Eds), *Comprehensive Molecular Insect Science, Vol 3 - Endocrinology*. Elsevier.

Saegusa, H; Mizoguchi, A; Kitahora, H; Nagasawa, H; Suzuki, A; Ishizaki, H. (1992) Changes in the titer of bombyxin-immunoreactive material in hemolymph during postembryonic development of the silkworm *Bombyx mori*. *Development, Growth and Differentiation*, 34:595-605.

Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory Manual*. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. N. York.

Sanger, F; Nicklen, S; Coulson, AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 74:5463-5467.

Sauman, I; Reppert, SM. (1996) Molecular characterization of prothoracicotropic hormone (PTTH) from the giant silkworm *Antheraea pernyi*: developmental appearance of PTTH-expressing cells and relationship to circadian clock cells in central brain. *Developmental Biology*, 178: 48-429.

Sayers, G; Mackenzie, CD; Denham, DA. (1984) Biochemical surface components of *Brugia pahangi* microfilariae. *Parasitology*, 89:425-434.

Sehnal, F; Hansen, I; Scheller, K. (2002) The cDNA-structure of the prothoracicotropic hormone (PTTH) of the silkworm *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32:233-237.

Sevala, VM; Loughton, BG. (1992) Insulin-like peptides during oogenesis and embryogenesis in *Locusta migratoria*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 21:187-192.

Smit, AB; Vreugdenhil, E; Ebberink, RHM; Geraerts, WPM; Klootwijk, J; Joosse, J. (1988) Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature*, 331:535-538.

Soares, MPM. (2007) Caracterização e estudo da expressão de genes do tegumento de *Apis mellifera* durante os processos de muda e diferenciação da cutícula. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada), Ribeirão Preto (SP): USP.

Song, Q; Gilbert, LI. (1998) Alterations in ultraspiracle (USP) content and phosphorylation state accompany feedback regulation of ecdysone synthesis in the insect prothoracic gland. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28:849-860.

Stay, B. (2000) A review of the role of neurosecretion in the control of juvenile hormone synthesis: a tribute to Berta Scharrer. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 653-662.

Storz, G; Imlay, JA. (1999) Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2:188-194.

Sutherland, TD; Feyereisen, R. (1996) Target of cockroach allatostatin in the pathway of juvenile hormone biosynthesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 120:115-123.

Tobe, SS; Stay, B. (2004) Neuropeptides: roles in the regulation of juvenile hormone production. In: Henry, HL; Norman, AW (Eds), *Encyclopedia of Hormones*. Elsevier Science, Oxford (in press).

Truman, JW. (2005) Hormonal control of the form and function of the nervous system. In: Iatrou, K; Gill, SS; Gilbert, LI (Eds), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol 2 - Endocrinology. Elsevier.

Truman, JW; Rountree, DB; Reiss, SE; Schwartz, LM. (1983) Ecdysteroids regulate the release of eclosion hormone in moths. *Journal of Insect Physiology*, 34:895-900.

Truman, JW. (1981) Interaction between ecdysteroid, eclosion hormone, and bursicon titers in *Manduca sexta*. *American Zoologist*, 21:655-661.

Vafopoulou, X; Steel, CGH. (1997) Ecdysteroidogenic action of *Bombyx* prothoracicotropic hormone and bombyxin on the prothoracic glands of *Rhodnius prolixus in vitro*. *Journal of Insect Physiology*, 43:651-656.

Wei, ZJ; Zhang, QR; Kang, L; Xu, WH; Denlinger, DL. (2005) Molecular characterization and expression of prothoracicotropic hormone during development and pupal diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology*, 51:691-700.

Wigglesworth, VB. (1970) *Insect Hormones*. W.H. Freeman, San Francisco.

Winston, ML. (2003) *A biologia da abelha*. Magister, Porto Alegre.

Winston, ML. (1992) The honey bee colony: life history. In: Graham, JM (Ed), *The hive and the honey bee*. Dadant, Hamilton, Illinois.

Winston, ML. (1987) *The biology of the honey bee*. Harvard University Press, Cambridge.

Wolfgang, WJ; Riddiford, LM. (1986) Larval cuticular morphogenesis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and its hormonal regulation. *Developmental Biology*, 113:305-316.

Woodhead, AP; Stay, B; Seidel, SL; Khan, MA; Tobe, SS. (1989) Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 86:5997–6001.

Yagi, KJ; Kwok, R; Chan, KK; Setter, RR; Myles, TG; Tobe, SS; Stay, B. (2005) Phe-Gly-Leu-amide allatostatin in the termite *Reticulitermes flavipes*: content in brain and *corpus allatum* and effect on juvenile hormone synthesis. *Journal of Insect Physiology*, 51:357-365.

Yin, G-L; Yang, J-S; Cao, J-X; Yang, W-J. (2006) Molecular cloning and characterization of FGLamide allatostatin gene from the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Peptides*, 27:1241-1250.

Zitnan, D; Kim, Y-J; Zitnanova, I; Roller, L; Adams, ME. (2007) Complex steroid-peptide-receptor cascade controls insect ecdysis. *General and Comparative Endocrinology*, 153:88-96.

Zitnan, D & Adams ME. (2005) Neuroendocrine regulation of insect ecdysis. In: Iatrou, K; Gill, SS; Gilbert, LI (Eds), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol 3 - Endocrinology. Elsevier.

Zitnan, D; Zitnanova, I; Spalovska, I; Takac, P; Park, Y. (2003) Conservation of ecdysis-triggering hormone signaling in insects. *The Journal of Experimental Biology*, 206:1275-1289.

Zitnan, D; Hollar, L; Spalovska, I; Takac, P; Zitnanova, I; Gill, SS; Adams, ME. (2002) Molecular cloning and function of ecdysis-triggering hormones in the silkworm *Bombyx mori*. *The Journal of Experimental Biology*, 205:3459-3473.

Zitnan, D; Adams, ME. (2000) Excitatory and inhibitory roles of central ganglia in initiation of insect ecdysis behavioural sequence. *Journal of Experimental Biology*, 203:1329-1340.

Zitnan, D; Ross, LS; Zitnanova, I; Hermesman, JL; Gill, SS; Adams, ME. (1999) Steroid induction of a peptide hormone gene leads to orchestration of a defined behavioral sequence. *Neuron*, 23:523-535.

Zitnan, D; Kingan, TG; Hermesman, JL; Adams, ME. (1996) Identification of ecdysis-triggering hormone from an epitracheal endocrine system. *Science*, 271:88-91.

Zufelato, MS; Bitondi, MMG; Simões, ZLP; Hartfelder, K. (2000) The juvenile hormone analog pyriproxyfen affects ecdysteroid-dependent cuticle melanization and shifts the pupal ecdysteroid peak in the honey bee (*Apis mellifera*). *Arthropod, Structure & Development*, 29:111-119.

Anexo

Tabela I – Características das fases do desenvolvimento larval e pupal de operárias e rainhas de *A. mellifera* (modificada de: Michellette & Soares, 1993; Rembold *et al.*, 1980).

	Fases do desenvolvimento	Características de operárias e rainhas
LARVAL	L5S1	Intestino totalmente cheio
	L5S2	Intestino em processo de esvaziamento
	L5S3	Intestino totalmente vazio
	L5PP1	Pouco movimento, cabeça orientada em direção ao opérculo, o intestino pode ser visualizado como um tubo vazio
	L5PP2	Imóvel, cabeça orientada em direção ao opérculo, intestino não mais visível, apêndices da cabeça e tórax visíveis através da cutícula
	L5PP3	Imóvel, cabeça orientada em direção ao opérculo, o líquido exuvial foi reabsorvido e a cutícula larval tornou-se opaca e enrugada. Apêndices torácicos não são mais visualizados.
PUPAL	Pw	Olho branco, sem pigmentação da cutícula torácica
	Pp	Olho rosa, sem pigmentação da cutícula torácica
	Pdp	Olho rosa escuro, sem pigmentação da cutícula torácica
	Pb	Olho marrom, sem pigmentação da cutícula torácica
	Pbl	Olho marrom, leve pigmentação da cutícula torácica
	Pbm	Olho marrom, mediana pigmentação da cutícula torácica
	Pbd	Olho marrom, forte pigmentação da cutícula torácica

Tabela II – Primers usados para os genes *actina*, *alatostatina* e *bombixina*

Gene	N° de acesso Genbank e GB	Metodologia	Primer	Temp. de anelamento	Tamanho do fragmento gerado	N° de ciclos (apenas para RT-PCR)
<i>actina</i>	AB023025	RT-PCR	Sense – 5'TGCCAACACTGTCTCTTCTG3' Antisense – 5'AGAAITGACCCACCAATCCA3'	60°C	156 pb	25
		Sequenciamento e RT-PCR	Sense – 5'GAGGCAGAGTACAGAAATG3' Antisense – 5'CTACGAAITGCCGTTTACG3'	58°C	690 pb	33
<i>alatostatina</i>	GB16653	Real Time	Sense – 5'TAAGAGGCTACCCGCTACA3' Antisense – 5'CCAGCCGAAACTGTATTGT3'	63°C	123 pb	
		Sequenciamento	Sense – 5'ATGCCACCAATATTATGGTCG3' Antisense – 5'TGAAITGTTACATGAAATGAAA3'	56°C	404 pb	
<i>bombixina</i>	GB10174	RT-PCR e Real Time	Sense – 5'GGAGAGGATGATTATATGGCAIT3' Antisense – 5'CCTTAGAGTTCITTCGAAAATCGT3'	60°C	102pb	30

Tabela III – Primers usados para os genes *eclosion hormone*, *ecdysis-triggering hormone* e *rp49*

Gene	Nº de acesso Genbank e GB	Metodologia	Primer	Temp. de anelamento	Tamanho do fragmento gerado	Nº de ciclos (apenas para RT-PCR)
<i>eclosion hormone</i>		Sequenciamento	Sense – 5'GTTAGGCAAGAAATTGTTATTAG3'	60°C	413 pb	
			Antisense – 5'GGCGACATTTTGGTATGTTA3'			
	GB19466	RT-PCR	Sense – 5'CCGAAAATTGGCCTCAAATGCA3'	60°C	128 pb	32
			Antisense – 5'ATGGTTGGATCGAGTCTCA3'			
<i>ecdysis triggering hormone</i>	GB15713 NM_001142607	Real Time RT-PCR e Real Time	Sense – 5'GGGCTCAATGCAAGAAAATGT3'	60°C	120 pb	
			Antisense – 5'ATGGTTGGATCGAGTCTCA3'			
<i>rp49</i>	AF441189	Real Time	Sense – 5'GGAATCTCAAATTTGGCAITGC3'	60°C	125 pb	30
			Antisense – 5'GAAATC GTC GTA ACC TTC GC3'			
			Sense – 5'CGTCATATGTTGCCAACTGGT3'	60°C	150pb	
			Antisense – 5'TTGAGCACGGTTCAACAAATGG3'			

Tabela IV – Primers usados para o gene *peroxidase*

Gene	Nº de acesso Genbank e GB	Metodologia	Primer	Temp. de anelamento	Tamanho do fragmento gerado	Nº de ciclos (apenas para RT-PCR)
<i>peroxidase</i>	Group Un1247 + Group 4.3	Seqüenciamento	Sense- 1F: 5'GGATATCAGTGGGAACCTTG3' 2F: 5'TCCTGACGAGGTTATCACG3' 3F: 5'GGAGGAATGTGCCATCGG3' 4F: 5'GCTGTATCAAGAAGCAAGAAG3' Antisense- 1R: 5'CGTGATAACCCCTCGTCAGGA3' 2R: 5'GCCGATGGCAACATTCCTCG3' 3F: 5'GATGGATTCACGCTTTCGIC3' 4F: 5'CAAATTCAGTCCCTCGTTGC3' Combinações: 1F+1R; 2F+2R; 3F+3R; 4F+4R; 2F+3R	60°C	1F+1R: 388pb 2F+2R: 139 pb 3F+3R: 657pb 4F+4R: 470pb 2F+3R: 777pb Total obtido: 1403pb	
		RT-PCR	Sense- 5'GCTGTATCAAGAAGCAAGAAG3' Antisense - 5'CAAATTCAGTCCCTCGTTGC3'	60°C	470pb	30
		Real Time	Sense- 5'AGAGTGAACGAGCAGCTAGT3' Antisense- 5'ATACAACGTTTCATCGTCCCA3'	60°C	117pb	

Artigo enviado para publicação em revista científica:

Cloning, sequencing and functional characterization of a putative peroxidase of honeybee, *Apis mellifera*

Silva-Torres, FA¹; Nunes, FM²; Prioli, MS²; Aleixo, AC¹; Mackert, AS²;
Bitondi, MMG²; Simões, ZLP²

¹Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; ²Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão, Universidade de São Paulo.

Abstract

A cDNA encoding a peroxidase was characterized in the honeybee *Apis mellifera*. *Amel-PXD* developmental expression is distinguished by an on-off-on pattern, the transition from a low to a high level of transcripts occurring as the ecdysteroid titer is declining after the peak that triggers the onset of pharate development (pupal and adult development). Intra-abdominal 20E application and integument incubated with 20E showed that this gene is down-regulated by this hormone. This pattern of modulation is found in other kinds of cuticular proteins, suggesting that *Amel-PXD* has a function on the sclerotization process. Besides this, the presence of transcripts in different worker tissues suggests that this enzyme may perform other functions, possibly as an antioxidant enzyme.

Introduction

The cuticle covers the complete body of the insects as an effective barrier between the animal and its surroundings; it provides protection against desiccation, attack of microorganisms and predators, and as an exoskeleton it serves as attachment sites for muscles. Cuticle sclerotization is a chemical process whereby certain regions of insect cuticle are transformed irreversibly from a pliant material into a stiffer and harder structure, characterized by decreased deformability, reduced extractability of the matrix proteins, and increased resistance towards enzymatic degradation. Sclerotization of structural materials in insects is not restricted to cuticle; other materials such as egg

cases and silks, may be stabilized by chemical processes closely related to cuticular sclerotization (Andersen, 2005).

The current accepted sclerotization model and its main features might be resumed as follows: the amino acid tyrosine is hydroxylated to 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), which by decarboxylation is transformed to dopamine, a compound of central importance for both sclerotization and melanine formation. Dopamine can be N-acetylated to either N-acetyldopamine (NADA) or N- β -alanyldopamine (NBAD), and both can serve as precursors in the sclerotization processes. They are enzymatically oxidized to the corresponding *o*-quinones, which can react with available nucleophilic groups, where by the catecholic structure is regained and is linked to the aromatic ring. The *o*-quinones of NADA and NBAD may also be enzymatically isomerized to the corresponding *p*-quinone methides, and the β -position of their side chain react readily with nucleophiles. The *p*-quinone methides may be enzymatically isomerized to side chain unsaturated catechol derivatives, dehydro-NADA and dehydro-NBAD, which after oxidation to unsaturated quinines can react with catechols to form dihydroxyphenyl-dihydrobenzodioxine derivatives and with other nucleophilic groups to give yet unidentified compounds. The *o*-quinones and *p*-quinone methides react preferably with the imidazole group in the cuticular proteins, but may also react with free amino groups, such as terminal amino groups in proteins and ϵ -amino groups in lysine residues, with catechols, with water, and probably also with hydroxyl groups in the *N*-acetylglucosamine residues in chitin.

During the process of sclerotization, the oxidation of catechols to *o*-quinones takes place. Several different routes for this may be of advantage for an insect, especially if they can be regulated independently in various cuticular regions, and peroxidase activity may provide such an alternative route. Peroxidase activity has been demonstrated in larval and pupal cuticle as well as intracellularly in different cell types in insects and nematodes (Andersen, 2005). Proteins can be cross-linked by means of the peroxidase system, and it has been suggested that the enzyme could be involved in cuticular sclerotization (Hasson and Sugumaran, 1987).

Furthermore, quinones present in the sclerotization process and its related derivatives tend to undergo redox reactions, to generate reactive oxygen species (ROS) potentially cytotoxic to endogenous tissues (Ottaviani, *et al.*, 2002). Accumulated evidences suggest that ROS cause damage to all major classes of biological macromolecules, leading to protein oxidation, lipid peroxidation, DNA base

modifications and strand breaks (Limauro *et al.*, 2006). In order to protect against toxic ROS, aerobic organisms have developed a number of antioxidant systems that serve as protective mechanisms, namely superoxide dismutases, catalases, peroxidases, thioredoxin, and glutathione (Storz and Imlay, 1999).

Using the recently available *Apis mellifera* genome sequence (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006), we identified a cDNA sequence of a peroxidase from *A. mellifera* (*Amel-PXD*). The transcripts levels were examined in different tissues and different stages of worker bees. Furthermore, transcripts levels analyses were performed after juvenile hormone and ecdysteroid treatments and after abdominal ligation in order to analyze the relationships between the main insect hormones and this enzyme.

Materials and Methods

A. mellifera

Africanized honeybee workers were collected from colonies maintained at the Experimental Apiary of the University of São Paulo in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Immature worker bees were staged according to the criteria established by Michelette and Soares (1993).

Identification, Cloning and Sequencing the putative *A. mellifera* Peroxidase (*Amel-PXD*) cDNA and bioinformatics analysis

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from dark-pink eyed worker pupae (Pdp) using a TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies) protocol and then incubated in the presence of DNaseI (Promega) for 30 minutes at 37°C to eliminate contaminant genomic DNA. First-stranded cDNA was synthesized from a standard amount of total RNA (2.5µg) using Super-Script II (Invitrogen) and an oligo (dT)₁₂₋₁₈ primers (Invitrogen).

Aliquots of first stranded cDNA products were employed in PCR reactions using PCR Master Mix (Promega) and specific primers. The thermal cycling program consisted of 5 minutes at 94°C, followed by 40 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 60°C, 30 seconds at 72°C, and a final extension step at 72°C for 7 minutes. The *primers* used for PCR amplification are listed in Table I, and were

designated based on the *A. mellifera* genome information (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). The amplification products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel stained with ethidium bromide. These fragments were purified and subcloned into the *EcoRI* site of the pGEM-T Easy plasmid (Promega). Inserted-containing plasmids were subjected to sequencing reaction using the M13-forward and M13-reverse universal primers, and a 310 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Database searches were carried out at the National Center for Biotechnology Information using the BLAST server to find potential orthologs that were aligned by ClustalW to analyze conserved patterns.

Semiquantitative RT-PCR transcripts levels analyses of *Amel-PXD*

The transcripts levels of *Amel-PXD* were analyzed by semiquantitative RT-PCR. To examine the tissue-specific expression, total RNA was purified from brain, ovary and fat body of newly-emerged workers. Total RNA isolated from whole larvae and pupae of workers (from the last phase from 5th instar larvae, L5PP3, to brown-eyed pupae, intermediary pigmented cuticle, Pbm) were used to evaluate the transcripts levels during development.

Total RNA and oligo (dT)₁₂₋₁₈ primers (Invitrogen) were used to synthesize the first stranded cDNA in reaction mixtures containing SuperScript II, as described above. The transcripts levels of *Amel-PXD* in different tissues was evaluated by semiquantitative RT-PCR and the following cycling conditions: 5 minutes at 94°C, followed by 40 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 60°C, 30 seconds at 72°C, and a final extension step at 72°C for 10 minutes. In the transcripts levels analysis during the developmental stages, the same PCR conditions were performed but using 30 cycles. An *A. mellifera actin* gene (GenBank accession number AB023025), which is constitutively expressed during development (Lourenço et al., 2008), was used as endogenous control, and the thermal cycling program was the same defined for *Amel-PXD* amplification for the transcripts levels analysis in different tissues, but using 25 cycles for the expression analysis during the developmental stages. Another PCR reaction with all components less cDNA was used as negative control. PCR products were electrophoresed in 1% agarose gel ethidium bromide stained. Densitometry analysis were performed for the transcripts levels during

developmental stages using the *Kodak ID 3.3.2 Image Analysis Software* connected to the KODAK EDAS 290 digital machine. All the primers used are listed in Table I.

Effects of experimental hormone manipulations on *Amel-PXD* transcripts levels

JH and 20E treatments

For the analysis of JH effects on *Amel-PXD* transcript levels, spinning 5th instar larvae (L5S1) and brown-eyed and non-pigmented body worker pupae (Pb) were removed from their brood cells to receive a topical application of 10µg JH-III (Fluka, diluted in 1 µl acetone). Controls were topically treated with 1 µl acetone, or were left untreated. For the analysis of 20E effects on *Amel-PXD* transcript levels, brown-eyed and non-pigmented body worker pupae (Pb) were intra-abdominally injected with 5 µg of 20E diluted in 2 µg of ethanol plus Ringer (insect physiological solution). Controls were injected with ethanol plus Ringer, in the proportion used in the treatment. Treated and untreated larvae were maintained in an incubator at 34°C and 80% relative humidity for 24h for larvae and pupae, treated with JH, and 12h for pupae 20E treated. Extraction of RNA of the whole body in the case of larvae, and of fat body in the case of pupae, was performed using the TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies) protocol. For transcript levels analysis we performed real-time RT-PCR, using the primers for *Amel-PXD* and primers for the ribosomal protein rp49, considered the more reliable for the analysis of hormonal treated bees (Lourenço *et al.*, 2008). Primers are listed in Table I.

Incubation of thoracic integuments with 20E

Newly ecdysed pupae (Pw stage) were dissected in sterilized Ringer for extraction of the thoracic integuments. Fat body was cleaned of, and pools of five thoracic integuments were incubated in 1 mL of a culture medium formulated by Rachinsky and Hartfelder (1998) specifically for honeybee tissues in the presence of 20E (0,001µg per ml (algumas vezes está escrito –mL- medium), diluted in ethanol (Merck). To optimize 20E solubilization, aliquots of incubation medium containing hormone were sonicated during 12 minutes. Control incubations were prepared with culture medium and ethanol only, and were also sonicated at the same conditions. When used as the 20E solvent or alone, ethanol never exceeded 0.5% of the total

volume of incubation medium. Integuments were exposed continuously to 20E or to pulses (incubation in culture medium containing hormone followed by washing in hormone-free medium), during different periods of time: 6, 20 or 30 hours of incubation in 20E medium; 6 hours of incubation in 20E medium followed by 15 hours of incubation in free medium and 24 hours of incubation in free medium. Total RNA was extracted from incubated integuments, and analyzed by semi-quantitative RT-PCR, using the specific *Amel-PXD* primers. Primers for rp49 were used as endogenous control. PCR was performed using the following conditions: 5 minutes at 94°C, followed by 30 cycles (for peroxidase) and 25 cycles (for rp49) of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 60°C, 30 seconds at 72°C, and a final extension step at 72°C for 10 minutes. Densitometry analyses were performed as described above. The same primers were used for the analysis of both experiments, JH and 20E treatment (listed in Table I).

Results

Amel-PXD sequence

The release of the honeybee genome sequence (The Honey Bee Genome Sequence Consortium, 2006) permitted a genome-wide search for many genes of importance for the understanding of bee physiology and development. Among them we found a putative gene for peroxidase, linked (“merged”) to an eclosion hormone predicted gene responsible for initiating the process of ecdysis in insects.

The CDS (coding sequence) from *Amel-PXD* has 12 exons of 2037 base pairs (bp) and 11 introns of 17824 bp (Figure 1A). We designed specific primers for this gene (Figure 1B), and performed PCR, cloning and sequencing. The conceptual translation of the amplified and sequenced fragment localizes in the chromosomal regions GroupUn.1287 e Group4.3 in the *A. mellifera* genome (version 4).

BLASTP analysis from the total amino acid predicted sequence showed significant similarities between *Amel-PXD* and *peroxidase* from other insects, as *Pediculus humanus* (EEB19573.1) (85% identity), *Aedes aegypti* (EAT46477.1) (83% identity), *D. melanogaster* (NP_650627.1) (82% identity) e *C. quinquefasciatus* (EDS26535.1) (82% identity). We also found the characteristic domain of the animal peroxidase superfamily (pfam03098).

The *Amel-PXD* partial deduced amino acid sequence was aligned with peroxidases from *Aedes aegypti* (AaPer, EAT46477.1), *C. quinquefasciatus* (CqPer, EDS26535.1) e *Anopheles gambiae* (AgPer, AY752910.1) and showed a large conserved region between them (Figure 1C), among them are the motifs REHNRIA, NPHW, QHITYNE e AAFRFGHSL, typical of the peroxidase domain.

Amel-PXD transcripts levels

Different tissues

Semiquantitative RT-PCR was able to detect the presence of *Amel-PXD* transcripts in all different worker bee tissues and organs analyzed tissue, with less abundance in ovaries (Figure 2).

Developmental stages

Amel-PXD transcripts were quantified in larvae (L5PP3) and pupae (from Pw to Pbm) of *A. mellifera* using *actin* cDNA as a control. Semi quantitative RT-PCR was used. The results (Figure 3) showed low to undetected transcripts levels during the larval stage analyzed, and the transcripts are low at the two first pupae stages (Pw and Pp). Transcripts amount abruptly increased in Pdp pupa and is maintained high at the two nest stages (Pb and Pbl), when decrease again at Pbm. The analysis of developmental transcripts profile of *Amel-PXD* revealed that the transition from low to high abundance of transcripts coincides with the falling of ecdysteroids titers after the onset of pupal stage. This comparative analysis strongly suggested that levels of *Amel-PXD* transcripts are modulated by the titer of ecdysteroids.

Effect of HJ-III and 20E (ecdysteroid) on Amel-PXD transcript levels

To verify possible ecdysteroid (20E) or juvenile hormone (JH-III) regulation on *Amel-PXD* transcription we performed hormonal application experiments. JH-III has no effect on *Amel-PXD* transcripts levels. However, when injected at pupae, 20E causes an increase of twice at *Amel-PXD* transcription. To study this effect more profoundly we tried to simulate a 20E peak in the integuments of workers.

Physiological concentration of 20E was used in experiments *in vitro* (0,001 μ g 20E per ml of culture medium) to investigate more the effect of ecdysteroids on the *Amel-PXD* gene activity. Integument incubation in the presence of 0,001 μ g 20E (per ml of culture medium) for a period of 6 hours resulted in inhibition of peroxidase expression. However, 20 and 30 hours after the beginning of incubation, the level of transcripts was recovered, possibly because the 20E lost its effect after a certain period of time, and after 15 hours-washing in hormone free-medium, transcripts levels highly increased, when compared with the control. This *in vitro* experiment showed that it is necessary the existence of a peak of 20E and then its decrease to the *Amel-PXD* transcription to occur. Although the transcripts accumulation was reactivated before removing the hormone from the incubation medium, it was more pronounced after the washing, when compared to the control.

Discussion

In this work we identified and sequenced an *Apis mellifera* peroxidase gene (*Amel-PXD*). Although it was partially sequenced, the animal peroxidase superfamily domain is present. Furthermore, there are great identities between the *Amel-PXD* and peroxidases from other insects.

The *Amel-PXD* transcripts were found in the cuticle as well as in different tissues in worker castes.

The transcript levels analysis during the worker bees development showed that the *Amel-PXD* gene activity is preferentially restricted to the pupae stages, mainly in the stages where the 20E titer is declining. The fact that we didn't find *Amel-PXD* transcripts in larvae suggested that it should be down-regulated by the JH, but our experiments of JH topical application demonstrated that this doesn't take place. The transcripts levels analysis during the development also suggested that the *Amel-PXD* is regulated by the 20E titers, since in the stages where there was a hemolymph 20E peak, the *Amel-PXD* transcript level was lower, and in the stages where the 20E titer starts to decline presents the higher levels of *Amel-Pxd* transcripts. This was confirmed with the experiment of pupae 20E injection, when an increasing of twice in gene activity was observed.

To confirm that the 20E peak in the hemolymph and its subsequent decline is important to the *Amel-PXD* transcription, we performed *in vitro* incubation of 20E in cuticles. It was demonstrated that the *peroxidase* transcripts decreased at the first time

analyzed (6 hours). After 20 hours however, the transcripts levels rose again, probably because at this time the 20E already lost part of its activity. After 6 hours of 20E incubation and 15 hours of washing we can see a great difference between the control and treated groups. These results confirm that the peak in the 20E titer and its subsequent decrease is important to the *Amel-PXD* transcription, exactly like it is for the transcription of the cuticle proteins (Soares *et al.*, 2007).

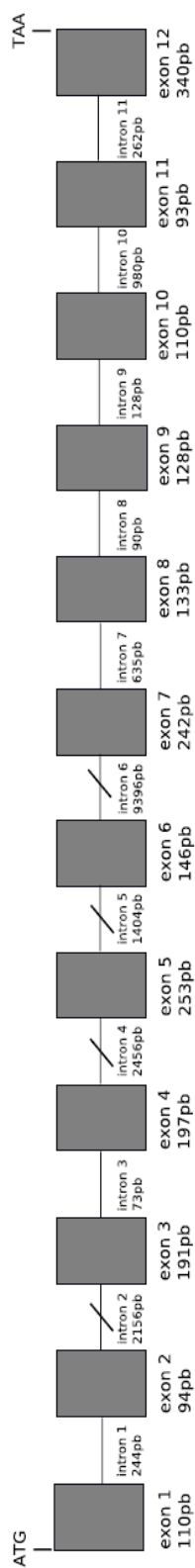
Peroxidase activity was demonstrated in larval and pupal cuticle in insects (Andersen, 2005). The distribution of a peroxidase associated with the formation of a rigid cuticle was studied in the developmental *Calpodes ethlius* (Lepidoptera) larvae. It was also found in the secretory vesicles that release its content to produce the cuticle at the apical surface (Locke, 1969).

The peroxidase enzyme catalyses the oxidation from tyrosine residues that interact to form dityrosine, than leading to protein cross-linking (Heinecke *et al.*, 1993). The peroxidase was found catalyzing the tyrosine cross-linking formation in nematodes as *Gordius villoti* (Brivio *et al.*, 2000) and *Brugia pahangi* (Sayers *et al.*, 1984). Furthermore, it was observed that the peroxidase catalyses this ligations *in vitro* in the presence of hydrogen peroxide in *Caenorhabditis elegans* (Lassandro *et al.*, 1994). The RNAi usage to study the function of a peroxidase expressed in the hypodermal cells bellow the *C. elegans* larvae cuticles resulted in rude abnormalities due to the cuticular cellular matrix organization (Edens *et al.*, 2001).

Our work suggests that the *A. mellifera* peroxidase acts in the sclerotization process, being down-regulated by the ecdysteroid and possibly plays other functions, for example, in the antioxidant systems, which have to be investigate.

A

Peroxidase - GroupUn.1247 + Group4.3



B

ATGTTAACTTTCTGTTTCTTCATTTTTCAGCCCACCGACAGCCGGATCACAGACATGCATCACTTACGATGCCGTG
éxon 1
 AATCGAGCGTATATCGAAGCGAGAAAACGCATCAATGTGGCGCAACCCAAGAACAAAATGTGGAGACCAGAGG
éxon 1 *éxon 2*
 ATTTAGCCACGGTTGGAGAAGCTTTTATTGGATATCAGTGCGAACCTTGACAAACTACGGCCTAACCTTCGAAGA
primer 1F
éxon 2 *éxon 3*
 AATCGAAAAAGTCTACCCTTAATCGACACTTCGAAGACCTTAATTCGCGAGGTGTGCCCTGCTTTTGTAGCAA
éxon 3
 CGTGGAATGTCGTGCTGGTAAATATAGAAGAAACGATGGCTTGTGCACAAATTTACAAAATCCGACATGGGGCG
éxon 3
 CCACATTAGCGCCCTTCAAAGAGTGCTGAGTCCACGATTCGCGGACGGTCTAACAGCGCCTAGAATATCGGTGA
éxon 3 *éxon 4*
 CCAGTCATGATTACCATTATCACGCATAGTGTACGCACTATGCATCCTGACGAGGGTTATCACGATCATGCTG
primer 1R e primer 2F
éxon 4
 GTACAGTCATGGTCATCGCCTGGGGCAGTTTATGGATCACGACTATACGCTAACTGGAACGCCTCTAGATCCTT
éxon 4 *éxon 5*
 TGAACCGAAACGACCCGGAGGAATGTGGCCATCGGCCACCGCACCTGAAGAATCCCTATTGCAACGAGATTCTT
primer 2R e primer 3F
éxon 5
 ATACCGGAAGACGATTATTTCTACAGACTGTTCAACGTGAAATGCATGGACTTCGTTTCGCGCCTTCTGCTGTAC
éxon 5
 GACCTGGATGCCGACTCGGCTCTCGTGTGCCTTTCAATCTTCTTACCGGTGTGCTCGATGGGAACACGGTGTATGGA
éxon 5
 ATCACGGAATCATTGCTAGGAAGCTACGGGCTGTTATGGAGGATTGTTACGCATGAATCCAGTGTCTCAGAATA
éxon 5 *éxon 6*
 CGGACTGAAGGATTATTACCGCTCAAGCTGGATATTCCGGACGAGGGATGCACCCGGCCGAATCGATCGATGTAC
éxon 6
 TGTTCGAGGCGGGTGAGATAAGAGTGAACGAGCAGCTAGTGTTAACCTGCATGCATACTTTGATGGCACGTGAGC
éxon 6 *éxon 7*
 ATAATCGAATTGCGAAGACGTTAATTCAAAATAAATCCTCATTGGGACGATGAAACGCTGTATCAAGAAGCAAGAAG
primer 4F
éxon 7
 AATCGTTATTGCTGAAATTCACATATCACTTATAATGAATTTCTACCCATTTTACTTGGCAAAGATGTCATGGAAA
éxon 7

AATTTGGGCTCCTCCTTGAAAAAATAGCTATTGGGATGTTACGACGAAAGCGTGAATCCATCTGTGA
primer 3R

éxon 7
éxon 8

 TCGATGCTTTTCGCTTCTGCAGCCTTCAGATTCGGACACTCATTATTGCCAACGGCAGTAGAAAGGTGG
éxon 8

 AGTAAAGCTCATAAATTTATTGCTTCGAAAAGACTATCAGATTTGATTAGAAGACCGTTTGATTGTATC
éxon 8
éxon 9

 GTGCTGGAGTTTTTCGACGAATACATTATGGGGTTGATGAACCAAGTTGCTCAAGCTATGGACGATTCT
éxon 9

 ATCACGCAAGAGGTGACAAATCATTATTTAAAAAAGTTGGAGCTAAGTTGGATTGGATCTGGTCTCA
éxon 9
éxon 10

 TTTAATATGCAACGAGGACGTGAATTTGGTATTCCAAGTTATATGGAATTCAGAAAATTCTGTGGACTTC
primer 4R

éxon 10
éxon 11

 CTTGGGTAGACACTTTTGACGAGCTTCACGGTTCATGCCAAACGAAACGATCAGACGCTATAGCTCG
éxon 11

 ATTTTTGAGCATCCAGCTGACGTCGATCTCTGGTCCGGTGGTGTATCCGAGAGACCACTCCGGGTAG
éxon 11
éxon 12

 TATGCTCGGCCAACCTTCGCCTGTATAATCGCCACGCAATTCAGTTATCCCGTCGAGGCGACCGAT
éxon 12

 TTTGGTACGAGTTGCCGAACCAGCCATCGTCCTTCACTCTCGGTAAGAGATTTTCCAATATCCTAAAT
éxon 12

 ATTCCAACAGATTGAAATTTATATACAATTTTGTAGAGAAATCGTTTCCAACCTGCCAATAGAATTCC
éxon 12

 CAAATAGAATTACTTAAATAAAATTATTCTTAAAATTATTAGAATACTAATCGGAATAAGTAATAATTTTAA
éxon 12

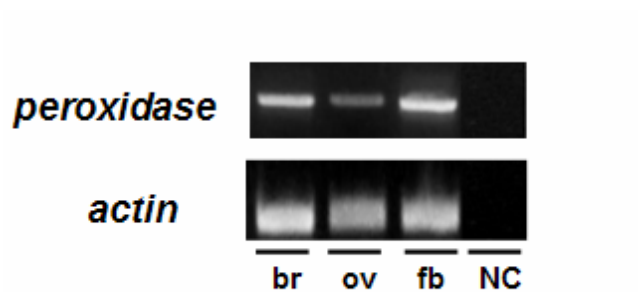


Figure 2 – *Amel-PXD* transcripts levels in different tissues of newly-emerged *A. mellifera* workers. The tissues analysed were: brain (br), ovary (ov) and fat body (fb). The NC sample refers to the negative control (without cDNA). The *actin* transcripts were used as endogenous control. RT-PCR amplification. 1% agarose gelecthidium bromide stained.

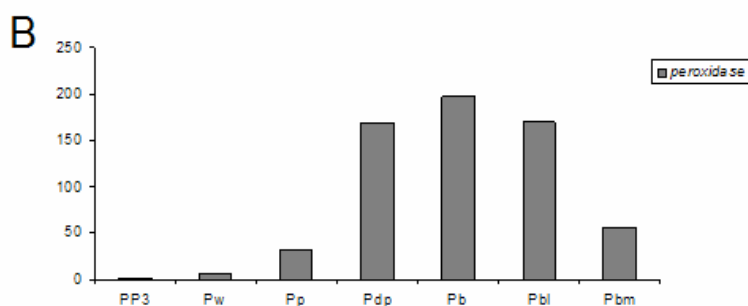
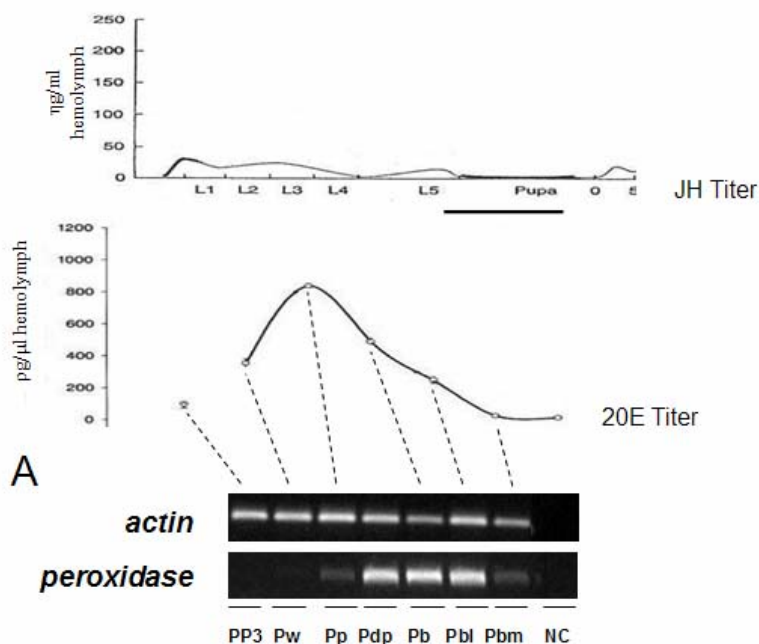


Figure 3– *Peroxidase* gene transcripts levels in the 5th larval instar (PP3) and at pupal stages (from Pw to Pbm) of *A. mellifera* workers. The NC sample refers to the negative control (without cDNA). The *actin* transcripts were used as endogenous control. **A.** RT-PCR amplification. 1% agarose gel ethidium bromide stained. **B.** Densitometry from the gel showed at A. Above: JH titers in *A. mellifera* workers (modified from Bloch *et al.*, 2002). The line above the JH titer graphic indicates the stages analysed. 20E titles in *A. mellifera* workers (modified from: Pinto *et al.*, 2002). The dashed lines in the 20E titer graphic indicates the stages analysed.

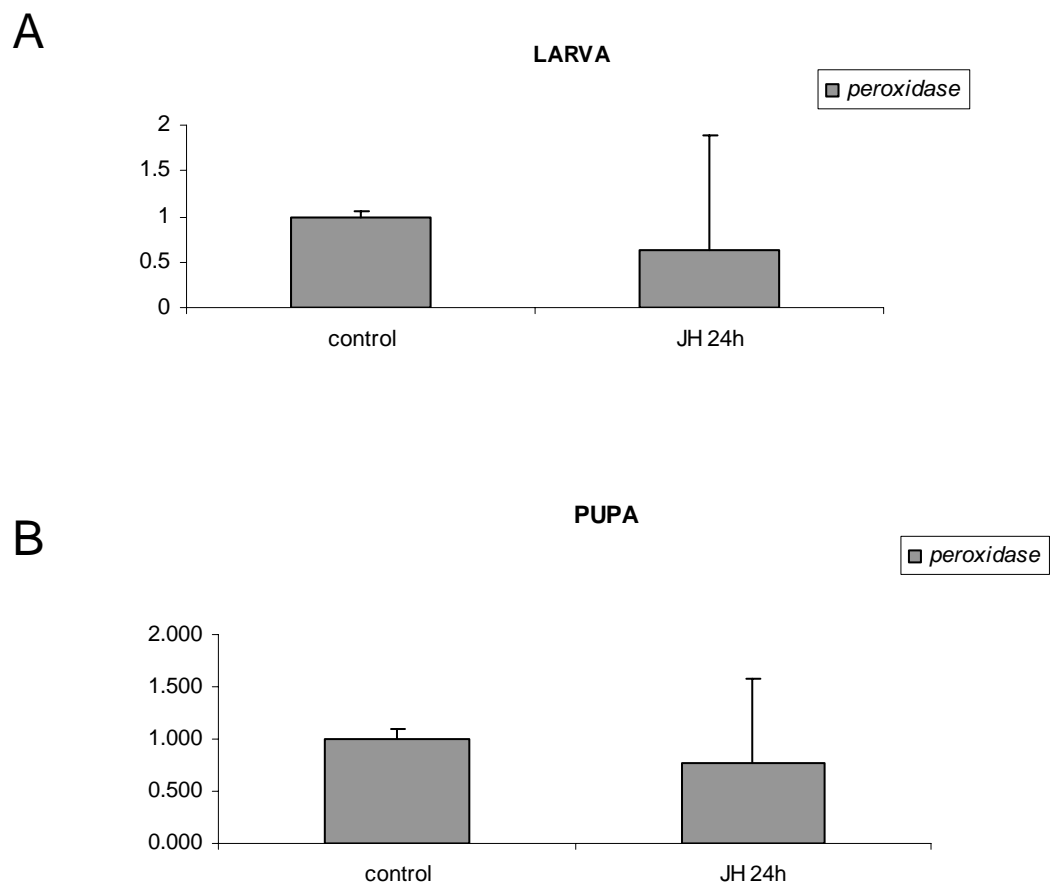


Figure 4– *Peroxidase* gene relative transcripts levels in JH treated samples. Real Time PCR amplification. The ribosomal protein gene *rp49* was used as endogenous control. The graphics were made from the sample mean quantification. Graphics: mean plus standard error. **A.** Treatment made in workers larvae (L5S1). Control samples and 24h after JH topical application samples. **B.** Treatment made in workers pupae (Pb). Control samples and 24h after JH topical application samples (JH 24h).

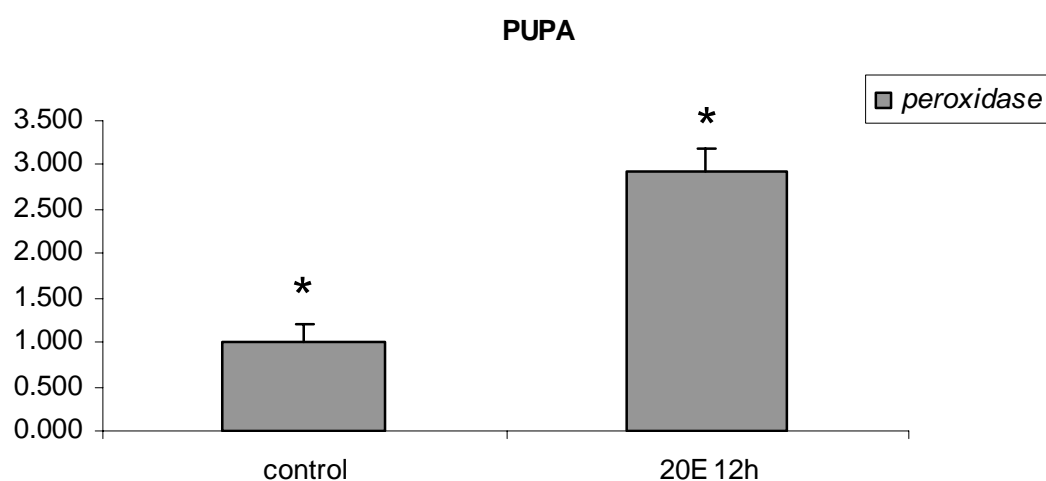


Figure 5– *Peroxidase* gene relative transcripts levels in 20E treated samples. Real Time PCR amplification. The ribosomal protein gene rp49 was used as an endogenous control. The graphics were made from the sample mean quantification. Graphics: mean plus standard error. Treatments made in worker pupae (Pb). Control samples and 12h after 20E injection samples (20E 12h). *statistical difference between the groups ($p=0,011$; t-test).

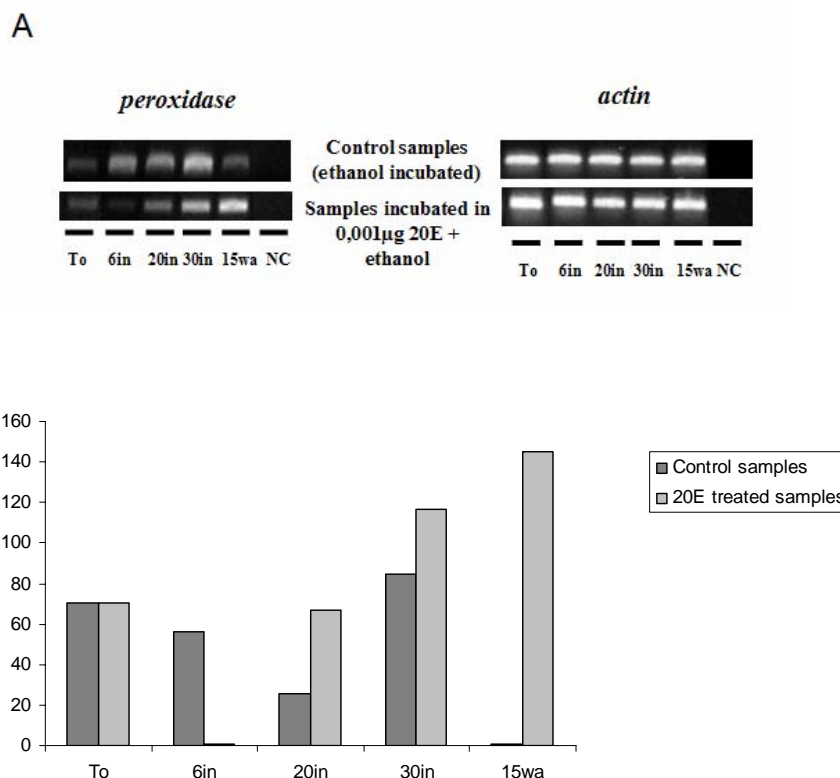


Figure 6 – *Peroxidase* gene transcripts levels in *A. mellifera* workers pupae integuments samples incubated in 0,001µg 20E+ethanol medium and ethanol medium (control). The treatments began in Pw pupae. Individual samples were used. *Actin* gene was used as endogenous control. The incubations times were: T0: zero hours; 6in: 6 hours of incubation in 20E+ethanol or ethanol (control); 20in: 20 hours of incubation in 20E+ethanol or ethanol (control); 30in: 30 hours of incubation in 20E+ethanol or ethanol (control); 15wa: 6 hours of incubation in 20E+ethanol or ethanol followed by 15 hours of incubation in free medium (washing). **A.** RT-PCR amplification. 1% agarose gel ethidium bromide stained. **B.** Densitometry from the gel showed at A.

Literature cited

Andersen, SO. (2005) Cuticular sclerotization and tanning. In: Gilbert, LI; Iatrou, K; Gill, SS, Editors, Comprehensive Molecular Insect Science vol 4. Elsevier Pergamon Press, pp 145-170.

Bloch, G; Wheeler, DE; Robinson, GE. (2002) Endocrine influences on the organization of insect societies. In Hormones, Brain and Behavior. Pfaff, D; Arnold, A; Etgen, A; Fahrbach, S; Moss, R; Rubin, R. (Eds). Vol 3. Academic Press.

Brivio, MF; de Eguileor, M; Grimaldi, A; Vigetti, D; Valvassori, R; Lanzavecchia, G. (2000) Structural and biochemical analysis of the parasite *Gordius villoti* (Nematomorpha, Gordiacea) cuticle. *Tissue & cell*, 32:366-376.

Edens, WA; Sharling, L; Cheng, G; Shapira, R; Kinkade, JM; Lee, T; Edens, HA; Tang, X; Sullards, C; Flaherty, DB; Benian, GM; Lambeth, JD. (2001) Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *The Journal of Cell Biology*, 154:879-891.

Hasson, C; Sugumaran, M. (1987) Protein cross-linking by peroxidase: possible mechanism for sclerotization of insect cuticle. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 5:13-28.

Heinecke, JW; Li, W; Daehnke, HL; Goldstein, JA. (1993) Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 268:4069-4077.

Lassandro, F; Sebastiano, M; Zei, F; Bazzicalupo, P. (1994) The role of dityrosine formation in the crosslinking of CUT-2, the product of a second cuticlin gene of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and biochemical parasitology*, 65:147-159.

Limauro, D; Pedone, E; Pirone, L; Bartolucci, S. (2006) Identification and characterization of 1-Cys peroxiredoxin from *Sulfolobus solfataricus* and its involvement in the response to oxidative stress. *The FEBS Journal*, 273:721-731.

Locke, M. (1969) The localization of a peroxidase associated with hard cuticle formation in an insect, *Calpodes ethlius* stoll, lepidoptera, hesperiidae. *Tissue & Cell*, 1:355-374.

Lourenço, AP; Mackert, A; Cristino, AS; Simões, ZLP. (2008) Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, 39:372-385.

Michelette, E R de F & Soares, A E E. (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, 24:432-440.

Ottaviani, E; Nappi, AJ; Vass, E. (2002) Resistance of the insect cell line IPLB-LdFB to salsolinol-induced apoptosis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 49:1-9.

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

Rachinsky, A; Hartfelder, K. (1998) *In vitro* biosynthesis of juvenile hormone in larval honey bees: comparison of six media. *In vitro Cellular and Developmental Biology. Animal*, 34:646-648.

Sayers, G; Mackenzie, CD; Denham, DA. (1984) Biochemical surface components of *Brugia pahangi* microfilariae. *Parasitology* 89:425-434.

Soares, MPM; Elias-Neto, M; Simões, ZLP; Bitondi, MMG. (2007) A cuticle protein gene in the honeybee: Expression during development and relation to the ecdysteroid titer. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37:1272-1282.

Storz, G; Imlay, JA. (1999) Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2:188-194.

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

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](#)