

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

**O fator de transcrição FTZ-F1**  
**no desenvolvimento e na diferenciação de castas em *Apis mellifera***

**Tathyana Rachel Palo Mello**

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

RIBEIRÃO PRETO – SP

2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

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

**O fator de transcrição FTZ-F1**  
**no desenvolvimento e na diferenciação de castas em *Apis mellifera***

**Tathyana Rachel Palo Mello**

Orientadora: **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Zilá Luz Paulino Simões**

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

RIBEIRÃO PRETO – SP

2008

Mello, Tathiana Rachel Palo

"O fator de transcrição FTZ-F1 no desenvolvimento e na diferenciação de castas em *Apis mellifera*"

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

1. *Apis mellifera* 2. Receptores nucleares 3. metamorfose 4. vitelogenina 5. AmelCRP14

*Aos meus pais, Paulo José de Mello e Márcia Raquel Palo Mello,*

*E aos meus irmãos Yuri Palo Mello e Klaus Palo de Mello,*

*Pelo carinho, dedicação e incentivo, dedico...*

# *Agradecimentos*

Este espaço é dedicado aos muitos que me acompanharam, ajudaram, incentivaram e que de maneira direta ou indireta tornaram possível este trabalho.

Registro, portanto, meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, *Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões* pela oportunidade de fazer parte de seu grupo, pelos ensinamentos durante todos esses anos e pela incansável mão estendida a todos nós, seus privilegiados alunos.

Ao *Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk* pela co-orientação, paciência e incentivo.

À *Profa. Dra. Márcia Gentile Bitondi* pelas sugestões, entusiasmo e constante disposição para ajudar.

À *Vera Figueiredo*, pela amizade e pela solicitude, sempre encontrando soluções para nossos problemas!

A todos os amigos do LBDA pelo companheirismo, sugestões, colaborações, e por tornar ainda mais prazeroso o dia-a-dia no laboratório: *Adriana Mendes, Aline Aleixo, Amanda Assis, Ana Bomtorin, Ana Rita Baptistella, Anete Lourenço, Camila Dias, Carlos Lobo, David Santos, Fernanda Andrade, Flávia Freitas, Gesline Almeida, Juliana Martins, Karina Lazzarini, Liliane Macedo, Michelle Manfrini, Mônica Florecki, Rodrigo Dallaqua, Rogério Pereira, Sérgio Azevedo e Tiago Franco*. Agradecimentos especiais à *Aline Mackert*, amiga e colega de laboratório, por acompanhar de perto meu trabalho, por ter participado na correção desta dissertação e por ter estado sempre disposta a ajudar.

Aos técnicos do apiário experimental do Departamento de Genética: *Adelino Penatti, Jairo Souza, João Santos*, e em especial a *Luiz Aguiar*, pela grande contribuição a este trabalho.

À *Renata Andrade Cavallari*, secretária da pós-graduação, por sua competência.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À *minha família* pelo carinho e apoio incondicional.

E especialmente ao meu namorado, *Fábio Henrique Ramos*, sem o qual todos esses anos teriam sido muito mais difíceis, pela compreensão, paciência, dedicação, por ter sido amigo, psicólogo, e até motorista, não há palavras para agradecer tudo o que tem feito por mim.

# Índice

Resumo .....	2
Abstract .....	3
1 – Introdução .....	4
1.1 – As abelhas <i>Apis mellifera</i> .....	5
1.2 – Diferenciação de castas .....	5
1.3 – Controle hormonal do desenvolvimento pós embrionário .....	6
1.4 – A superfamília dos receptores nucleares .....	7
1.5 – FTZ Factor 1 (FTZ-F1) .....	9
1.6 – FTZ-F1 e a vitelogênese .....	9
1.7 – FTZ-F1 e a transição larva-pupa .....	11
1.8 – Sobre o presente trabalho .....	12
2 – Objetivos .....	14
3 – Material e Métodos .....	16
3.1 – Material biológico .....	17
3.2 – Análise <i>in silico</i> da organização do <i>ftz-fl</i> .....	18
3.3 – Para estudo da seqüência de <i>ftz-fl</i> .....	18
3.3.1 – Extração de RNA .....	18
3.3.2 – Extração de cDNA .....	19
3.3.3 – Amplificação por PCR .....	19
3.3.4 – Ligação do fragmento ao vetor ou clonagem .....	20
3.3.5 – Transformação bacteriana .....	21
3.3.6 – Digestão .....	21
3.3.7 – Sequenciamento e análise de seqüências .....	22
3.4 – Estudos de expressão .....	22
3.4.1 – RT-PCR semiquantitativa .....	22
3.4.2 – RT-PCR em Tempo Real .....	24
3.5 – Tratamento com ecdisona .....	25
3.5.1 – Injeção de 20E .....	25
3.5.2 – Cultivo <i>in vitro</i> de tegumentos .....	26
3.6 – Avaliação da expressão gênica em abelhas <i>knockdown</i> .....	27
3.6.1 – Preparação dos dsRNAs .....	27
3.6.2 – Injeção de dsRNA, obtenção e utilização das amostras .....	29
4 – Resultados .....	33
4.1 – Seqüência e estrutura de <i>ftz-fl</i> de <i>Apis mellifera</i> .....	34
4.2 – Perfil de expressão de <i>ftz-fl</i> durante o desenvolvimento de rainhas e operárias ...	46
4.3 – Efeitos da ecdisona na expressão de <i>ftz-fl</i> .....	50
4.4 – Efeitos do <i>knockdown</i> de <i>ftz-fl</i> no período pupal .....	51
5 – Discussão .....	55
5.1 – Sobre a seqüência de <i>ftz-fl</i> .....	56
5.2 – Sobre os perfis de expressão de <i>ftz-fl</i> e os efeitos da ecdisona .....	58
5.3 – Sobre os efeitos do <i>knockdown</i> de <i>ftz-fl</i> .....	63
6 – Conclusão e Perspectivas .....	67
7 – Referências bibliográficas .....	69

# Resumo

MELLO, T.R.P. **O fator de transcrição FTZ-F1 no desenvolvimento e na diferenciação de castas em *Apis mellifera***. 2008. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O desenvolvimento pós-embrionário de insetos eussociais, como *Apis mellifera*, é um processo especialmente interessante devido à ocorrência de polifenismos. Os principais hormônios reguladores deste processo são o hormônio juvenil (HJ) e os ecdisteróides. Além dos hormônios, outras moléculas que regulam o desenvolvimento são os fatores de transcrição, muitos deles mediando a ação hormonal. Um desses fatores, a proteína FTZ-F1, é membro da superfamília dos receptores nucleares sem ligante conhecido (órfão). Em *Drosophila melanogaster*, FTZ-F1 está envolvido na capacitação para respostas estágio-específicas à ecdisona. Além disso, FTZ-F1 também parece ter participação na regulação da expressão do gene codificador da Vitelogenina (Vg) em *Aedes aegypti*. A Vg, cuja expressão possui características casta-específicas em *A. mellifera*, além de exercer outras funções, é de vital importância para o desenvolvimento do embrião. A regulação da expressão de *vg* em *A. mellifera* tem sido estudada há vários anos e já são conhecidos os efeitos do HJ e da ecdisona sobre este processo. No entanto, os mecanismos que medeiam a ação destes hormônios ainda não estão totalmente esclarecidos. Baseados na hipótese de que FTZ-F1 de *A. mellifera* poderia atuar na transativação de *vg* na abelha da mesma forma que o faz em outros insetos, nos propusemos a obter informações sobre as características de *ftz-fl*, sobre sua expressão e efeitos de seu *knockdown* na abelha; o que colaboraria para a compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a expressão de *vg* e para a avaliação da possível participação de FTZ-F1 na capacitação das respostas estágio-específicas à ecdisona neste inseto. A organização gênica de *ftz-fl* foi estabelecida utilizando seu EST já depositado no GenBank, como referência para a identificação de regiões codificadoras preditas pelo Gnomon. Foi feita a confirmação (validação) da sequência mediante experimentos de clonagem-sequenciamento. O perfil dos transcritos de *ftz-fl* durante o desenvolvimento de rainhas e operárias foi determinado por meio de sqRT-PCR, e o perfil em corpo gorduroso de pupas foi determinado por meio de qRT-PCR. Os resultados mostram uma expressão muito mais alta em rainhas, e coincidente com o início da expressão de *vg* no final do período pupal. Foi observado que a expressão de *ftz-fl* ocorre em períodos de baixos títulos de ecdisteróides, além de ser inibida pela aplicação deste hormônio, como normalmente ocorre em moléculas que atuam como fatores de aquisição de competência. Os níveis de transcritos de nove genes foram analisados nas abelhas *knockdown* de *ftz-fl* e não foram observadas alterações significativas para *actina*, *bursicona a*, *esterase do HJ*, *hormônio da eclosão*, *profenoloxidase*, *receptor de ecdisona* e *ultraspiracle* em relação aos controles. No entanto, o *knockdown* de *ftz-fl* provocou um aumento nos níveis de transcritos de um gene codificador de proteína cuticular, *amelCRP14*, sugerindo que *ftz-fl* regula negativamente a transcrição do mesmo. Além disso, o *knockdown* também provocou uma queda nos níveis de transcritos de *vg*, o que corrobora fortemente nossa hipótese de que este fator participa na ativação da transcrição deste gene.

# Abstract

MELLO, T.R.P. **The transcription factor FTZ-F1 in honeybee development and caste differentiation.** 2008. Thesis (Master) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The development of eusocial insects, such as *Apis mellifera*, is an especially interesting process due to the existence of polyphenism. The main regulator hormones of this process are juvenile hormone (JH) and ecdysteroids. Besides these hormones, other molecules regulate the development, such as the transcription factors. One of them, the protein FTZ-F1, is a member of the nuclear receptors superfamily with unknown ligand (orphan). In *Drosophila melanogaster*, FTZ-F1 functions as a competence factor for stage-specific responses to ecdysone. Furthermore, FTZ-F1 also seems to regulate the expression of the gene that encodes Vitellogenin (Vg) in *Aedes aegypti*. Vg, whose expression has caste-specific characteristics in *A. mellifera*, besides performing other functions, is a protein of vital importance for embryonic development. The regulation of *vg* expression in *A. mellifera* has been studied for several years and the effects of JH and ecdysone on this process are already known. However, the mechanisms that mediate the action of these hormones are still not completely understood. Based on the hypothesis that *A. mellifera* FTZ-F1 could participate of *vg* transactivation in bees as it does in other insects, we proposed to obtain information about *ftz-fl* gene structure, about its expression and the effects of this gene knockdown on bees. It aimed to collaborate in the understanding of the molecular mechanisms that regulate *vg* expression and to evaluate the participation of FTZ-F1 as a competence factor for stage-specific responses to ecdysone in this insect. *ftz-fl* gene organization was determined using its partial sequence deposited in the EST database of GenBank as reference for the identification of coding regions predicted by the Gnomon. The validation of the cDNA sequence was obtained via cloning and sequencing experiments. The transcription pattern of *ftz-fl* during queens and workers development was established by sqRT-PCR, and the pattern in the fat body was established by qRT-PCR. The results show a higher *ftz-fl* expression level in queens than workers, and it is coincident with the start of *vg* expression in the end of pupal stage. It was observed that the expression of *ftz-fl* occurs during low levels of ecdysteroids, besides being inhibited by the injection of this hormone, as it normally happens with molecules that function as competence factors. The effects of *ftz-fl* knockdown on the expression of other nine genes were analyzed. We did not observe statistically significant alterations for *actin*, *bursicon a*, *JH esterase*, *eclosion hormone*, *prophenoloxidase*, *ecdysone receptor* and *ultraspiracle*. Nevertheless, the *ftz-fl* knockdown led to an increase in the levels of *amelCRP14* mRNA, a gene that encodes a cuticle protein, suggesting that FTZ-F1 downregulates its transcription. Moreover, the *ftz-fl* knockdown also provoked a reduction of *vg* transcripts, which corroborates our initial hypothesis that FTZ-F1 participates in the activation of this gene expression.

## *1 – Introdução*

---

### **1.1 – As abelhas *Apis mellifera***

As abelhas *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) são pertencentes à subfamília Apinae, ordem Hymenoptera. Segundo Michener (1974), provavelmente se originaram na África Tropical e Sub-Tropical, sendo atualmente encontradas por todo o mundo, com exceção das regiões polares. Trata-se de uma espécie eussocial com milhares de indivíduos em um mesmo ninho, sendo as fêmeas divididas em duas castas fenotipicamente distintas (rainha e operárias) e os machos (zangões). A rainha é responsável pela postura dos ovos, além de controlar o comportamento e fisiologia das operárias por meio da dispersão de seus feromônios. As operárias constroem os favos, cuidam da cria, defendem o ninho, forrageiam e desempenham diversos outros papéis dentro e fora da colméia. Os machos possuem como função acasalar-se com a rainha (Michener, 1974).

### **1.2 - Diferenciação de castas**

A diferenciação de castas em insetos sociais é um evento bastante complexo e variável entre as espécies. Em *A. mellifera*, esse processo é determinado por fatores nutricionais e hormonais durante o desenvolvimento larval. As larvas podem se desenvolver em operárias ou rainhas, que são geneticamente equivalentes, dependendo da quantidade e qualidade do alimento recebido (Jung-Hoffman, 1966; Beetsma, 1979). A rainha recebe durante todo o seu desenvolvimento larval uma secreção produzida pelas glândulas hipofaríngeas das operárias denominada geléia real. As operárias recebem esta dieta somente até o terceiro estágio larval, quando sua alimentação passa a ser uma mistura de secreções glandulares suplementada com pólen e néctar (Rembold, 1987).

Há indicações de que a alimentação diferencial no caso de rainhas (geléia real) desencadeia respostas específicas do sistema endócrino, ativando a síntese, principalmente do

hormônio juvenil (HJ), produzido em um par de glândulas do complexo retrocerebral denominadas *corpora allata*. Evidências experimentais mostram que a aplicação de HJ nas larvas induz o desenvolvimento de características próprias de rainha (Wirtz & Beetsma, 1972). Resultados semelhantes foram obtidos em abelhas sem ferrão (Velthuis & Velthuis-Kluppell, 1975; Campos et al., 1975). Em *A. mellifera*, os níveis de hormônios ecdisteróides também são mais altos na maior parte da fase larval de rainhas (Rachinsky et al., 1990; Rembold, 1987; Hartfelder & Engels, 1998).

### **1.3 - Controle hormonal do desenvolvimento pós-embrionário**

O desenvolvimento pós-embrionário dos insetos é resultado principalmente de uma perfeita alternância na modulação dos títulos dos hormônios morfogenéticos, ecdisteróides e HJ.

A espécie *A. mellifera*, assim como todos os insetos holometábolos, sofre metamorfose completa. Neste tipo de desenvolvimento, em seguida ao período embrionário, há sucessivos estágios de desenvolvimento larval, uma muda metamórfica e um período de desenvolvimento pupal. O desenvolvimento larval é caracterizado por repetidas mudas separadas por períodos de alimentação (Gullan & Cranston, 1994). Durante o período embrionário, algumas células epidérmicas invaginam-se formando os discos imaginais que, mais tarde, evaginam-se formando estruturas únicas dos adultos, como as principais partes da cabeça e os apêndices do corpo (Agrell & Lundquist, 1973). A diferenciação das estruturas adultas a partir dos discos imaginais também é controlada hormonalmente (Oberlander, 1985).

Os hormônios ecdisteróides são derivados de esteróis, sintetizados e secretados pelas glândulas protorácicas, e ocorrem em todos os insetos formando um grande grupo, sendo a ecdisona e a 20-hidroiecdisona (20E) os representantes mais comuns (Gullan & Cranston, 1994). Em *A. mellifera* o ecdisteróide mais comum é a maquisterona A (Feldlaufer et al., 1985).

Os hormônios juvenis são sesquiterpenóides sintetizados e secretados por um par de glândulas endócrinas, os *corpora allata*, localizados em ambos os lados do esôfago dos insetos (Snodgrass, 1956). São moléculas pequenas e lipofílicas. A manutenção das formas larvais e pupais requer uma alta e baixa taxas de HJ respectivamente, e a emergência do adulto também ocorre com níveis baixos desse hormônio (Nijhout & Wheeler, 1982).

Uma seqüência de pelo menos dois picos de ecdisteróides no último instar larval parece fazer parte do padrão geral de metamorfose dos insetos holometábolos (Riddiford, 1980a). O primeiro desses picos induz as células epidérmicas ao programa pupal de síntese da cutícula (Riddiford, 1980b) e o segundo pico induz uma série de respostas metamórficas que inclui a eversão dos discos imaginais e histólise dos tecidos larvais (White et al., 1997).

#### **1.4 – A superfamília dos receptores nucleares**

A complexidade dos processos que levam ao crescimento, diferenciação e desenvolvimento de um organismo requerem um controle altamente coordenado da expressão gênica. Esse controle é mediado por proteínas denominadas fatores de transcrição, capazes de se ligarem às regiões promotoras de genes específicos, controlando sua transcrição. Os fatores de transcrição são muito diversos e formam famílias de proteínas similares estruturalmente. Uma dessas famílias é a superfamília dos receptores nucleares (Gilbert, 2006).

Esta superfamília inclui receptores de esteróides, de hormônios tireóideos, retinóides e vitamina D (Kastner et al., 1995; Mangelsdorf et al., 1995), além de um grande número de receptores cujos ligantes não foram identificados, os chamados receptores órfãos (em Escriva et al., 2000).

Os membros da superfamília dos receptores nucleares possuem uma estrutura que pode ser dividida em 5 domínios: o domínio A/B, altamente variável em seqüência e tamanho, exerce função de transativação; por meio dele é feito o contato com outros fatores de transcrição e nele

encontra-se uma região de transativação independente de ligante (AF-1) (em Aranda & Pascual, 2001).

O domínio C (domínio de união a DNA, ou DBD – *DNA binding domain*) é constituído de 66 a 68 aminoácidos e permite a dimerização, posto que os receptores nucleares formam complexos homodiméricos e/ou heterodiméricos. O DBD inclui dois motivos de ligação do tipo *zinc fingers* responsáveis pelo reconhecimento e união aos elementos de resposta hormonal (ERH). Os ERH estão espalhados pelo genoma e regulam a expressão de genes próximos em combinação com outros fatores de transcrição. Tipicamente, os ERH são formados por repetições ordenadas de maneira direta ou invertidas (denominadas *half sites*) que estão separadas entre si por um número variável de nucleotídeos. No DBD localizam-se também o P-Box e o D-Box, regiões que conferem ao receptor uma especificidade para um ERH particular (Henrich & Brown, 1995).

O domínio D tem a função de localização nuclear, permite a mudança de conformação do receptor e está posicionado entre os domínios C e E (Henrich & Brown, 1995). Este último é o domínio mais longo (220 a 250 aminoácidos) e possui funções variadas como ligação ao hormônio (LBD), dimerização, associação a proteínas de choque térmico, transativação e localização nuclear. O LBD é composto de 11 a 12  $\alpha$ -hélices (de H1 a H12). H12 possui um motivo de transativação dependente de ligante denominado AF-2. Após a ligação ao hormônio, há uma mudança conformacional expondo AF-2 que, então, pode reagir com coativadores (Wurtz et al., 1996). Alguns desses receptores possuem também um domínio carboxi-terminal cuja função ainda não é bem compreendida (Henrich & Brown, 1995).

Os ligantes de receptores nucleares podem ser definidos como pequenas moléculas hidrofóbicas que se ligam diretamente ao LBD e promovem um rearranjo estrutural permitindo que AF-2 interaja com co-reguladores transcripcionais (coativadores ou correpressores) que irão conectar o receptor à maquinaria básica de transcrição, resultando na ativação/repressão da transcrição do gene alvo (em Escrive et al., 2000).

### **1.5 - FTZ Factor 1 (FTZ-F1)**

A proteína FTZ-F1, identificada como um ativador transcricional do gene homeótico *fushi tarazu (FTZ)* em *Drosophila melanogaster* (Ueda et al., 1990), é membro da superfamília dos receptores nucleares (Lavorgna et al., 1991), sem ligante conhecido (órfão).

*ftz* é um gene de segmentação da classe "pair-rule" localizado no complexo *Antennapedia* em *D. melanogaster* (Wakimoto et al., 1984). Mutações que acarretam perda de função de FTZ produzem deleções dos parasegmentos pares (Struhl, 1985).

Em *D. melanogaster*, *ftz-fl* codifica duas isoformas de mRNA e proteínas que diferem na mobilidade eletroforética e padrões de expressão temporal durante a embriogênese. Uma forma, *αftz-fl*, é expressa em embriões na fase de blastoderme coincidindo com a expressão de *ftz*. Já a transcrição da outra forma, *βftz-fl*, ocorre no embrião tardio e no meio do desenvolvimento pré-pupal, paralelamente à expansão do puff 75CD (Lavorgna et al., 1993; Ueda et al., 1990; Woodard et al., 1994). Experimentos de *Southern blotting* mostraram que *ftz-fl* encontra-se em cópia simples no genoma de *A. mellifera* (A.R. Barchuk, comunicação pessoal).

### **1.6 – FTZ-F1 e a vitelogenese**

Os ecdisteróides e o HJ atuam em processos relacionados à diferenciação de castas como a expressão de vitelogenina (*vg*). A vitelogenina é uma fosfolipoglicoproteína sintetizada no corpo gorduroso e é precursora da vitelina, principal proteína do vitelo, suprimento necessário para o desenvolvimento do embrião até a eclosão do ovo (ver Valle, 1993). Esta proteína é secretada do corpo gorduroso para a hemolinfa. Então é captada pelos ovócitos em crescimento através de endocitose mediada por receptores, sendo armazenada em amplas vesículas no citoplasma destas células (Raikhel & Dhadialla, 1992; Valle, 1993; Gilbert, 2006).

---

Em abelhas *A. mellifera*, a síntese de Vg pelo corpo gorduroso está normalmente limitada às fêmeas e é especialmente intensa nas rainhas. Porém, também é possível encontrar pequenas quantidades desta proteína na hemolinfa de zangões nos primeiros quinze dias da vida adulta (Paulino Simões, 1984; Trenczek et al., 1989). Durante o período larval, o mRNA codificador de Vg é detectado em altos níveis já nos primeiros estágios larvais, decaindo no período pré-pupal. Esse mesmo padrão é observado em rainhas, operárias e zangões (Guidugli et al., 2005a). Na fase pupal, em rainhas, ocorre a expressão de *vg* antes do estágio de pupa de olho marrom com cutícula pigmentada (Pbd), o que ocorre aproximadamente trinta horas antes da emergência do adulto. Já em operárias, a transcrição ocorre em pupa faratas (ou Pbd mais velhas) pouco antes da emergência do adulto. Em rainhas, os picos nos níveis de mRNA de *vg* são pequenos até a fase de pupa farata, havendo um abrupto aumento na expressão nas recém-nascidas. Em operárias, não há nenhuma variação significativa nos níveis de transcrição do gene ou na quantidade de proteína no final da fase pupal, mostrando até os três dias após a emergência do adulto, pequenos níveis de expressão (Barchuk et al., 2002, Piulachs et al., 2003).

O início da expressão de *vg*, tanto em rainhas quanto em operárias, coincide com um discreto aumento nos níveis de HJ no final da fase pupal, e acontece em presença de baixos níveis de ecdisteróides. O HJ exógeno promove a síntese de Vg em pupas de ambas as castas contanto que os níveis de ecdisteróides estejam baixos. E níveis altos de ecdisona no final do período pupal inibem o início da síntese de Vg (Barchuk et al., 2002). Outros experimentos mostraram que baixos títulos de HJ permitem o início da síntese e o acúmulo de Vg na hemolinfa, enquanto altos títulos do hormônio inibem a síntese de Vg (Pinto et al., 2000)

Amdam & Omholt (2003) propuseram uma hipótese para explicar o controle da transição de operárias nutridoras (que permanecem dentro da colméia) para operárias forrageiras que envolve a participação de Vg. Esta transição só começa a ocorrer a partir do 4º dia de vida da abelha adulta. A hipótese da dupla repressão propõe que dois fatores reprimem esta transição: fatores externos, que seriam sinais transmitidos fisicamente por abelhas forrageiras para as

---

nutridoras gerando reações fisiológicas nas últimas; e um fator interno direta ou indiretamente ligado à quantidade de Vg na hemolinfa. Tanto o repressor interno quanto o externo inibem o eixo alato-regulatório, no sistema nervoso central alato-regulatório (ACNS), que, desta forma, diminui a expressão de HJ. O ACNS, quando ativado, tem um efeito positivo em uma via de diferenciação independente de HJ (que leva à transição para forrageira). O HJ tem um efeito positivo em uma via de diferenciação dependente deste hormônio (que também leva à transição para forrageira). A perda de intensidade do repressor externo leva à ativação do ACNS e, portanto, à ativação das vias de diferenciação dependente e independente de HJ. A falta de carboidratos e proteínas causa uma depleção no estoque de Vg (fato que normalmente ocorre na vida adulta das operárias), e a falta de Vg, por sua vez, provoca um efeito negativo no repressor interno, o que leva à transição para forrageira independentemente da situação do repressor externo. Na vida normal da operária adulta, um aumento nos títulos de HJ e uma queda nos níveis de Vg antecedem o início do forrageamento. Experimentos de *knockdown* de *vg* em abelhas adultas corroboram esta hipótese (Guidugli et al., 2005a).

Em *Aedes aegypti*, foi observado que os ecdisteróides têm um papel central no controle da vitelogênese.  $\beta$ FTZ-F1 pode estar envolvida neste processo, já que o aparecimento da proteína AaFTZ-F1 ativa coincide com o período de aquisição de competência às respostas estágio-específicas da ecdisona (ver Raikhel et al, 2002).

### **1.7 – FTZ-F1 e a transição larva-pupa**

Em vertebrados, um regulador-chave na síntese de ecdisteróides é o receptor nuclear órfão *Steroidogenic Factor 1* – SF-1 (ver Parker et al., 2002) que induz a transcrição de genes diretamente ou indiretamente ligados à síntese de esteróides (Val et al., 2003).

SF-1 é ortólogo ao  $\beta$ FTZ-F1. Em *D. melanogaster*, o pequeno aumento de ecdisteróides que ocorre no 3º instar larval induz a expressão de  $\beta$ FTZ-F1 ou a translocação para o núcleo do

---

$\beta$ FTZ-F1 já presente no citoplasma. Subsequentemente,  $\beta$ FTZ-F1 aumentaria a transcrição dos genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de esteróides através de um *feedback* positivo, levando ao grande aumento nos títulos do hormônio observado no final do 3º instar larval. Esse pico de ecdisteróides induz então a transição larval-pupal (Parvy et al., 2005).

Broadus et al. (1999) sugerem que  $\beta$ FTZ-F1 provê competência para respostas estágio-específicas da ecdisona em *D. melanogaster*.  *$\beta$ ftz-f1* é expresso durante baixos níveis deste hormônio na pré-pupa intermediária, período em que esta competência é adquirida (Richards, 1976; Lavorgna, 1993).

Outros receptores nucleares órfãos participam da regulação das respostas estágio-específicas da ecdisona. Um pico de ecdisona no final do desenvolvimento larval induziria diretamente a expressão de *e75b* e *dhr3*, expressão esta que também depende da síntese de outras proteínas induzidas por ecdisona (Segraves & Hogness, 1990; Horner et al., 1995). Drh3 induz a transcrição de  *$\beta$ ftz-f1* na pré-pupa intermediária e parece exercer esse efeito ligando-se a três sítios adjacentes no promotor de  *$\beta$ ftz-f1* (Kageyama et al., 1997; White et al., 1997). Esta função de Drh3 pode ser negativamente regulada pela heterodimerização com E75b (White et al., 1997). Ecdisona também pode reprimir diretamente a transcrição de  *$\beta$ ftz-f1*, restringindo sua expressão à pré-pupa intermediária, no intervalo entre os picos de ecdisona em larva tardia e em pré-pupa tardia.  *$\beta$ ftz-f1* também reprime sua própria transcrição, assegurando uma expressão de curta duração (Woodard et al., 1994; Thummel, 1996; Thummel, 2001).

### **1.8 - Sobre o presente trabalho**

A expressão de *vg* em *A. mellifera* representa um evento de interesse da biologia molecular *per se* já que se desconhecem os mecanismos moleculares que mediam a ação reguladora dos hormônios mencionados acima. Ademais, o produto protéico de *vg* possui participação fundamental em vários processos da biologia deste inseto social, que inclui o

polietismo seqüencial de operárias adultas, fenômeno ainda não totalmente conhecido relacionado ao controle da síntese de HJ e aos níveis de Vg circulantes.

Perfis de expressão de *ultraspiracle* (*usp*) durante o desenvolvimento pupal sugeriram a participação deste gene na regulação da expressão de *vg*. Porém, experimentos de *knockdown* de *ultraspiracle* não confirmaram esta hipótese (Barchuk et al., 2008). Considerando estes resultados e a função chave de FTZ-F1 em eventos fundamentais do desenvolvimento de alguns dípteros, como a competência nas respostas estágio-específicas à ecdisona (*Drosophila*; Broadus et al., 1999) e na vitelogênese (*Aedes*; Richards, 1976; Lavorgna, 1993), hipotetizamos sua participação no controle da expressão de *vg* em abelhas melíferas comuns (*A. mellifera*). Ademais, conhecer o perfil de expressão de *ftz-fl* durante o desenvolvimento pós-embrionário de rainhas e operárias nos daria informação sobre uma possível participação deste gene em outros processos que conduzem à diferenciação de castas nestas abelhas.

## *2 – Objetivos*

---

- Determinar a organização gênica do *ftz-fl* de *Apis mellifera*;
- Determinar o perfil de expressão de *ftz-fl* durante o desenvolvimento pós-embrionário de rainhas e operárias *Apis mellifera*, especialmente no corpo inteiro e no corpo gorduroso (responsável pela síntese de Vg);
- Avaliar, no período pupal, os efeitos dos ecdisteróides sobre a expressão de *ftz-fl*;
- Identificar potenciais genes alvo de FTZ-F1 no desenvolvimento pupal da abelha, particularmente *vg*.

## *3 – Material e Métodos*

---

### **3.1 – MATERIAL BIOLÓGICO**

O material biológico utilizado, operárias e rainhas de *Apis mellifera* em diferentes estágios de desenvolvimento pós-embrionário (Tabela 1), foi coletado no Apiário do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. As fases do desenvolvimento de operárias e rainhas foram identificadas segundo Michelette & Soares (1993) e Rembold et al. (1980), respectivamente. As características de rainhas foram uma adaptação dos dados de Rembold et al. (1980) para abelhas africanizadas.

Tabela 1: Fases do desenvolvimento pós-embrionário de *A. mellifera* utilizadas neste estudo e suas abreviaturas.

<b>Fases do desenvolvimento</b>	<b>Abreviatura</b>
4º instar larvar	L4
5º instar larval – fase de alimentação 1	F1
5º instar larval – fase de alimentação 2	F2
5º instar larval – fase de alimentação 3	F3
5º instar larval – fase de tecelagem do casulo 1	S1
5º instar larval – fase de tecelagem do casulo 2	S2
5º instar larval – fase de tecelagem do casulo 3	S3
Pré-pupa 1	PP1
Pré-pupa 2	PP2
Pré-pupa 3	PP3
Pupa de olho branco	Pw
Pupa de olho rosa	Pp
Pupa de olho rosa escuro	Pdp
Pupa de olho marrom sem pigmentação na cutícula	Pb
Pupa de olho marrom com pigmentação leve na cutícula	Pbl
Pupa de olho marrom com pigmentação mediana na cutícula	Pbm
Pupa de olho marrom com pigmentação forte na cutícula	Pdb
Recém nascida	RN

### **3.2 - ANÁLISE *in silico* DA ORGANIZAÇÃO DO *ftz-fl***

O genoma de *A. mellifera* com seqüências codificadoras previstas pelo *Official Set* está disponível em rede no site <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee>. Para a determinação da organização gênica de *ftz-fl*, utilizamos a etiqueta de seqüência expressa (EST) depositada no GenBank por Ryszard Maleszka (BI946427). Esta EST foi utilizada em um BLASTNT (nucleotídeo versus nucleotídeo) contra o *Official Set* 4.0 do genoma de *A. mellifera* ([http://zulu.fmrp.usp.br/beelab/bioinfo\\_blast](http://zulu.fmrp.usp.br/beelab/bioinfo_blast)) para a localização da seqüência prevista de *ftz-fl* no genoma. Este procedimento foi feito mediante a utilização do pacote informático Artemis (Sanger Institute), disponível no site <http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis>. Após a identificação da organização gênica do *ftz-fl* de *A. mellifera*, foi feita a confirmação (validação) da seqüência do cDNA mediante experimentos de clonagem-seqüenciamento utilizando *primers* específicos.

### **3.3 - PARA ESTUDO DA SEQÜÊNCIA DE *FTZ-F1***

#### **3.3.1 - Extração de RNA**

As extrações de RNA total do animal inteiro ou de corpo gorduroso foram feitas pelo método de extração por TRIzol (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento de RNA total, Cat. No. 15596, Invitrogen). Após a obtenção do RNA, as amostras foram incubadas a 37°C durante 30min na presença de DNase e posteriormente a 65°C durante 10min (inativação da enzima).

### 3.3.2 - Síntese de cDNA

Tanto para os experimentos de amplificação do cDNA para posterior clonagem, quanto para utilização em PCR quantitativa e semiqüantitativa, o RNA total foi submetido à retro-transcrição (RT) usando-se o kit *SuperScript II* (Cat. 18064-014, Invitrogen) com o Oligo (dT)12-18 (Cat. 18418-012, Invitrogen) como *primer*.

### 3.3.3 - Amplificação por PCR

A amplificações do cDNA de *ftz-f1* de *A. mellifera* utilizando *primers* específicos (Tabela 2) foram feitas misturando-se 0,8µL de *forward primer* (10µM); 0,8µL de *reverse primer* (10µM); 1µL de DNA (obtido segundo detalhado na seção anterior); 7,4µL água destilada esterilizada; 10µL de *Master Mix* (2X; Promega, Cat. nº M7502), em um tubo de 200µL.

A mistura acima era submetida ao seguinte programa de amplificação:

94° C por 2min  
94° C por 30seg }  
60° C por 30seg } 45 vezes  
72° C por 40seg }  
72° C por 10min  
4° C por tempo indeterminado

Os produtos de amplificação eram separados em géis de agarose 1% corados com Brometo de Etídio (EtBr) e as bandas obtidas eram cortadas e submetidas à recuperação do DNA mediante o uso de QIAquick Gel Extraction Kit (Cat. 28706, QIAGEN), levando a peça de gel a 50° C em tampão até dissolver a agarose e submetendo a solução a uma coluna de filtragem onde o DNA era lavado e posteriormente recuperado no tampão de eluição.

Tabela 2 – *Primers* utilizados para o seqüenciamento de *ftz-f1* de *Apis mellifera*.

<i>Primers</i>	Seqüências
ftz-f1-1F	5'-ATGTCTGGTTATCAGTATGGTC-3'
ftz-f1-1R	5'-GACATTGCCGCTTACCGTAG-3'
ftz-f1-2F	5'-GGTGGTGGAGGAGGAACG-3'
ftz-f1-2R	5'-AGGGACACCGCTTTCTTTG-3'
ftz-f1-3F	5'-CCGGTCTGCGGCGACAAA-3'
ftz-f1-3R	5'-CAGGGTTGAGATTGTGCAG-3'
ftz-f1-4F	5'-TCTTCTCCAGATTCGAGTCCA-3'
ftz-f1-4R	5'-CGAGCACCAACATATCTGAC-3'
ftz-f1-5F	5'-AGGTGGACTGGGCAAGGA-3'
ftz-f1-5RA	5'-TCATTTTCTTTTAGCATGAAG-3'
ftz-f1-5RB	5'-TCCATGAGAAGAGTTTGAGTT-3'

Para o desenho de *primers*, foi utilizado o programa Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)).

### 3.3.4 - Ligação do fragmento ao vetor ou clonagem

Os fragmentos de DNA amplificados e recuperados dos géis de agarose foram inseridos em um vetor plasmidial flanqueado pelo sítio de restrição de EcoRI. Para a ligação foi utilizado o Kit Invitrogen 45-0641 Topo TA Cloning<sup>®</sup> Kit (PCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> Vector, Cat. K4500-01). Para isso eram utilizados 4µL do produto da PCR; 1µL de solução salina (tampão de ligação); 0,7µL de Topo vector; 0,3µL de água destilada esterilizada que eram posteriormente incubados em temperatura ambiente por 30 minutos.

### 3.3.5 - Transformação bacteriana

Para a transformação bacteriana eram utilizados os 6 $\mu$ L de solução plasmidial. Esta solução era colocada em um tubo de 1,5 mL, contendo uma suspensão bacteriana (bactérias *Escherichia coli* competentes da linhagem DH5 $\alpha$ ), e incubada em gelo durante 30 minutos. Posteriormente, a suspensão era submetida a um choque de temperatura à 42°C por 30 segundos, e subseqüentemente era incubada em gelo por 90 segundos. Em seguida, eram adicionados 250 $\mu$ L de meio líquido Luria Bertani (LB) e o conjunto era incubado a 37°C sob agitação de 160 rpm. Após 1 hora de incubação, a suspensão era centrifugada e o excesso de meio descartado ( $\cong$  100 $\mu$ L de meio). Após este procedimento, o *pellet* era ressuspendido e semeado em placa de Petri com meio LB-ágar contendo X-Gal, IPTG e ampicilina para seleção *Blue/White*. As placas eram mantidas a 37° C por 12h depois levadas à geladeira para que as colônias azuis se destacassem.

As colônias brancas, constituídas de clones de bactérias contendo o inserto, eram inoculadas em tubos de polipropileno contendo 5mL de meio líquido com antibiótico (LB + Ampicilina) e estes eram incubados a 37°C, sob agitação de 160 rpm, "overnight". O conteúdo de cada tubo era transferido para um tubo de 2mL que era centrifugado para a obtenção de um *pellet*. O *pellet* resultante era submetido a uma minipreparação para extração de DNA plasmidial utilizando o QIA Prep. Spin Miniprep Kit (250) (Cat.27.106) seguindo-se as instruções do fabricante.

### 3.3.6 - Digestão

O produto das minipreparações era submetido à digestão enzimática com a enzima EcoRI para verificar a presença do inserto na amostra. Para a digestão era feita uma mistura de 3 $\mu$ L de

DNA plasmidial; 2µL de tampão para EcoR I (Buffer 3); 14,5µL de água destilada esterilizada; 0,5µL de EcoR I, que era incubada por 1h a 37° C. Posteriormente, os produtos de digestão eram separados em géis de agarose 1% corados com EtBr e visualizados sob luz ultravioleta.

### **3.3.7 - Seqüenciamento e análise de seqüências**

O seqüenciamento foi feito segundo a metodologia de Sanger (1977), usando-se o kit T7, conforme especificações do fabricante.

As seqüências obtidas foram analisadas mediante consultas a programas dispostos nos seguintes sites:

<http://www.justbio.com> (para tradução de seqüências de nucleotídeos);

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (BLAST, para comparação de seqüências)

<http://www.clustalw.gemnome.adp.jp> (para alinhamento das seqüências)

## **3.4 – ESTUDOS DE EXPRESSÃO**

O estudo de expressão de *ftz-fl* em animais inteiros foi realizado por RT-PCR semiquantitativa. Para os estudos de expressão em corpo gorduroso de pupas de rainhas e operárias utilizou-se RT-PCR em Tempo Real.

### **3.4.1 – RT-PCR semiquantitativa**

O RNA extraído de cada estágio de desenvolvimento de larvas e pupas de rainhas e operárias foi submetido a 3 medidas de concentração e uma alíquota de 2µg foi utilizada para a

síntese de cDNA que era então diluído 10 vezes e usado para avaliação da expressão de *ftz-f1* por RT-PCR semiquantitativa ou quantitativa.

A realização dos experimentos de PCR semiquantitativa requer a determinação do número de ciclos de amplificação que corresponda a um aumento linear na quantidade de produto. Para isto foram retiradas amostras seqüenciais durante a reação de PCR e os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com EtBr. No caso dos experimentos realizados, constatou-se que o número ideal de ciclos era de 40. Também é necessário que seja feita a amplificação de um RNA presente em proporções relativamente constantes durante o desenvolvimento para normalizar os resultados obtidos. Em nosso caso, utilizamos o RNA da  $\beta$ -actina (sub-clonado e seqüenciado em nosso Laboratório).

Para a amplificação definitiva dos cDNAs das amostras, eram adicionados em tubos de 200 $\mu$ L; 0,8 $\mu$ L de *forward primer*\*(10 $\mu$ M); 1 $\mu$ L de cDNA diluído 10 vezes; 0,8 $\mu$ L de *reverse primer*\*(10 $\mu$ M); 10 $\mu$ L de Master Mix (2X; Promega, Cat. n<sup>o</sup> M7502); 7,4 $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada.

Essa mistura era submetida ao seguinte programa de amplificação:

94° C por 2mim  
94° C por 30seg }  
60° C por 30seg } 40 vezes  
72° C por 40seg }  
72° C por 7mim  
4° C por tempo indeterminado

\*Os *primers* utilizados para estes experimentos foram *ftz-f1-5F* e *ftz-f1-5RB* (Tabela 2).

As amplificações foram feitas no aparelho GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems.

Os produtos de amplificação eram submetidos à eletroforese em géis de agarose (1%, corado com EtBr) depois da adição de tampão corante. As corridas eram feitas (100V/cm<sup>2</sup>) por aproximadamente 1h. Imediatamente depois, os géis eram fotografados.

Este processo foi repetido 3 vezes para todo o conjunto de amostras de cada fase do desenvolvimento de rainhas e operárias. A partir das fotos dos géis, era feita uma análise de densitometria das bandas utilizando-se o programa Kodak 1D 3.6 e então era feita uma média dos valores de densitometria de cada amostra. As bandas obtidas a partir da amplificação do cDNA com *primers* para *actina* também eram analisadas e os resultados eram utilizados para a normalização e então elaboração dos gráficos com o programa Microsoft Excel 2003.

### 3.4.2 - RT-PCR em Tempo Real

As análises de RT-PCR em Tempo Real foram feitas utilizando-se o aparelho *7500 Real Time PCR* (Applied Biosystems).

Os seguintes *primers* específicos foram utilizados:

Para *ftz-fl*:

RealT-F: 5' – GAC TGG GCA AGG AAT TCT GT – 3'

RealT-R: 5'– CCA TTA TGA AGC GTA GTC TCA – 3'

Para *actina*:

Act-F: 5' – TGC CAA CAC TGT CCT TTC TG – 3'

Act-R: 5' – AGA ATT GAC CCA CCA ATC CCA – 3'

Para as análises da eficiência dos *primers* foi montada uma curva padrão para cada um dos pares de *primers* utilizando diluições seriadas de cDNA (sem diluição; 1:10; 1:100; 1:1000 e 1:10000). Os valores de eficiência da PCR (E) foram calculados para cada gene individualmente

---

a partir do valor obtido de *slope* após reações de curva padrão e utilizando a fórmula:  $E = 10^{-1/\text{slope}}$  (Applied Biosystems, 1997)

Para assegurar a amplificação de apenas um único fragmento e a ausência de contaminação de DNA genômico foram utilizadas as análises de dissociação das curvas de amplificação. No caso de contaminação com DNA genômico dois picos de dissociação seriam visualizados, pois, os *primers* para *ftz-fl* foram desenhados flanqueando um íntron.

A mistura da reação consistia em 10 $\mu$ L de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems); 0,8 $\mu$ L de cada *primer* 10  $\mu$ M; 1 $\mu$ L de cDNA (diluído 10 vezes); 7,4 $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada.

Para confirmar que os *primers* amplificavam fragmentos específicos, os mesmos foram previamente amplificados por PCR, clonados e seqüenciados. Os valores de quantificação relativa foram calculados utilizando-se a metodologia de Pfaffl (2001).

### **3.5 – TRATAMENTO COM ECDISONA**

#### **3.5.1 – Injeção de 20E**

Com o objetivo de avaliar a resposta de *ftz-fl* a ecdisona (20E) foram feitos experimentos de aplicação desse hormônio em pupas de olho marrom, corpo não pigmentado (Pb) e posteriormente testada sua expressão no corpo gorduroso destes indivíduos. A fase Pb foi escolhida por ser o momento em que as concentrações de ecdisona começam a cair continuamente após um pico elevado (Rachinsky et al., 1990; Hartfelder & Engels, 1998). Assim procedendo, poderíamos verificar o efeito da persistência de 20E no corpo da pupa.

As pupas receberam uma injeção contendo 5 $\mu$ g de 20E diluído em 2 $\mu$ L de etanol+ringer. A quantidade de hormônio foi determinada com base em experimentos realizados anteriormente por Barchuk et al. (2004). Os grupos controles receberam apenas os solventes. Pelo menos três

grupos, consistindo de aproximadamente sete indivíduos cada um foram usados em cada experimento.

Todos os grupos eram mantidos em estufa (34°C, 80% de umidade relativa) por 1, 12 e 24 horas após os tratamentos. É interessante ressaltar que cada um dos tratamentos (1h, 12h e 24h) foi feito independentemente, pois não era nosso objetivo avaliar a duração da resposta gênica ao aumento artificial de hormônios endógenos, mas sim quão rápida ou lenta seria essa resposta.

Para a coleta do corpo gorduroso era feita uma incisão longitudinal no abdômen das pupas que, em seguida, eram colocadas em placas de cultivo contendo solução salina (0,9%) e agitadas para que o seu corpo gorduroso (CG) se dispersasse. Em seguida essa solução contendo o CG de pupas de operárias era colocada em tubos de 2mL e submetida a uma centrifugação leve (3000 rpm – 1 minuto) para que o *pellet* de CG formado fosse utilizado para extração do RNA (como na seção 3.3.1) e posterior RT-PCR semiquantitativa.

### **3.5.2 – Cultivo *in vitro* de tegumentos**

Para a incubação *in vitro*, tegumentos torácicos de pupas Pw foram coletados e dissecados em solução Ringer, em uma capela esterilizada, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, retirando-se ao máximo o corpo gorduroso aderente. Conjuntos de 5 tegumentos foram incubados em 1 mL de meio de cultivo próprio para abelhas (Rachinsky & Hartfelder, 1998), contendo ou não 20E. Antes da adição dos tegumentos, o meio de cultivo foi separado em alíquotas às quais foram adicionadas diferentes concentrações de 20E (1 ou 0,001µg por mL) dissolvido em etanol absoluto (Merck).

Para melhorar a solubilização de 20E, o meio contendo o hormônio foi sonificado durante 12 min. As alíquotas de meio de cultivo “controle”, contendo ou não etanol, foram também sonificadas. Na condição de solvente de 20E, ou quando utilizado separadamente, o 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. Após o cultivo, os tegumentos foram transferidos para tubos contendo 1mL de Trizol e armazenados a -80°C para posterior extração de RNA total.

### **3.6 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM ABELHAS *knock-down***

#### **3.6.1 – Preparação dos dsRNAs**

Para a síntese do dsRNA para *knockdown* de *ftz-fl*, foi utilizada uma seqüência de 526pb. A especificidade desta seqüência foi verificada por análises por BLASTP contra o Genoma de *A. mellifera*. Os *primers* foram desenhados com a seqüência do promotor T7 (sublinhada abaixo) na extremidade 5’:

dsFTZF1-F: 5’-TAATACGACTCACTATAGGGCGAAGGTGGACTGGGCAAGGA-3’

dsFTZF1-R: 5’-TAATACGACTCACTATAGGGCGATCCATGAGAAGAGTTTGAGTT-3’

Em experimentos de *knockdown* de um gene por esta metodologia, é necessário que se faça o tratamento com um dsRNA diferente em um grupo controle. Neste caso foi escolhido o dsRNA para o gene GFP – proteína verde fluorescente – de plantas (não presente no genoma da abelha) para avaliar os efeitos da injeção do mesmo comparativamente aos efeitos da injeção do dsRNA correspondente a *ftz-fl*. Para a síntese do dsRNA correspondente a GFP, foram utilizados os seguintes *primers* com a seqüência do promotor T7 (sublinhada) na extremidade 5’:

dsGFP-F: 5’-TAATACGACTCACTATAGGGCGAAGTGGAGAGGGTGAAGGTGA-3’

dsGFP-R: 5’-TAATACGACTCACTATAGGGCGAGGTAAAAGGACAGGGCCATC-3’

Os fragmentos definidos foram amplificados por PCR utilizando como molde 2 $\mu$ L de cDNA de pupas Pbd (último estágio pupal) ou de clones contendo o inserto referente ao GFP, adicionados a 2 $\mu$ L de *primer forward*, 2 $\mu$ L de *primer reverse*, 25 $\mu$ L de Master Mix (2X; Promega, Cat. n° M7502) e 20 $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada. A mistura foi submetida à seguinte reação:

94° C por 2min  
94° C por 30seg }  
60° C por 30seg } 40 vezes  
72° C por 40seg }  
72° C por 7min  
4° C por tempo indeterminado

O produto da PCR foi purificado utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Cat. 28706, QIAGEN), e inserido no plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (Promega - Cat. n° A1360) seguindo as instruções do fabricante. Então foi realizada a transformação bacteriana, cultivo em meio líquido, minipreparação e digestão da forma descrita nas seções 3.3.5 e 3.3.6.

O produto da minipreparação foi utilizado como molde para novas amplificações por PCR, seguindo as mesmas quantidades de reagentes e a mesma reação descrita anteriormente, porém em 8 tubos, cujos produtos foram reunidos após a PCR, totalizando 400 $\mu$ L de produto.

Para verificar se o fragmento esperado encontrava-se neste produto, 2 $\mu$ L foram aplicados em gel de agarose 1% corado com EtBr que foi posteriormente fotografado. 260 $\mu$ L do produto restante foram purificados utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Cat. 28706, QIAGEN) e a concentração final foi medida com o aparelho NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 (NanoDrop Technologies). O restante foi armazenado a -20°C para possibilitar a comparação com os produtos obtidos nas etapas subseqüentes.

Foram utilizados 9µg de DNA purificado para a síntese de dsRNA mediante utilização do kit *Ribomax Large Scale RNA Production Systems T7* (Promega), que permite a síntese das cadeias sense e antisense de RNA numa mesma reação. A purificação do dsRNA resultante da reação, foi feita seguindo o procedimento de extração de RNA, segundo protocolo TRIzol® LS (Invitrogen). Os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 30µL de água livre de nucleases. Essa solução foi mantida a 50°C por 5min para a dissolução do *pellet*. Após esse período foi feita a renaturação do RNA, incubando o produto a 98°C por 5min e então a 30min em temperatura ambiente. A concentração da solução final de cada amostra foi obtida em NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies). O produto foi armazenado a -80°C até o momento da utilização.

Os fragmentos de dsRNA foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% onde também se inseriu marcador de peso molecular de 100pb e uma alíquota da PCR que havia sido armazenada para comparação. Após eletroforese, as imagens foram analisadas e documentadas.

### **3.6.2 - Injeção de dsRNA, obtenção e utilização das amostras**

Pupas de operárias no estágio Pw foram coletadas do favo e mantidas em estufa (34°C e 80% de umidade relativa) por 24 horas. Após esse período foram selecionadas pupas Pp com a coloração dos olhos o mais similar possível (para garantir a proximidade de idade entre todos os grupos).

2µL da solução de dsRNA (2µg/µL) foram injetados no abdome das pupas Pp, totalizando 4µg de dsRNA injetados. As injeções foram feitas entre o 5º e 6º segmentos abdominais mediante o uso de uma seringa tipo Hamilton. Um grupo de abelhas controle não foi injetado e outro grupo recebeu a injeção de 2µL de dsRNA (2µg/µL) correspondente ao gene GFP.

Depois de injetadas, as abelhas foram mantidas em placas de Petri forradas com papel filtro em estufa (34°C, 80% de umidade relativa). Depois de 7 dias as abelhas foram coletadas, fotografadas, mergulhadas em TRIzol e congeladas a -80°C para a posterior extração de RNA (segundo protocolo descrito na seção 5.3.1). Foram utilizadas 8 abelhas para cada grupo: grupo controle (sem injeção), grupo tratado com dsRNA correspondente ao gene GFP, e grupo tratado com dsRNA correspondente ao gene *ftz-fl*.

O RNA obtido foi submetido à transcrição reversa (ver seção 3.3.2). O cDNA resultante foi utilizado como molde em reações de PCR em Tempo Real (para avaliar a expressão de *ftz-fl* e de *actina*) e em RT-PCR semiquantitativa (para avaliar a expressão de possíveis genes de expressão controlada por *ftz-fl*). Para a RT-PCR em Tempo Real foi seguida a mesma metodologia da seção 3.4.2 e foram utilizados os seguintes *primers*:

Para *ftz-fl*: FTZF1-F: 5' – TCT TCT CCA GAT TCG AGT CCA – 3'

FTZF1-R: 5' – GAA ATG TTT GGC TGG GAA GA – 3'

Para *β-actina*: Act-F: 5' – TGC CAA CAC TGT CCT TTC TG – 3'

Act-R: 5' – AGA ATT GAC CCA CCA ATC CCA – 3'

Os genes cujas expressões foram analisadas por meio de RT-PCR semiquantitativa com amostras controle e amostras de *knockdown* de *ftz-fl* e os correspondentes *primers* utilizados estão descritos na Tabela 3.

Os reagentes utilizados foram: 0,8μL de *forward primer*(10μM); 1μL de cDNA; 0,8μL de *reverse primer*(10μM); 10μL de Master Mix (2X; Promega, Cat. n° M7502); 7,4μL de água Milli-Q autoclavada. Essa mistura era submetida ao seguinte programa de amplificação:

94°C por 2mim	} X vezes (ver Tabela 3)
94°C por 30seg	
60°C* por 30seg	
72°C por 40seg	
72°C por 7mim	
4°C por tempo indeterminado	

A temperatura de anelamento dos *primers* foi de 60°C para todos, com exceção do correspondente ao gene codificador da esterase do hormônio juvenil, que era de 52°C.

Tabela 3 – Sequências, temperaturas de anelamento dos *primers* e número de ciclos utilizados nas RT-PCRs semiquantitativas para análise de possíveis alterações na expressão gênica em abelhas *knockdown* de *ftz-fl*.

Gene	Sequências	Número de ciclos	Nº de acesso no GenBank
<i>AmelCRP14</i>	F: 5'- CGCCGGCATTACATCAA -3' R: 5'- CGGAGGCTCAGGGTCGGTTCT -3'	32	EF531707
<i>actina (act)</i>	F: 5'- TGCCAACACTGTCCTTTCTG -3' R: 5'- AGAATTGACCCACCAATCCCA -3'	21	AB023025
<i>bursicona α</i>	F: 5'- GCGAAAGAGAGGCCAGTGTA -3' R: 5'- GGCAAATCCAGCAATCTCTT -3'	29	NM_001098234
<i>esterase do hormônio juvenil (jhe)</i>	F: 5'- GCTTTTCAATTAGGTAGTGG -3' R: 5'- GAATGGATTATAATAGAATCG -3'	31	AY647436
<i>hormônio da eclosão (eh)</i>	F: 5'- CCGAAATTGAGATCAATGCA -3' R: 5'- ATGGTTGGATCGAGTCCTCA -3'	30	XM_001122120
<i>profenoloxidase (proPo)</i>	F: 5'- AGATGGCATGCATTTGTTGA -3' R: 5'- TTGCGTTGTTGATTGGTTGT -3'	31	AAO72539
<i>receptor de ecdisona (EcR)</i>	F: 5'- GTGGTGCCCGAATACCAG -3' R: 5'- GTCGTA CTTCCTCGCATT -3'	28	AB267886
<i>ultraspiracle (usp)</i>	F: 5'- AGACTGCCAAGATGATGAAG -3' R: 5'- TCTCTCTTCATTCCCATCGC -3'	29	AY273778
<i>vitelogenina (vg)</i>	F: 5'- GCAGAATACATGGACGGTGT -3' R: 5'- GAACAGTCTTCGGAAGCTTG -3'	35	AJ517411

F: forward, R: reverse

As amplificações foram feitas no GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems. Os produtos de amplificação eram submetidos à eletroforese em géis de agarose (1%, corado com EtBr) depois da adição de tampão corante. As corridas eram feitas ( $100\text{V}/\text{cm}^2$ ) por aproximadamente 1h. Imediatamente depois, os géis eram fotografados.

Este processo foi repetido 3 vezes para todo o conjunto de amostras. A partir das fotos dos géis, era feita uma análise de densitometria das bandas utilizando-se o programa Kodak 1D 3.6 e então era feita uma média dos valores de densitometria de cada amostra. As bandas obtidas a partir da amplificação do cDNA com *primers* para *actina* também eram analisadas e os resultados eram utilizados para a normalização e então elaboração dos gráficos com o programa Microsoft Excel 2003.

As análises estatísticas foram feitas mediante utilização do programa SigmaStat 3.1 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) usando *one way* ANOVA com teste *post hoc* Holm-Sidak.

## *4 – Resultados*

---

#### **4.1 – Seqüência e estrutura de *ftz-fl* de *Apis mellifera***

A anotação do gene *ftz-fl* na plataforma Artemis (versão 7.0) evidenciou que o gene predito como GB16873, de 15.612 pares de bases, possui 6 éxons que somam 2.109 pares de bases. No entanto, algumas diferenças foram encontradas no seqüenciamento realizado em nosso laboratório, inclusive no número final de pares de bases do cDNA, que foi de 2.130 (Figura 1).

A primeira diferença encontrada na seqüência obtida em nosso laboratório foi uma adenina no lugar de uma guanina no primeiro éxon. Além disso, 24 nucleotídeos encontram-se inseridos no segundo éxon e não estão presentes na seqüência predita pelo genoma (Figura 2 – sombreado). Essa região do segundo éxon é correspondente ao primeiro domínio característico da superfamília de receptores nucleares: o domínio A/B. A divisão de FTZ-F1 nos domínios característicos desta superfamília pode ser observada nas figuras 3 e 4.

O domínio N-terminal A/B está relacionado à função de transativação e possui 242 aminoácidos em *A. mellifera* (Figura 3). Analisando os resultados do alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos de FTZ-F1 em diferentes espécies (Figura 5), observa-se que o domínio A/B é o mais variável em comprimento e seqüência. Na seqüência de *A. mellifera* existe, a partir do 39º aminoácido, uma região rica em glicina que não está presente nas outras espécies. Este primeiro domínio como um todo, pode ser considerado rico em glicina, posto que dos 242 aminoácidos, 84 correspondem a este aminoácido.

*Downstream* ao domínio A/B, encontra-se o domínio C. Este domínio, com função de união a DNA (DBD), possui 66 aminoácidos e tem sido descrito como o mais conservado (Aranda & Pascual, 2001; Henrich & Brown, 1995). Dentro do DBD pode-se observar a presença de uma seqüência que confere especificidade de união a DNA, o P-box (ESCKG). Surpreendentemente, uma série de nucleotídeos típicos do domínio DBD se encontra incluída no domínio A/B (seqüência de aminoácidos sombreada na Figura 4).

---

Em seguida ao domínio C encontra-se o domínio D, com função de localização nuclear (Henrich & Brown, 1995), com 207 aminoácidos em *A. mellifera*.

No extremo C-terminal, está localizado o domínio E, com 195 aminoácidos em *A. mellifera*, conhecido como domínio de união a ligante (LBD), apesar de estar associado a uma variedade de funções (Henrich & Brown, 1995) e ser pouco conservado. Neste domínio, na seqüência obtida em nosso laboratório estão ausentes três nucleotídeos presentes na seqüência predita do genoma (Figura 2, sombreado).

Os graus de identidade entre a seqüência de aminoácidos de FTZ-F1 de *A. mellifera* (AmFTZ-F1) e de outras espécies estão relatados na Tabela 4. Observam-se maiores graus de identidade com *Manduca sexta*, *Bombyx mori* e *Drosophila melanogaster*. *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* apresentaram os menores graus de identidade. Como esperado, os graus de identidade entre os DBDs são mais altos do que entre as proteínas completas. Estas informações podem também ser notadas no dendograma feito através do programa MEGA version 4.0 (Tamura et al. 2007) (Figura 6, A e B).

Nas figuras 4 e 5 podem ser observadas regiões conservadas presentes em FTZ-F1. O P-box é uma região conservada entre todos os receptores nucleares. Está presente no primeiro *zinc-finger* do DBD e possui função de união a DNA (Mangelsdorf et al., 1995; Henrich & Brown, 1995). FTZ-F1 box é uma região presente apenas nos FTZ-F1 em seguida ao DBD, e não encontrada em outros receptores nucleares. Assim como o DBD, o FTZ-F1 box deve conferir especificidade de ligação ao DNA (Ueda et al., 1992). AF-2 é outra região conservada entre os receptores nucleares e constitui o local de união de moléculas co-reguladoras cuja ativação depende de união à ligante (Danielian et al., 1992; Durand et al., 1994).

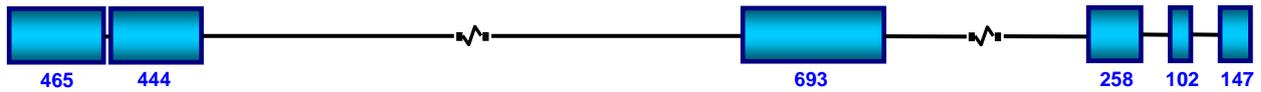


Figura 1: Diagrama esquemático baseado na seqüência predita de *fitz-fl* de *Apis mellifera*. Os retângulos azuis indicam os éxons com os respectivos tamanhos em pares de bases. As linhas representam os íntrons, que possuem 24, 11870, 1351, 127 e 131 pares de bases cada, na ordem da extremidade N para C terminal.

```

Seq_predita      ATGTCTGGTTATCAGTATGGTCTGCTTACGTGCGAATCCTGTAAAGGTTTTTTTCAAACGG
Seq_obtida      ATGTCTGGTTATCAGTATGGTCTGCTTACGTGCGAATCCTGTAAAGGTTTTTTTCAAACGG
*****

Seq_predita      AATAATTCGCCGTGTAGCAGTAAAAAAGTATATACGTGCCTATTCTCGCCAACGGGAGGT
Seq_obtida      AATAATTCGCCGTGTAGCAGTAAAAAAGTATATACGTGCCTATTCTCGCCAACGGGAGGT
*****

Seq_predita      GGGGGAGGTGGGGGCAGCGCGGAGGTGGTGGTGGCGGAGGTGGCGGTGGTGGAAATGGT
Seq_obtida      GGGGGAGGTGGGGGCAGCGCGGAGGTGGTGGTGGCGGAGGTGGCGGTGGTGGAAATGGT
*****

Seq_predita      AACACGGTAACAACGGTGAACCGGTAGCTGTGGCGGCGGCATCATCGGCACTCGAG
Seq_obtida      AACACGGTAACAACGGTGAACCGGTAGCTGTGGCGGCGGCATCATCGGCACTCGAG
*****

Seq_predita      ATCGGATCTTGCGGCAACAAGAAGGTGTACACGTGTCTGTTCTCGCCAACAGGAGCCGGA
Seq_obtida      ATCGGATCTTGCGGCAACAAGAAGGTGTACACGTGTCTGTTCTCGCCAACAGGAGCCGGA
*****

Seq_predita      AGCGGCACTGGTGGCAGTGGAGGCAGCAATGGCGCGGCAAACGGTGCTGGAGGTGGTGGT
Seq_obtida      AGCGGCACTGGTGGCAGTGGAGGCAGCAATGGCGCGGCAAACGGTGCTGGAGGTGGTGGT
*****

Seq_predita      TGCGGCACATCGACAGCCCTCGAGAGTAGCGGCAGCAATTATACCGGTGGCGGTGGTGGC
Seq_obtida      TGCGGCACATCGACAGCCCTCGAGAGTAGCGGCAGCAATTATACCGGTGGCGGTGGTGGC
*****

Seq_predita      GGTACCGGTGGTGGAGGAGGAACGGGTGGCGGCGGTGGTGC GG GTGC-----
Seq_obtida      GGTACCGGTGGTGGAGGAGGAACGGGTGGCGGCGGTGGTGC CG GTGC CGCTGGCGGTAGT
*****

Seq_predita      -----AGGGAATGCCTCTGCTGGTGGTGGCGGTAGCGGTAGTGGTGC GG CAGC
Seq_obtida      GGGCCCACCGCAGGGAATGCCTCTGCTGGTGGTGGCGGTAGCGGTAGTGGTGC GG CAGC
*****

Seq_predita      GGTGCAAGTGGCGGCGGATCCGCTACGGTAAGCGGCAATGTCGCGATACCAACTACCACC
Seq_obtida      GGTGCAAGTGGCGGCGGATCCGCTACGGTAAGCGGCAATGTCGCGATACCAACTACCACC
*****
    
```

---

Seq_predita	TACTCATTACCAACTGGTACCCTCTGTTCATCCCGGATTGGGTGAGGTCGGGGTTGGTGTG
Seq_obtida	TACTCATTACCAACTGGTACCCTCTGTTCATCCCGGATTGGGTGAGGTCGGGGTTGGTGTG *****
Seq_predita	GTGACCGGCTCGATACCGTGTCCGTCCGAATTCCCCGATACCAAGGACATCATCATAGAA
Seq_obtida	GTGACCGGCTCGATACCGTGTCCGTCCGAATTCCCCGATACCAAGGACATCATCATAGAA *****
Seq_predita	GAACTCTGTCCGGTCTGCGGCGACAAAGTTTCCGGATACCATTACGGGCTACTCACTTGT
Seq_obtida	GAACTCTGTCCGGTCTGCGGCGACAAAGTTTCCGGATACCATTACGGGCTACTCACTTGT *****
Seq_predita	GAATCCTGCAAAGGTTTCTTCAAACGCACCGTCCAAAACAAAAGGTCTACACGTGCGTC
Seq_obtida	GAATCCTGCAAAGGTTTCTTCAAACGCACCGTCCAAAACAAAAGGTCTACACGTGCGTC *****
Seq_predita	GCCGAGAGGTCCTGTACATTGACAAAACGCAAAGAAAGCGGTGTCCCTACTGCCGTTTT
Seq_obtida	GCCGAGAGGTCCTGTACATTGACAAAACGCAAAGAAAGCGGTGTCCCTACTGCCGTTTT *****
Seq_predita	CAGAAGTGCCTCGAAGTCGGCATGAAGCTTGAGGCCGTACGAGCGGATCGGATGAGAGGC
Seq_obtida	CAGAAGTGCCTCGAAGTCGGCATGAAGCTTGAGGCCGTACGAGCGGATCGGATGAGAGGC *****
Seq_predita	GGTAGGAATAAATTTGGACCTATGTACAAGAGAGACCGAGCGCGGAAGCTACAAATGATG
Seq_obtida	GGTAGGAATAAATTTGGACCTATGTACAAGAGAGACCGAGCGCGGAAGCTACAAATGATG *****
Seq_predita	AGACAACGGCAGCTGGCACTGCAAACGATACGCGGCAGCCTCGGTGACCCATCGAACTAT
Seq_obtida	AGACAACGGCAGCTGGCACTGCAAACGATACGCGGCAGCCTCGGTGACCCATCGAACTAT *****
Seq_predita	CCCTCCGCCGTAACGCCTTTCTTGCATATTTAAACAGGAAATACAAATACCTCAGGTCTCG
Seq_obtida	CCCTCCGCCGTAACGCCTTTCTTGCATATTTAAACAGGAAATACAAATACCTCAGGTCTCG *****
Seq_predita	AGTCTAACCTCTTCTCCAGATTTCGAGTCCATCCCCCGCAGCCGTGGCCGCTGGTTTGGTC
Seq_obtida	AGTCTAACCTCTTCTCCAGATTTCGAGTCCATCCCCCGCAGCCGTGGCCGCTGGTTTGGTC *****
Seq_predita	ACGACACAAGCTGGTAGCGGAGCTGGTCAGCATCAACTGATCGCACCGTCTTCCCAGCCA
Seq_obtida	ACGACACAAGCTGGTAGCGGAGCTGGTCAGCATCAACTGATCGCACCGTCTTCCCAGCCA *****
Seq_predita	AACATTTCTGCTGGTAATCACCTGCACAATCTCAACCTGGCCTGGATAGTAAGCTCTGG
Seq_obtida	AACATTTCTGCTGGTAATCACCTGCACAATCTCAACCTGGCCTGGATAGTAAGCTCTGG *****
Seq_predita	GCTGCCAATTCCACCACCCCGAGTCCGAAGGCCTTCAACTTCGGCGAACAGTCCACACAA
Seq_obtida	GCTGCCAATTCCACCACCCCGAGTCCGAAGGCCTTCAACTTCGGCGAACAGTCCACACAA *****
Seq_predita	TCTCATGGAGCCACTGGCTCCGCACCCTCTACCGCCACGTTGAAAAGTACTGCGATGATA
Seq_obtida	TCTCATGGAGCCACTGGCTCCGCACCCTCTACCGCCACGTTGAAAAGTACTGCGATGATA *****
Seq_predita	AGAGACTTTGTGCAAACAGTGCAGGATCGCGAGTGGCAGGCATCGCTTTTTGGATTATTA
Seq_obtida	AGAGACTTTGTGCAAACAGTGCAGGATCGCGAGTGGCAGGCATCGCTTTTTGGATTATTA *****
Seq_predita	CAAAATCAAACGTACAATCAGTGTGAAGTGGACTTGTTCGAATTAATGTGCAAAGTGCTC
Seq_obtida	CAAAATCAAACGTACAATCAGTGTGAAGTGGACTTGTTCGAATTAATGTGCAAAGTGCTC

```

*****
Seq_predita   GATCAAATTTGTTCTCTCAGGTGGACTGGGCAAGGAATCTGTATTCTTCAAGGATCTC
Seq_obtida    GATCAAATTTGTTCTCTCAGGTGGACTGGGCAAGGAATCTGTATTCTTCAAGGATCTC
*****

Seq_predita   AAGGTTGTTGATGACCAAATGAAGTTGCTACAGCACTCCTGGTCAGATATGTTGGTGCTC
Seq_obtida    AAGGTT---GATGACCAAATGAAGTTGCTACAGCACTCCTGGTCAGATATGTTGGTGCTC
*****

Seq_predita   GATCATCTTCATCAAAGGTTACACAATAATTTACCTGATGAGACTACGCTTCATAATGGT
Seq_obtida    GATCATCTTCATCAAAGGTTACACAATAATTTACCTGATGAGACTACGCTTCATAATGGT
*****

Seq_predita   CAAAAGTTTGATCTCCTTTGTCTCGGCCTACTCGGGGTTCTTCTTTGGCAGATCTTTTC
Seq_obtida    CAAAAGTTTGATCTCCTTTGTCTCGGCCTACTCGGGGTTCTTCTTTGGCAGATCTTTTC
*****

Seq_predita   AATGATTTATCGTCCAAACTTCAGGAACTCAAATTCGATCTTTCGGATTATATATGCATG
Seq_obtida    AATGATTTATCGTCCAAACTTCAGGAACTCAAATTCGATCTTTCGGATTATATATGCATG
*****

Seq_predita   AAATTCTTGATGCTGCTCAATCATGAAGTTTCGTGGATTAGTTAACAAGAAACATGTACAA
Seq_obtida    AAATTCTTGATGCTGCTCAATCATGAAGTTTCGTGGATTAGTTAACAAGAAACATGTACAA
*****

Seq_predita   GAAGGTCACGAACAAGTTCAACAAGCTCTTTTGGATTATACTTTGACGTGTTATCCTTCT
Seq_obtida    GAAGGTCACGAACAAGTTCAACAAGCTCTTTTGGATTATACTTTGACGTGTTATCCTTCT
*****

Seq_predita   ATACCGGATAAGTTTAAACAAGCTGCTAGCAGTATTACCAGGAATCCACGTGGTGCGAGC
Seq_obtida    ATACCGGATAAGTTTAAACAAGCTGCTAGCAGTATTACCAGGAATCCACGTGGTGCGAGC
*****

Seq_predita   AGGGGAGAAGATCATCTTTATCAAAAACATTGTAGCGGTGGAGCACCAACTCAAACCTTT
Seq_obtida    AGGGGAGAAGATCATCTTTATCAAAAACATTGTAGCGGTGGAGCACCAACTCAAACCTTT
*****

Seq_predita   CTCATGGAAATGCTTCATGCTAAAAGAAAATGA
Seq_obtida    CTCATGGAAATGCTTCATGCTAAAAGAAAATGA
*****

```

Figura 2: Alinhamento da seqüência de nucleotídeos do fragmento de *ftz-f1* de *Apis mellifera* obtida com a seqüência predita disponível no banco de dados Official Gene Set (<http://zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab>). Sombreado: diferença encontrada entre as seqüências. . “ \* ”: indica posições nas quais há nucleotídeos iguais.



Figura 3: Representação esquemática da distribuição dos aminoácidos em cada domínio da proteína FTZ-F1 de *Apis mellifera*.

1 - ATGTCTGGTTATCAGTATGGTCTGCTTACGTGCGAATCCTGTAAAGGTTTTTTCAAACGG - 60  
 1 - M S G Y Q Y G L L T C E S C K G F F K R - 20

61 - AATAATTCGCCGTGTAGCAGTAAAAAGTATATACGTGCCTATTCTCGCCAACGGGAGGT - 120  
 21 - N N S P C S S K K V Y T C L F S P T G G - 40

121 - GGGGAGGTGGGGCAGCGGCGGAGGTGGTGGTGGCGGAGGTGGCGGTGGTGGAAATGGT - 180  
 41 - G G G G G S G G G G G G G G G G G N G - 60

181 - AACAAACGGTAACAACGGTGAACCGGTAGCTGTGGCGGCGGCGCATCATCGGCACTCGAG - 240  
 61 - N N G N N G G T G S C G G G A S S A L E - 80

241 - ATCGGATCTTGCGGCAACAAGAAGGTGTACACGTGTCTGTTCTCGCCAACAGGAGCCGGA - 300  
 81 - I G S C G N K K V Y T C L F S P T G A G - 100

301 - AGCGGCACTGGTGGCAGTGGAGGCAGCAATGGCGCGGCAAACGGTGTGGAGGTGGTGGT - 360  
 101 - S G T G G S G G S N G A A N G A G G G G - 120

361 - TCGGCGACATCGACAGCCCTCGAGAGTAGCGGCAGCAATTATACCGGTGGCGGTGGTGCC - 420  
 121 - C G T S T A L E S S G S N Y T G G G G A - 140

421 - GGTACCGGTGGTGGAGGAGGAACGGGTGGCGGCGGTGGTACGGGTGCCGCTGGCGGTAGT - 480  
 141 - G T G G G G G T G G G G G T G A A G G S - 160

481 - GGGCCCACCGCAGGGAATGCCTCTGCTGGTGGTGGCGGTAGCGGTAGTGGTGGCGCCAGC - 540  
 161 - G P T A G N A S A G G G G S G S G A A S - 180

541 - GGTGCAAGTGGCGGCGGATCCGCTACGGTAAGCGGCAATGTCGCGATACCAACTACCACC - 600  
 181 - G A S G G G S A T V S G N V A I P T T T - 200

601 - TACTCATTACCAACTGGTACCCTCTGTATCCCGATTGGGTCAGGTCGGGGTTGGTGTGTC - 660  
 201 - Y S L P T G T L C H P G L G Q V G V G V - 220

661 - GTGACCGGCTCGATACCGTGTCCGTCCGAATTCCCGGATAACCAAGGACATCATATAGAA - 720  
 221 - V T G S I P C P S E F P D T K D I I I E - 240

721 - GAACTCTGTCCGGTCTGCGGCGACAAAGTTTCCGGATAACCATACGGGCTACTCACTTGT - 780  
 241 - E L C P V C G D K V S G Y H Y G L L T C - 260

781 - GAATCCTGCAAAGGTTTTCTTCAAACGCACCGTCCAAAACAAAAGGTCTACACGTGCGTTC - 840  
 261 - E S C K G F F K R T V Q N K K V Y T C V - 280

841 - GCCGAGAGGTCCTGTACATTGACAAAACGCAAAGAAAGCGGTGTCCCTACTGCCGTTTTT - 900  
 281 - A E R S C H I D K T Q R K R C P Y C R F - 300

901 - CAGAAGTGCCTCGAAGTCGGCATGAAGCTTGAGCCGTACGAGCGGATCGGATGAGAGGC - 960  
 301 - Q K C L E V G M K L E A V R A D R M R G - 320

961 - GGTAGGAATAAATTTGGACCTATGTACAAGAGAGACCGAGCGGGAAGCTACAAATGATG - 1020  
 321 - G R N K F G P M Y K R D R A R K L Q M M - 340

1021 - AGACAACGGCAGCTGGCACTGCAAACGATAACGCGGCGGAGCCTCGGTGACCCATCGAACTAT - 1080  
 341 - R Q R Q L A L Q T I R G S L G D P S N Y - 360

1081 - CCCTCCGCCGTAACGCCTTTCTGCATATTAACAGGAAATACAAATACCTCAGGTCTCG - 1140  
 361 - P S A V T P F L H I K Q E I Q I P Q V S - 380

1141 - AGTCTAACCTCTTCTCCAGATTTCGAGTCCATCCCCCGAGCCGTGGCCGCTGGTTTTGGTC - 1200  
 381 - S L T S S P D S S P S P A A V A A G L V - 400

1201 - ACGACACAAGCTGGTAGCGGAGCTGGTCAGCATCAACTGATCGCACCGTCTTCCAGCCA - 1260  
 401 - T T Q A G S G A G Q H Q L I A P S S Q P - 420

1261 - AACATTTCTGCTGGTAATCACCTGCACAATCTCAACCCTGGCCTGGATAGTAAGCTCTGG - 1320  
 421 - N I S A G N H L H N L N P G L D S K L W - 440  
 1321 - GCTGCCAATTCACCACCCGAGTCCGAAGGCCTTCAACTTCGGCGAACAGTCCACACAA - 1380  
 441 - A A N S T T P S P K A F N F G E Q S T Q - 460  
 1381 - TCTCATGGAGCCACTGGCTCCGCACCCTCTACCGCCACGTTGAAAAGTAGTCCGATGATA - 1440  
 461 - S H G A T G S A P S T A T L K T S P M I - 480  
 1441 - AGAGACTTTGTGCAAACAGTTCGACGATCGCGAGTGGCAGGCATCGCTTTTTTGGATTATTA - 1500  
 481 - R D F V Q T V D D R E W Q A S L F G L L - 500  
 1501 - CAAAATCAAACGTACAATCAGTGTGAAGTGGACTTGTTCGAATTAATGTGCAAAGTGCTC - 1560  
 501 - Q N Q T Y N Q C E V D L F E L M C K V L - 520  
 1561 - GATCAAATTTGTTCTCTCAGGTGGACTGGGCAAGGAATTCTGTATTCTTCAAGGATCTC - 1620  
 521 - D Q N L F S Q V D W A R N S V F F K D L - 540  
 1621 - AAGTTGATGACCAAATGAAGTTGCTACAGCACTCCTGGTCAGATATGTTGGTGCTCGAT - 1680  
 541 - K V D D Q M K L L Q H S W S D M L V L D - 560  
 1681 - CATCTTCATCAAAGGTTACACAATAATTTACCTGATGAGACTACGCTTCATAATGGTCAA - 1740  
 561 - H L H Q R L H N N L P D E T T L H N G Q - 580  
 1741 - AAGTTTGATCTCCTTTGTCTCGGCCTACTCGGGGTTCTTCTTTGGCAGATCTTTTCAAT - 1800  
 581 - K F D L L C L G L L G V P S L A D L F N - 600  
 1801 - GATTTATCGTCCAAACTTCAGGAAGTCAAATTCGATCTTTTCGGATTATATATGCATGAAA - 1860  
 601 - D L S S K L Q E L K F D L S D Y I C M K - 620  
 1861 - TTCTTGATGCTGCTCAATCATGAAGTTCGTGGATTAGTTAACAAGAAACATGTACAAGAA - 1920  
 621 - F L M L L N H E V R G L V N K K H V Q E - 640  
 1921 - GGTCACGAACAAGTTCAACAAGCTCTTTTGGATTATACTTTGACGTGTTATCCTTCTATA - 1980  
 641 - G H E Q V Q Q A L L D Y T L T C Y P S I - 660  
 1981 - CCGATAAGTTTAACAAGCTGCTAGCAGTATTACCAGGAATCCACGTGGTGGCGAGCAGG - 2040  
 661 - P D K F N K L L A V L P G I H V V A S R - 680  
 2041 - GGAGAAGATCATCTTTATCAAAAACATTGTAGCGGTGGAGCACCAACTCAAACCTTTCTC - 2100  
 681 - G E D H L Y Q K H C S G G A P T Q T L L - 700  
 2101 - ATGGAAATGCTTCATGCTAAAAGAAAATGA - 2130  
 701 - M E M L H A K R K \* - 720

Figura 4: Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos de FTZ-F1 de *Apis mellifera*. Em negrito: DBD – domínio C. Em negrito e sublinhado: P-box. Sublinhado: FTZ-F1 Box. Em itálico: LBD – domínio E/F. Em itálico e sublinhado: AF-2. Sombreado: regiões do DBD repetidas no domínio A/B.

Manduca -----  
 Bombyx -----  
 Apis -----  
 Drosophila MDTFNVPMPLAESSNTNYATEATSNNHHHLQHQHQQQSHSHQQQQQQQLLMPHHHKDQMLAAG  
 Homo -----  
 Rana -----  
 Aedes -----  
 Culex -----  
 Schistosoma -----

Manduca -----  
 Bombyx -----  
 Apis -----  
 Drosophila SSPMLPFYSHLQLQKDATATIGPAAAAAAVEAATTSANADNFSSLQTIDASQLDGGISL  
 Homo -----  
 Rana -----  
 Aedes -----  
 Culex -----  
 Schistosoma -----

Manduca -----  
 Bombyx -----  
 Apis -----  
 Drosophila SGLCDRFFVASPNPHSNSNM TLMGTATAATTTTTNNNNNNNTNNNNNNNVEAKTVRPSNG  
 Homo -----  
 Rana -----  
 Aedes --MTSTESRGNVSVTTINCENDPGFNPASSMSTMIPTPSSGTSSGSSSSSNTPNAS----  
 Culex --MTSTESRGNVSVTTINCENENPASSSSASV GAPLGTGSGGGSSSSSSSSSSSSSSSSSSS  
 Schistosoma -----

Manduca -----  
 Bombyx -----  
 Apis -----  
 Drosophila NSVIIESVTMP SFANILFP THRSANECIDPALLQKNPQNPNGNNS IIVPPVEYHQLKPL  
 Homo -----  
 Rana -----  
 Aedes -----TSTIFGNVGIRITV PKMEESDESDELSNIEKTAKVMREDSRASKGLPRPM  
 Culex TPNPSTGGSGTIFGNVGIRITV PKMEESDESDELSNIEKTAKVSMRDDS RASKGLPRPM  
 Schistosoma -----

Manduca -----  
 Bombyx -----  
 Apis -----MSGYQYGLLLTCESCKGFFKRNNSPCSSKKVYTCLFSP TGGGGGGGSGGGGGGGG  
 Drosophila EVNSSTSVSTSNFLSSTTAQLLDFEVQV GKDDGHI STTTTTGPGSGSASGSGSGSGSGSG  
 Homo -----  
 Rana -----  
 Aedes SWEGELSEPEAMMIDNENSSSGPSGTGTS AKPEPLMVAKKEEPSGPGITEPLALTANHSSS  
 Culex SWEGELSEPEAMMIDNENSS-----TGDMKPEPLIVVAKKEEPSGPGITEPLALTANHSSS  
 Schistosoma -----MLRTSGIGINNNQTVNTSSVNLSS

Manduca -----MTMDQQTNLMSLNMSPFDLSPGPEGSGSGGGPSGASQQYV  
 Bombyx -----MHEDAPKMSIAQSLAASTSQPKGDIVTEIPL  
 Apis GGGNGNNGNNGGTGSCGGGASSALEIGSCGNKKVYTCLFSPTGAGSGTGSGSGSNGAANG  
 Drosophila SIARTIGTATPTTTTSMSTANPTRSSLHSIEELAASSCAPRAASPNSNHTSSASTTPQQ  
 Homo -----  
 Rana -----  
 Aedes SSPLPNRVIKPEVG---LPLINHNVASSYANSIP-----TSSSINAKKLPDVISLKF  
 Culex SSPLPGRAIKPEVG---IPLISHHHNSVASSYANSIPTSSSSSSSINAKKLPDVINLKY  
 Schistosoma ADRSIIILVQQPVAGTSHVHCSTGTIVPGSSSGSGTTLVPLRQLGVSTCGGNGLVSSAGST

Manduca PQGAAYQCPPEQQSF-----GYANLDASYLFPPTGPGGEAGAY  
 Bombyx EFAMSSMETKSIETT-----NVELKITYVDPTTGTGGEPEGAY  
 Apis AGGGGCGTSTALESS-----GSNYTGGGGAGTGGGGGTGGGG  
 Drosophila QQQQQHHMQSGNHSGSNLSSDDESMSEDEFGLAIDDNGGYQDTSSSHQQSGGGGGGGGG  
 Homo -----  
 Rana -----  
 Aedes EHGLAENLPAVHSPLLVRSKTTLLPANPSPDSAIHSVYTHSSPSQSPLTSRHAPYTPSLS  
 Culex EH---DNLPAVHSPLLVRSKTTLLPANPSPDSAIHSVYTHSSPSQSPLTSRHAPYTPSLS  
 Schistosoma RLIGSNIGIELFSNTG-----AVGSRSSQGGGSMGLV

Manduca LPAAGAVCDQTD-----  
 Bombyx LPTAGTVCDQTD-----  
 Apis GTGAAGGSGPTAGNASAGGGGSGGAASGASGGGSATVSGNVAIPTTTYSLPTGTLCHPG  
 Drosophila NLLNGSSGGSSAGGGYMLLPQAASSSGMNGNPNAGHMSSGSVGNSSGAGNGGAGGNSGP  
 Homo -----  
 Rana -----  
 Aedes RNNSDASHSSCYSYSSEFSPTHSPIQGRHNMFTSGS---YNGSPLHHSVLFKPMIDNEQA  
 Culex RNNSDASHSSCYSYSSEFSPTHSPIQGRHMFAPAAGGSYNGSPLHHSVLYKPMIDNEQA  
 Schistosoma TISANAGVSGSSSSGTPQRES-----

Manduca -----KDVIEELCPVCGDKVSGYHYGLLTCECKGFFKRTVQ  
 Bombyx -----KDVIEELCPVCGDKVSGYHYGLLTCECKGFFKRTVQ  
 Apis LGQVGVVVTGSIPCPSEFPDTKDIIIEELCPVCGDKVSGYHYGLLTCECKGFFKRTVQ  
 Drosophila GNPMG---GTSATPGHGGEVIDFKHLFEELCPVCGDKVSGYHYGLLTCECKGFFKRTVQ  
 Homo -----MDYSYDEDLDELCPVCGDKVSGYHYGLLTCECKGFFKRTVQ  
 Rana -----MMGYSYDDLEEMCPVCGDKVSGYHYGLLTCECKGFFKRTVQ  
 Aedes LKLANQDEPVFDSEHLPSPGISRQQLINSPCPCIGDKISGFHYGIFSCESCKGFFKRTVQ  
 Culex LKLAGQEEPIFDSEHLPSPGISRQQLINSPCPCIGDKISGFHYGIFSCESCKGFFKRTVQ  
 Schistosoma -----TWQQYVKQFTKLGPCPCIGDKISGYHYGIFCCECKGFFKRTVQ  
 . \*\*:\*:\*:\*:\*:\*:\*:\*:\*:\*:\*:\*:\*:\*:\*

Manduca NKKVYTCVAERA---CHIDKTQRKRCPFCRFQKCLDVGMKLEAVRADMRGGRNKFGPY  
 Bombyx NKKVYTCVAERA---CHIDKTQRKRCPFCRFQKCLDVGMKLEAVRADMRGGRNKFGPY  
 Apis NKKVYTCVAERS---CHIDKTQRKRCPYCRFQKCLEVGMKLEAVRADMRGGRNKFGPY  
 Drosophila NKKVYTCVAERS---CHIDKTQRKRCPYCRFQKCLEVGMKLEAVRADMRGGRNKFGPY  
 Homo NNKHYTCESQS---CKIDKTQRKRCPFCRFQKCLTVGMRLEAVRADMRGGRNKFGPY  
 Rana NNKRYTCIENQT---CQIDKTQRKRCPYCRFQKCLSVGMKLEAVRADMRGGRNKFGPY  
 Aedes NRKNYQCLRGAA---CPVTIATRKKCPACRFQKCLQKGMKLEAIREDRTRGGRSTYQCSY  
 Culex NRKNYVCLRGAS---CPVTIATRKKCPACRFQKCLQKGMKLEAIREDRTRGGRSTYQCSY  
 Schistosoma NAKRYACHRPNASSRCEINVASRKKCPACRFQKCLQKGMKLEAIREDRTRGGRSMYPGSR  
 \* \* \* \* : \* : : \*:\*:\* \* \* \* : \*:\*:\*:\* \* \* \* \* . :

Manduca KRDRARKLQMMRQRQIAVQTLRGS LG----DGGLV L G F G S P Y A A V P V K Q E I Q I P Q V S S L T  
 Bombyx KRDRARKLQMMRQRQIAVQTLRGS LG----DGGLV L G F G S P Y T A V S V K Q E I Q I P Q V S S L T  
 Apis KRDRARKLQMMRQRQLALQ T I R G S L G----DPSNYP--SAVTPFLHIKQEIQIPQVSSLT  
 Drosophila KRDRARKLQVMRQRQLALQALRNSMGPDIKPTPISPGYQQAYPNMNIKQEIQIPQVSSLT  
 Homo KRDRALKQQKKAQIRANGFKLETGPPMGVPPPPPPAPDYVLP---PSLHGPEPKGLAAGP  
 Rana KRDRALKQQKALIRANGLKLEAMSQVIQAIPTDLTISSAIQNIHSASKGLPLNHTALPP  
 Aedes TLPGTILSPSLGGNDGSSNFPYSNASQRSAGGGPGGPFSSGVPVNLTGHQ L K I E S G Q Q D F  
 Culex TLPGTILSPSLSGEGNFPYSNSHGQR-----GQYPPGISGLVISQQQMKLECCQDI  
 Schistosoma YLRQIAARVSGNRSTSGLAISSSCMEFSTSDLDGNMLGGLTDQSIMSDADQLSCSVVGL

Manduca SSPESSPGPALLGTQPQ-----  
 Bombyx SSPESSPGPALLGAQPQ-----  
 Apis SSPDSSPSPAAVAAGLV-----  
 Drosophila QSPDSSPSP I A I A L G Q V N A S T G G V I A T P M N A G T G G S G G G L N G P S S V G N G N S S N G S S N G N  
 Homo PAGPLGDFGAPALPMAVPG-----  
 Rana TDYDRSPFVTSPISMAMP-----  
 Aedes NSNSNGGNGGPGNNNLG-----  
 Culex NSNSSPGGG-----  
 Schistosoma AAHTLGPDGLPASEDAGG------V

Manduca ---PPQPPPPPAHDKWEAHSP-----HSP--DAFAFDAPT  
 Bombyx ---PPQPPPPPTHDKWEAHSP-----HSASPDAFTFDTSQSN  
 Apis ---TTQAGSGAGQHQLIAPSSQPNISAGNHLHNLNPLGLDSKLWAANSTTPSPKAFNFGEQ  
 Drosophila NNSSTGNSTSGGGGNNAGGGGGTNSNDGLHRNGGNGNSSCHEAGIGSLQNTADSKLCF  
 Homo -AHGPLAGYLYPAFPGRAIKS-----EYPEPYASPPQGLP  
 Rana -HGSLQSYQAYGHFSPRAIKS-----EYPDPYTSSESLMG  
 Aedes -GAGMRQGIPQLLQVGRFDG-----FHRKSKLPW  
 Culex -SNGVRPGVPQLLQVSFFYRP-----AVRKLEADD  
 Schistosoma YLDPGVLGTHDNDEEEIDSGSLRVEPNILECGSGIVGGTNLSTNVSPYSGRQVIIGGSN

Manduca AAATPSSTA EPTSTETLRVSPMIREFVQ T I D D R E W Q N S L F G L L Q S Q T Y N Q C E V D L F E L M C  
 Bombyx TAATPSSTA EATSTETLRVSPMIREFVQ T V D D R E W Q N A L F G L L Q S Q T Y N Q C E V D L F E L M C  
 Apis STQSHGATGSAPSTATLKTSPMIRDFVQ T V D D R E W Q A S L F G L L Q N Q T Y N Q C E V D L F E L M C  
 Drosophila DSGTHPSSTADALIEPLRVSPMIREFVQ S I D D R E W Q T Q L F A L L Q K Q T Y N Q V E V D L F E L M C  
 Homo YGYPEPFSGGP--NVPELILQLLQLEPDEDQVRARILGCLQEP--TKSRPDQPAAFGLLC  
 Rana YSYMSYQSSSPSNIPHLIVELLKCEPDEPQVQSKIMSYLQQEQANRSKHKDLNFTGLMC  
 Aedes MELLQEIMDVEHLWQYNASELARLNQPAPPVSSAAIAANPLLSAGISSSESSPDLIANLC  
 Culex RYRSQEIMDVEHLWQYNAELARLNQPAPPVDRAAIAANPLLSAGISSSESSPDLIANLC  
 Schistosoma ESI PR TREQLPKIIRDILLVEETIEAEPEDALEIDSAVASETAAPEGVSDDEAAVYRALL

Manduca KVLDQNLFSQVDWARNTVFFKYLKVDDQMKLLQHSWSDMLVLDHHLHQRMHNGLPDETTLH  
 Bombyx KVLDQNLFSQVDWARNTVFFKYLKVDDQMKLLQDSWSVMLVLDHHLHQRMHNGLPDETTLH  
 Apis KVLDQNLFSQVDWARNSVFFKDLKVDDQMKLLQHSWSDMLVLDHHLHQRHNNLPDETTLH  
 Drosophila KVLDQNLFSQVDWARNTVFFKDLKVDDQMKLLQHSWSDMLVLDHHLHRIHNGLPDETQLN  
 Homo RMADQTFISIVDWARRCMVFKELEVADQMTLLQNCWSELLVFDHIYRQVQHKGESILLV  
 Rana KMADQTLFSIVEWARSSIFFRELKVDDQMKLLQNCWSELLILDHIFRQVLHKGESILLV  
 Aedes NIADHRLYKIVKWKSLPLFKNISIDDQICLLINSWCELLLFSCCFRSMAT--PGEIKIS  
 Culex NIADHRLYKIVKWKSLPLFKNISIDDQICLLINSWCELLLFSCCFRSMAT--PGEIKIS  
 Schistosoma NLADPRLYRTVRWSRALPDFSLLDTDQILLIQNCWADLLCLDCCWRSLPT--PSEIRLT  
 . : \* : \* \* . : \* : . \*\* : \* : . . \* . : \* : . : : . . :



Tabela 4 - Graus de identidade, em porcentagem, entre FTZ-F1 de *Apis mellifera* e de outras espécies.

Espécie	Identidade da proteína inteira (%)	Identidade do domínio DBD (%)	Nº de acesso no GenBank
<i>Bombyx mori</i>	64	95	NP_001037528
<i>Manduca sexta</i>	60	95	AF288089
<i>Drosophila melanogaster</i>	52	100	NP_524143
<i>Rana rugosa</i>	41	86	AB035499
<i>Homo sapiens</i>	38	86	U76388
<i>Schistosoma mansoni</i>	22	65	AF158103
<i>Culex quinquefasciatus</i>	22	63	EDS41949
<i>Aedes aegypti</i>	21	62	XP_001653014

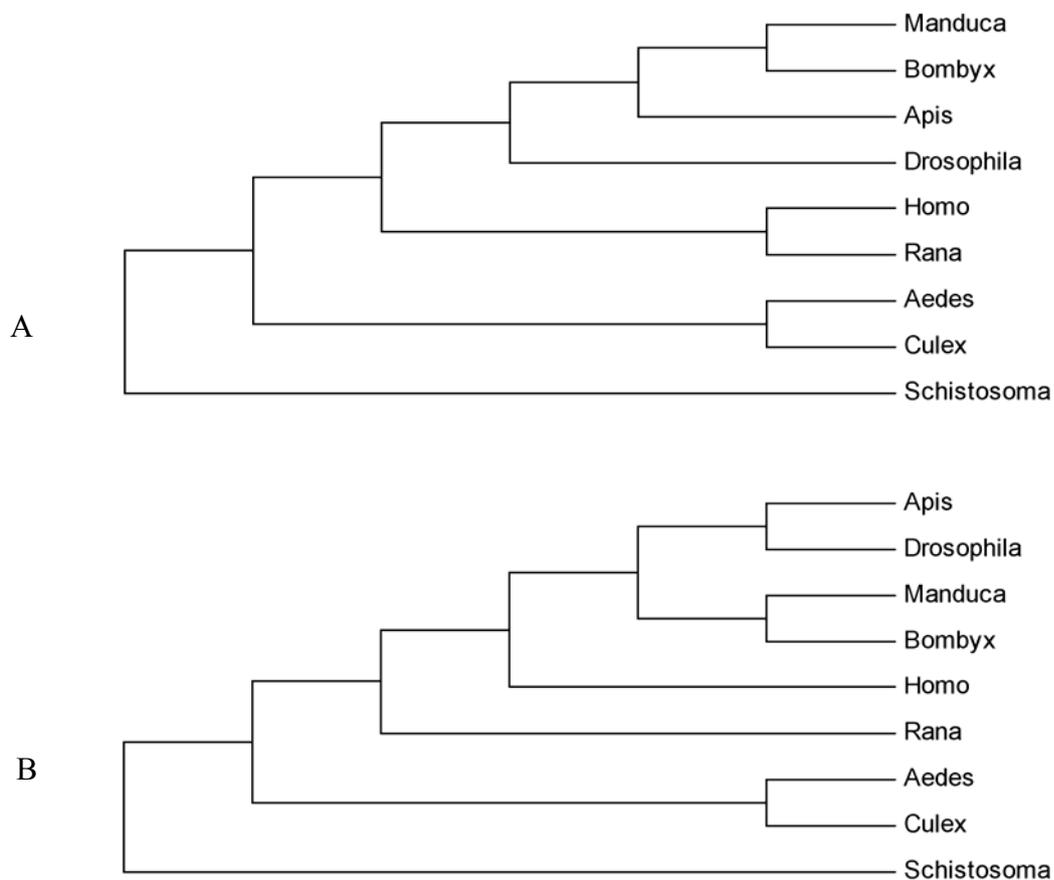


Figura 6: Dendrogramas obtidos por máxima parcimônia utilizando: **A)** Sequências de aminoácidos da proteína FTZ-F1 completa (no caso de espécies com duas isoformas, utilizou-se a isoforma  $\beta$ ). **B)** Sequências de aminoácidos do domínio DBD de FTZ-F1. Análises realizadas utilizando o programa MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007).

#### **4.2 – Perfil de expressão de *ftz-fl* durante o desenvolvimento de rainhas e operárias**

Os perfis de expressão de *ftz-fl* no corpo todo durante o desenvolvimento de operárias (Figura 7) e rainhas (Figura 8) obtidos através de RT-PCR são similares. Em ambos os casos (Figura 9) ocorrem três importantes picos de expressão do gene estudado: em S3, em PP3 e em Pbd. No início da fase pupal, os níveis de expressão de *ftz-fl* encontrados foram baixos, aumentando nos últimos estágios, atingindo valores máximos em Pbd (final do período pupal) e então decaindo em adultas faratas. Em operárias foi observado um pico em F1 que não ocorre em rainhas.

Os experimentos de Real-Time PCR utilizando cDNA de corpo gorduroso (órgão responsável pela síntese de Vg) confirmaram a existência de um pico de expressão de *ftz-fl* em Pbd, e mostraram que o mesmo é quase 10 vezes maior em rainhas do que em operárias (Figura 10).

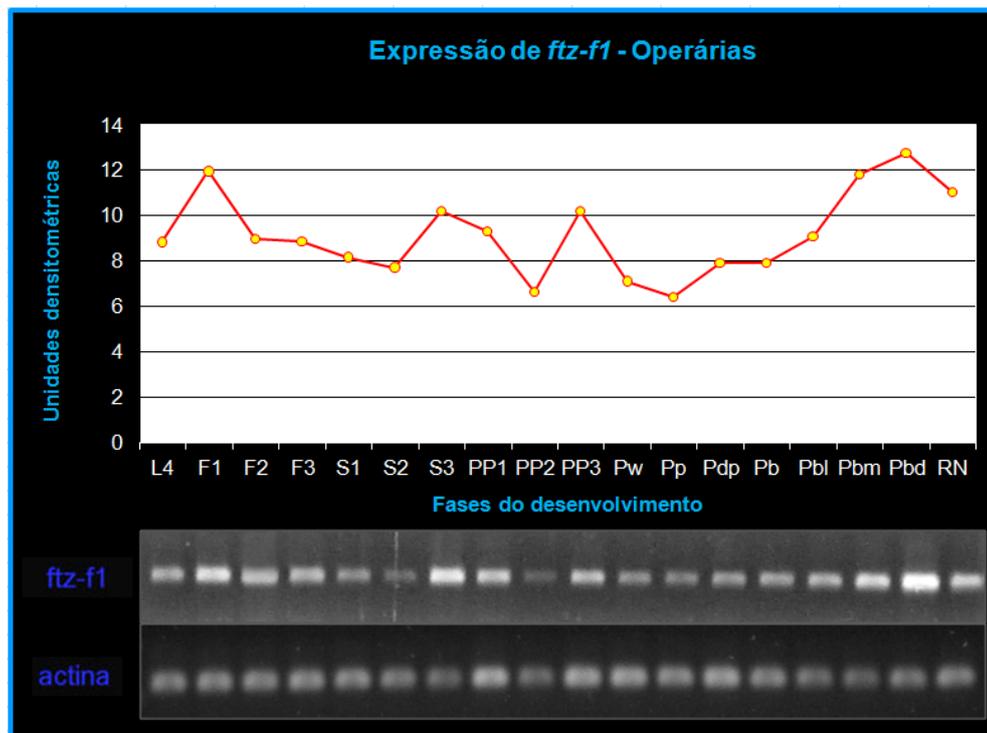


Figura 7: Perfil de expressão do mRNA de *ftz-f1* no corpo inteiro de larvas e pupas de operárias de *Apis mellifera*. L4: quarto estágio larval. F1-PP3: divisões do quinto estágio larval. Pw: pupa de olho branco. Pp: pupa de olho rosa. Pdp: Pupa de olho rosa escuro. Pb: Pupa de olho marrom com corpo não pigmentado. Pbm: Pupa de olho marrom com corpo levemente pigmentado. Pbd: Pupa de olho marrom com corpo pigmentado. RN: adulta recém-nascida. Acima, representação gráfica dos valores densitométricos correspondentes às bandas de *ftz-f1*. Embaixo, RT-PCR: bandas em gel de agarose corado com brometo de etídio correspondentes ao produto de amplificação do cDNA de *ftz-f1* e de  $\beta$ -actina (utilizado como controle).

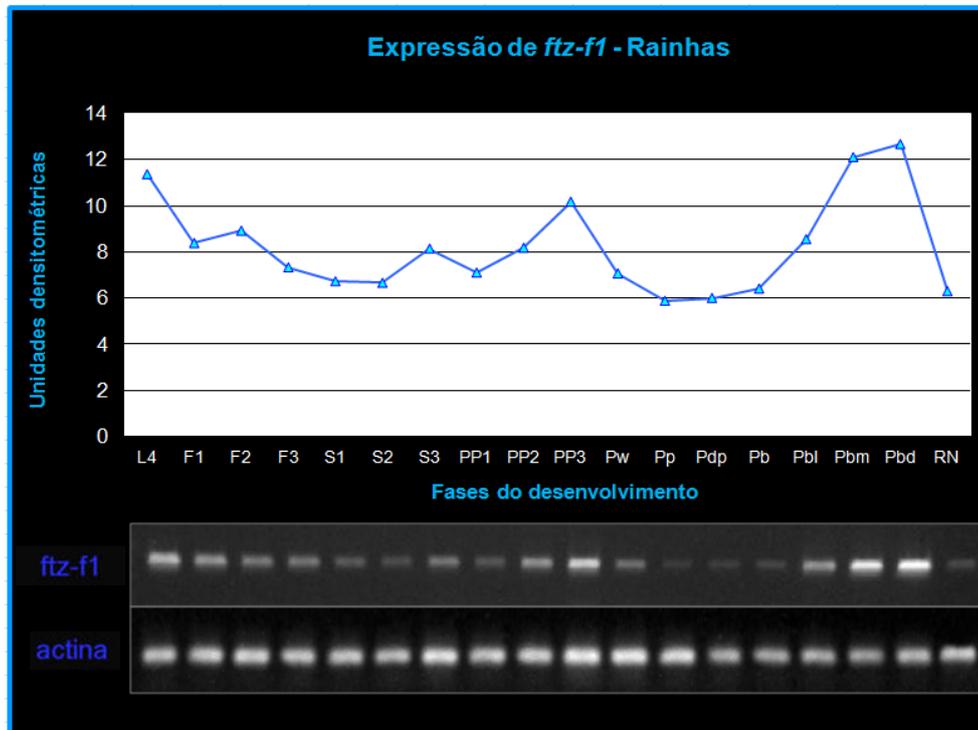


Figura 8: Perfil de expressão do mRNA de *ftz-f1* no corpo inteiro de larvas e pupas de rainhas de *Apis mellifera*. L4: quarto estágio larval. F1-PP3: divisões do quinto estágio larval. Pw: pupa de olho branco. Pp: pupa de olho rosa. Pdp: Pupa de olho rosa escuro. Pb: Pupa de olho marrom com corpo não pigmentado. Pbm: Pupa de olho marrom com corpo levemente pigmentado. Pbd: Pupa de olho marrom com corpo pigmentado. RN: adulta recém-nascida. Acima, representação gráfica dos valores densitométricos correspondentes às bandas de *ftz-f1*. Embaixo, RT-PCR: bandas em gel de agarose corado com brometo de etídio correspondentes ao produto de amplificação do cDNA de *ftz-f1*. C) RT-PCR: bandas correspondentes ao produto de amplificação do cDNA de  $\beta$ -actina (utilizado como controle).

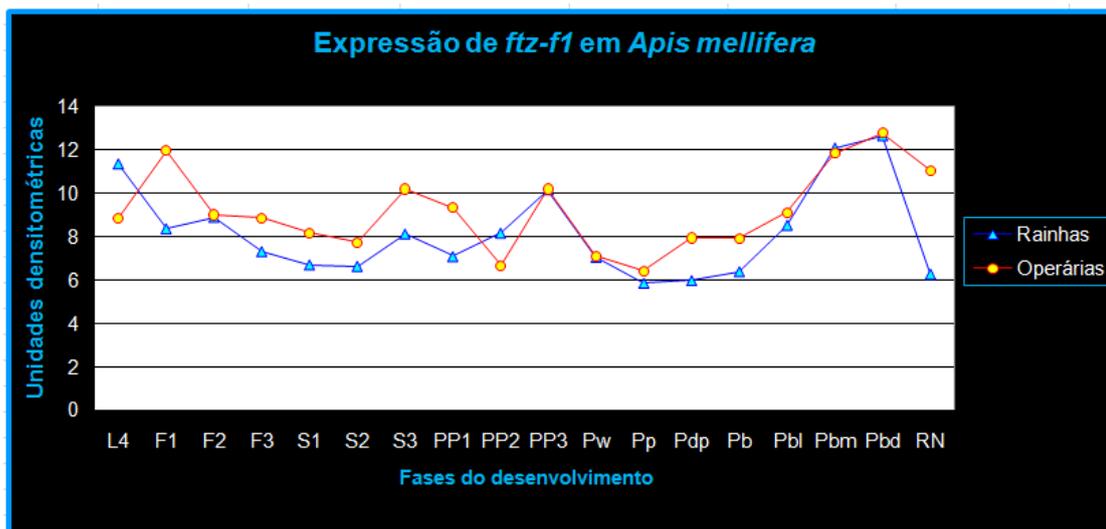


Figura 9: Perfil de expressão do mRNA de *ftz-f1* no corpo inteiro de larvas e pupas de rainhas e operárias de *Apis mellifera*. L4: quarto estágio larval. F1-PP3: divisões do quinto estágio larval. Pw: pupa de olho branco. Pp: pupa de olho rosa. Pdp: Pupa de olho rosa escuro. Pb: Pupa de olho marrom com corpo não pigmentado. Pbm: Pupa de olho marrom com corpo levemente pigmentado. Pbd: Pupa de olho marrom com corpo pigmentado. RN: adulta recém-nascida.

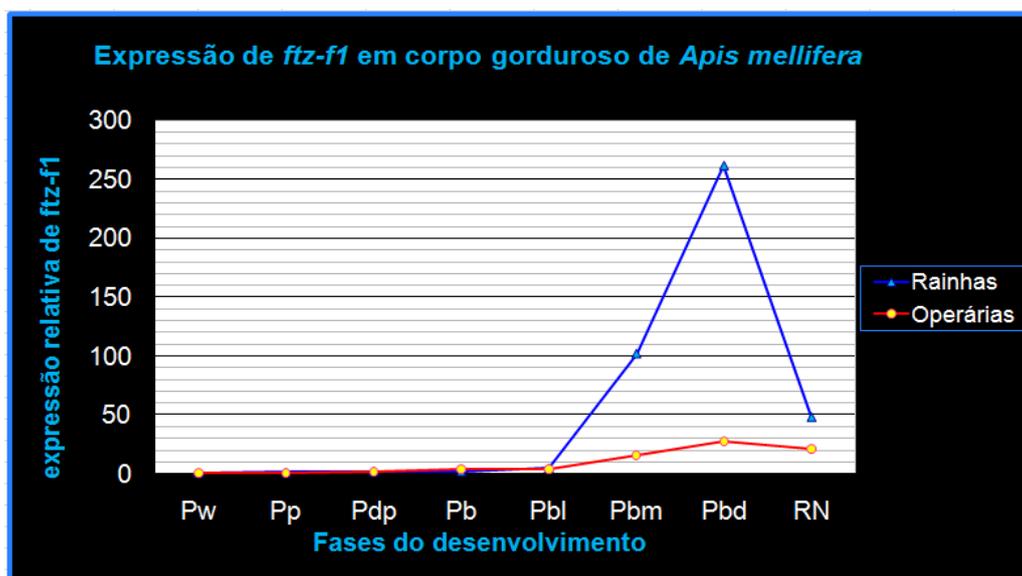


Figura 10: Perfil de expressão do mRNA de *ftz-f1* no corpo gorduroso de pupas de rainhas e operárias de *Apis mellifera* obtido por Real-Time PCR. Pw: pupa de olho branco. Pp: pupa de olho rosa. Pdp: Pupa de olho rosa escuro. Pb: Pupa de olho marrom com corpo não pigmentado. Pbm: Pupa de olho marrom com corpo levemente pigmentado. Pbd: Pupa de olho marrom com corpo pigmentado. RN: adulta recém-nascida.

---

### **4.3 – Efeitos da ecdisona na expressão de *ftz-fl***

A injeção de 20E em pupas de operárias Pb provocou a queda de expressão de *ftz-fl*, chegando a inibi-la totalmente após 12 horas do tratamento (Figura 11, A).

O efeito negativo deste hormônio na transcrição do gene *ftz-fl* foi comprovada por meio da incubação de tegumentos torácicos de pupas Pw *in vitro* na presença de 20E (Figura 11, B). A dose de 0,001 $\mu$ g de 20E (por mL de meio de cultura) provocou uma diminuição nos níveis dos transcritos tanto em relação ao controle sem intervenção quanto em relação ao tegumento tratado com etanol (solvente de 20E). 1 $\mu$ g do hormônio foi capaz de inibir totalmente a expressão de *ftz-fl* já após 1h de incubação do tegumento. As lavagens dos tegumentos por 15h ou 24h não alteraram os efeitos causados pelo tratamento com 20E.

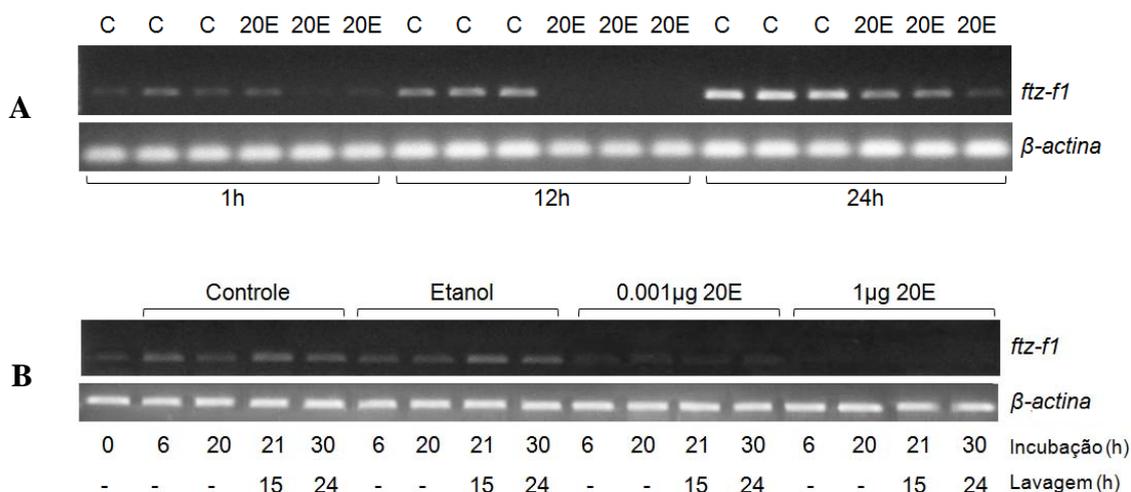


Figura 11. : Efeitos de 20E nos níveis de transcritos de *ftz-fl*. **A)** 5µg de 20E foram injetados em pupas de operárias Pb e os níveis de transcritos de *ftz-fl* foram analisados após 1h, 12h e 24h. Um grupo controle (C) foi injetado com etanol/Ringer. Análises por RT-PCR seguidas de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. O gene codificador de actina foi utilizado como normalizador. **B)** Níveis de transcritos *ftz-fl* em tegumentos torácicos de pupas Pw expostos *in vitro* durante 6h ou 20h a 0,001 ou 1µg de 20E por mL de meio de cultura. Alguns tegumentos incubados durante 6h em presença de 20E foram subsequentemente lavados em meio desprovido de 20E por 15h ou 24h, totalizando 21h e 30h de incubação, respectivamente. Amostras de tegumentos foram também analisadas no tempo 0 (0h), isto é, em seguida à dissecação (tegumentos não incubados). Nas incubações controle, foi utilizado etanol. Análises por RT-PCR seguidas de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. O gene codificador de actina foi utilizado como normalizador.

#### **4.4 – Efeitos do knockdown de *ftz-fl* no período pupal**

Com a injeção de 4µg de dsRNA correspondente ao gene *ftz-fl* obtivemos sucesso em reduzir a quantidade de seu transcrito após 7 dias da data da injeção (Figura 12). O grupo de pupas tratadas com 4µg dsGFP não apresentou diferenças significativas nos níveis de transcritos de *ftz-fl* em comparação ao grupo que não recebeu nenhuma injeção, comprovando que os efeitos observados são específicos e devidos à redução da quantidade de mRNA de *ftz-fl*.

---

Observando os fenótipos das pupas no 7º dia após a injeção, é possível notar um atraso no desenvolvimento causado pela injeção de dsFTZ-F1 (Figura 13). As abelhas que não receberam nenhuma injeção encontravam-se entre os estágios de Pbm e recém emergidas. O grupo tratado com dsGFP sofreu um leve atraso, e encontrava-se entre Pbl e recém emergida. Já as pupas tratadas com dsFTZ-F1 encontravam-se todas no estágio de Pbl. Detalhes dos números de abelhas em cada estágio pupal podem ser observados na Tabela 5.

Três pupas tratadas com dsGFP e três tratadas com dsFTZ-F1 foram mantidas em estufa com umidade e temperatura controladas até o 9º dia depois da injeção. O tratamento com dsGFP não impediu a emergência das abelhas, porém causou alterações como asas retorcidas e dificuldades de movimentação. Nenhuma das três abelhas tratadas com dsFTZ-F1 chegou a emergir, morrendo poucas horas antes do previsto para a emergência.

A expressão de vários genes foi testada após este experimento. Na figura 14 é possível observar que os níveis de transcritos de *vg* tiveram uma diminuição significativa nas abelhas *knockdown* de *ftz-fl* e o oposto ocorreu com os níveis de transcritos de *amelCRP14*, que codifica uma proteína cuticular. *Profenoloxidase (proPo)* teve os níveis de transcritos significativamente aumentados tanto no grupo tratado com dsGFP quanto no grupo tratado com dsFTZ-F1. Os genes correspondentes à esterase do hormônio juvenil (*jhe*), hormônio da eclosão (*eh*), bursicona  $\alpha$ , ultraspiracle (*usp*), receptor de ecdisona (*EcR*) e actina (*act*) não sofreram mudanças significativas em suas expressões.

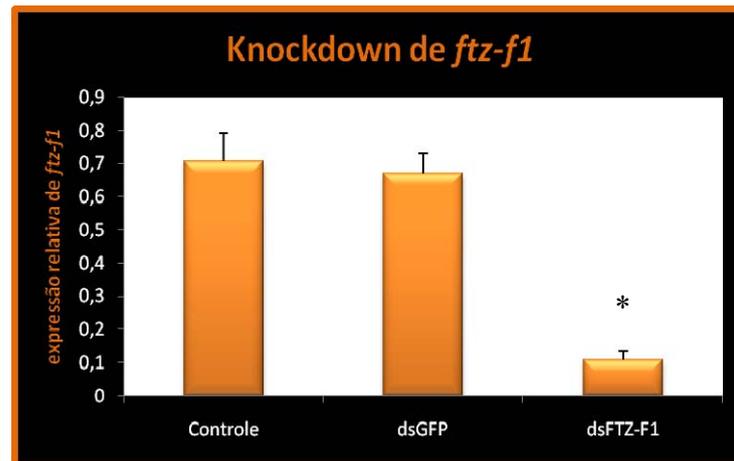


Figura 12: Níveis de transcritos no 7º dia após a injeção de dsFTZ-F1. Foram comparados grupos não submetidos a qualquer intervenção (Controle), injetados com dsGFP e injetados com dsFTZ-F1. Cada grupo é composto por n=8. Análise por RT-PCR quantitativa. O gene codificador de actina foi utilizado como normalizador. \*: indica diferença significativa entre os grupos (One way ANOVA com comparações *post-hoc* utilizando-se Holm-Sidak *multiple comparison test*).



Figura 13: Efeito sobre o desenvolvimento, documentado 7 dias após a injeção de dsFTZ-F1, com evidente alteração no fenótipo de pupas de *Apis mellifera*. A) Grupo controle: sem injeção. B) Grupo tratado com 4µg de dsGFP. C) Grupo tratado com 4µg de dsFTZ-F1.

Tabela 5: Número de abelhas em cada estágio pupal, 7 dias após a injeção de dsRNA para *knockdown* de *ftz-fl*.

Estágio pupal no 7º dia após a injeção	Número de abelhas		
	Controle sem injeção	Tratadas com dsGFP	Tratadas com dsFTZ-F1
Pbl	-	2	8
Pbm	1	3	-
Pbd	5	2	-
Recém nascida	2	1	-
Total	8	8	8

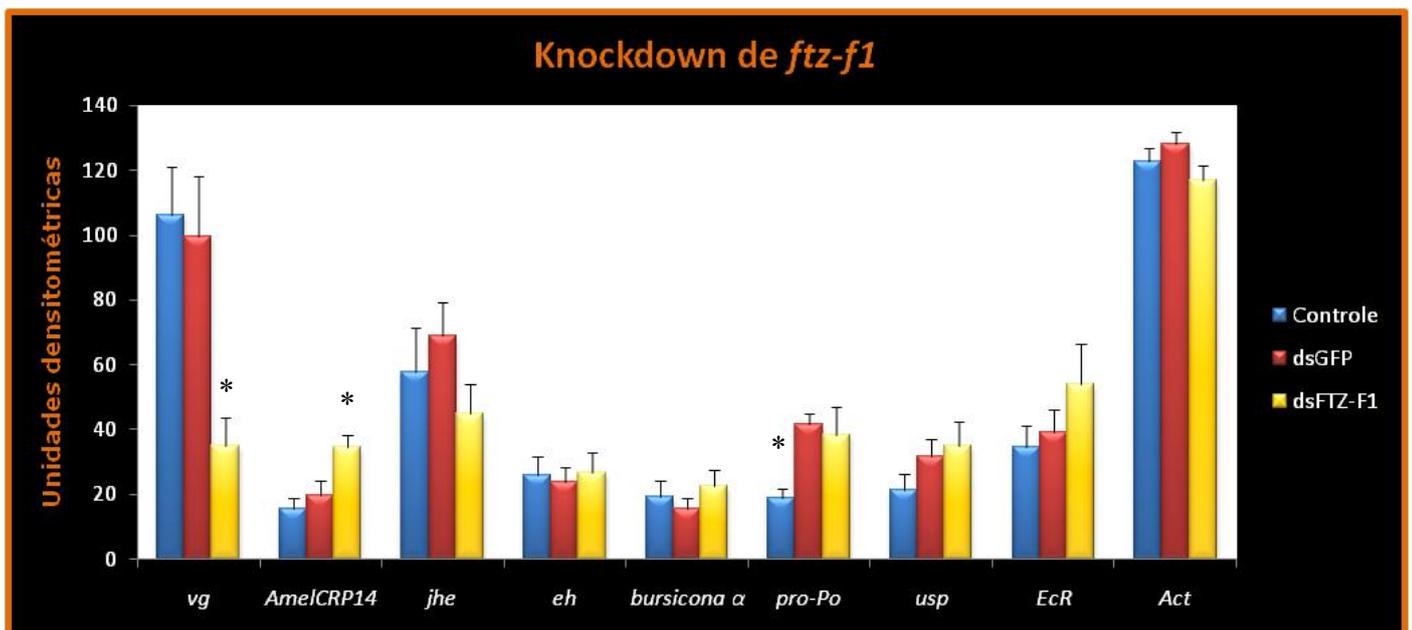


Figura 14: Efeitos do *knockdown* de *ftz-fl* na expressão gênica em pupas de *Apis mellifera*. Foram comparados grupos não submetidos a qualquer intervenção (Controle), injetados com dsGFP e injetados com dsFTZ-F1. Cada grupo é composto por n=8. Análise por RT-PCR semiquantitativa. O eixo das ordenadas representa unidades densitométricas obtidas de fotografias de géis de agarose corados com brometo de etídio. Cada valor é uma média de pelo menos dois experimentos separados. \*: indica diferença significativa entre os grupos (*One way ANOVA* com comparações *post-hoc* utilizando-se *Holm-Sidak multiple comparison test*).

## *5 – Discussão*

---

### **5.1 – Sobre a seqüência de *ftz-f1***

O fator de transcrição FTZ-F1 de *A. mellifera* apresenta os domínios comuns às proteínas da superfamília dos receptores nucleares: A/B, C (DBD), D e E/F (LBD) (Figuras 3 e 4). No entanto, a seqüência de *ftz-f1* mostrou-se pouco conservada entre as diferentes espécies analisadas (Tabela 4; Figura 5).

A inserção de regiões do domínio C dentro do domínio A/B encontrada em AmFTZ-F1 não é observada em outros membros da superfamília dos receptores nucleares. Wu et al. (2007) encontraram 9 receptores nucleares com dois DBDs – 3 em *Schistosoma mansoni* (platelminto), 3 em *Schmidtea mediterranea* (platelminto), 2 em *Lottia gigantea* (molusco) e 1 em *Daphnia pulex* (crustáceo) – que devem atuar como homodímeros intramoleculares. Porém, nestes receptores, os DBDs encontram-se em *tandem* e possuem o primeiro P-box com a seqüência de aminoácidos CEACKK, diferentemente do que ocorre em AmFTZ-F1. A inserção encontrada nestas abelhas inicia-se logo após a primeira metionina. Os domínios A/B e C têm funções distintas, sendo o primeiro importante para a ligação de co-ativadores ou co-repressores que determinarão a atividade do receptor, e o domínio C tem características específicas (como os *zinc fingers*) que permitem a ligação ao DNA (Aranda & Pascual, 2001). Não é possível prever os efeitos desta repetição de parte do domínio C dentro do domínio A/B na atividade do fator de transcrição. A proteína ortóloga a FTZ-F1 em vertebrados, SF-1, não possui domínio A/B (Parker & Schimmer, 1997), por exemplo, como pode ser observado na figura 5, e mesmo desta forma é funcional e importante no desenvolvimento embrionário do sistema reprodutivo.

Outra característica do domínio A/B de *A. mellifera* que não se encontra presente em outras espécies é uma região altamente rica em glicinas, a partir do 39º aminoácido (Figura 4). O domínio como um todo é 34,7% composto por glicinas. Apesar de não haver registros dessa ocorrência em outros FTZ-F1, outro receptor nuclear, EcR, apresenta repetições de glicinas no domínio A/B em insetos como *A. mellifera* (GenBank AB095514), *Pheidole megacephala*

---

(GenBank AB194765) e *Lucilia cuprina* (GenBank AAB81130). A função dessas regiões é desconhecida até o momento.

Curiosamente, os graus de identidade entre AmFTZ-F1, e FTZ-F1 de *A. aegypti* e de *C. quinquefasciatus* foram muito baixos, menores inclusive do que quando comparadas as identidades de AmFTZ-F1 e as respectivas seqüências de vertebrados ou *S. mansoni* (Tabela 4). A isoforma  $\beta$  de FTZ-F1 de *D. melanogaster*, também pertencente à ordem Diptera como os mosquitos mencionados, aproxima-se mais de *A. mellifera*, da ordem Hymenoptera. Este fato sugere que este fator de transcrição possui uma atividade diferenciada dentro da família Culicidae.

A comparação das seqüências de aminoácidos de FTZ-F1 mostrou que as regiões mais conservadas são o DBD e os 29 aminoácidos adjacentes a este, conhecidos como FTZ-F1 box (Ueda et al., 1992) (Figura 5 e Tabela 4). Vários estudos demonstraram que os membros da família FTZ-F1 se unem como monômeros ao elemento de resposta consenso 5'-PyCAAGGPyCPu-3'. O P-box reconheceria a região 5'-AGGPyCPu-3' e o FTZ-F1 box seria responsável pela união às três primeiras bases 5'-PyCA-3' (Ueda & Hirose, 1991; Ueda et al., 1992). Tanto o P-box como o FTZ-F1 box apresentam um alto grau de conservação, o que sugere que reconheceriam elementos de resposta no DNA similares nas diferentes espécies. É importante ressaltar a identidade de 100% entre o domínio C de *A. mellifera* e *D. melanogaster*, pois, sendo conhecida a seqüência de ligação de  $\beta$ FTZ-F1 ao DNA de *D. melanogaster*, é possível, em um trabalho futuro, localizar no genoma de *A. mellifera* quais genes possuem tal seqüência em sua região promotora, sendo candidatos a terem sua expressão regulada por este fator de transcrição.

Assim como outras proteínas da superfamília dos receptores nucleares, FTZ-F1 interage com outras proteínas através da região AF-2 do LBD. Em *D. melanogaster*, por exemplo, foi caracterizada a interação deste domínio de FTZ-F1 com o domínio LXXL da proteína FTZ (Yu et al., 1997; Guichet et al., 1997; Schwartz et al., 2001; Suzuki et al., 2001) e com o co-repressor

Bonus (Beckstead et al., 2001). Da mesma forma, em experimentos *in vitro*, foi demonstrado que SF-1 interage com proteínas da família SRC e CBP/p300 mediante o domínio AF-2 (Ito et al., 1998; Monte et al., 1998; Borud et al., 2002).

Estudando FTZ-F1 de *Blattella germanica* (ordem: Dytioptera), Rodriguez (2005) observou que este inseto apresenta um AF-2 idêntico ao de *D. melanogaster* (Lavorgna et al., 1993), *Bombix mori* (Sun et al., 1994), *M. sexta* (Weller et al., 2001) e *A. aegypti* (Li et al., 2000), e só difere em um resíduo em relação ao AF-2 presente em SF-1 de *Homo sapiens* (Wong et al., 1996; Oba et al., 1996), sugerindo que a interação deste domínio com co-fatores, assim como sua função biológica, foi conservada entre uma espécie menos derivada, como é *B. germanica*, e insetos mais derivados, como dípteros e lepidópteros, inclusive em vertebrados. AF-2 de AmFTZ-F1 também é idêntico ao dos insetos mencionados.

Alguns estudos já foram feitos sobre o AF-2 de FTZ-F1 de *D. melanogaster*. A ligação de FTZ ao  $\alpha$ FTZ-F1, nos estágios iniciais do embrião, importante para a formação dos parasegmentos pares, parece ocorrer através de um motivo LXXLL de FTZ e do AF-2 do  $\alpha$ FTZ-F1. A ligação de uma proteína ao AF-2 de um receptor é, normalmente, dependente de ligante (Danielian et al., 1992; Durand et al., 1994). Porém, neste caso, a interação *in vitro* entre FTZ e FTZ-F1 de *D. melanogaster* foi observada sem a adição de ligante (Suzuki et al., 2001). Os autores sugerem que esta seria uma forma primitiva de regulação por receptores nucleares que haveria surgido antes da aquisição da habilidade de se unir aos ligantes, baseando-se na proposta de Escriva et al. (2000) de que os primeiros receptores não possuiriam ligantes.

## **5.2 – Sobre os perfis de expressão de *ftz-fl* e os efeitos da ecdisona**

Os perfis de expressão de *ftz-fl* encontrados em rainhas e operárias de *A. mellifera* foram similares, sendo que os picos em S3 e em PP3 ocorrem em momentos em que os títulos de

---

ecdisteróides circulantes são baixos e estão prestes a se elevarem nas fases seguintes (Rachinsky, 1990; Hartfelder & Engels, 1998; Pinto et al., 2002) (Figura 12). Em outros insetos como *D. melanogaster*, *B. mori*, *B. germanica* e *M. sexta*, também foi observada a expressão de *ftz-fl* em períodos de baixos títulos de ecdisteróides (Ueda et al., 1990; Sun et al., 1994; Rodriguez, 2005; Weller et al., 2000).

No processo de metamorfose em *D. melanogaster*, um primeiro pico de ecdisona induz alguns genes iniciais como BR-C, E74 e E75. Outro grupo de genes é expresso quando os níveis de ecdisona caem, na pré-pupa intermediária. Quando os níveis de ecdisona voltam a subir no final do período pré-pupal, a expressão destes genes é reprimida, e os genes iniciais voltam a ser expressos (Thummel, 1996). No entanto, Richards (1976) demonstrou que a segunda expressão dos genes iniciais não é induzida apenas pela ecdisona, mas um período precedente de síntese de proteínas e de baixos títulos do hormônio é necessário antes que esses genes voltem a ser expressos. Segundo Woodard et al. (1994), uma ou mais proteínas codificadas pelos genes expressos no período pré-pupal intermediário (durante os baixos títulos de ecdisona) provêm competência para que os genes iniciais voltem a ser transcritos após o pico pré-pupal de ecdisona; e  $\beta$ FTZ-F1 seria um desses fatores atuantes na aquisição dessa competência. Broadus et al. (1999) sugerem que  $\beta$ FTZ-F1 pode exercer essa função através de interações com o complexo EcR/USP (receptor de ecdisona) nas seqüências de DNA-alvo.

Ainda em *D. melanogaster*, a ecdisona reprime diretamente a transcrição de *βftz-fl*, restringindo sua expressão à pré-pupa intermediária. *βftz-fl* também reprime sua própria transcrição, assegurando uma expressão de curta duração (Woodard et al., 1994; Thummel, 1996; Thummel, 2001).

Os picos de expressão de *ftz-fl* observados em *A. mellifera* em S3 e PP3, anteriormente aos picos de ecdisteróides (Figura 12), e nossos resultados demonstrando a inibição da expressão de *ftz-fl* pelos tratamentos com ecdisona *in vivo* e *in vitro* (Figura 11, A e B), podem indicar a participação de FTZ-F1 na aquisição de competência para respostas à ecdisona, como acontece

em *D. melanogaster*, ainda que mecanismos moleculares de aquisição de competência não tenham sido descritos para *A. mellifera*.

Em *A. aegypti*, *βftz-fl* é altamente transcrito no final do período pupal e no corpo gorduroso da fêmea adulta durante os períodos pré e pós-vitelogênicos, quando os níveis de ecdisteróides são baixos. Experimentos *in vitro* com células do corpo gorduroso deste mosquito mostraram que a proteína FTZ-F1 aparece após a exposição ao HJ III (Zhu et al., 2003).

Em *A. mellifera*, os títulos de HJ são baixos em S1, aumentando gradativamente até PP2, e voltando a cair em PP3 (Rachinsky, 1990). Assim, o pico na expressão de *ftz-fl* observado em PP3 pode ainda ser consequência dos títulos de HJ mais altos existentes na fase anterior, ou de uma sinergia entre a ação de HJ e ecdisteróides, que possui um pico em PP2 (Figura 12).

Já os baixos níveis na expressão de *ftz-fl* durante o início do estágio pupal e seu aumento em Pbd (9,41 vezes maior em corpo gorduroso de rainhas do que em corpo gorduroso de operárias) coincidem com o perfil de expressão conhecido para a *vg* nessas fases (Figura 13 - Guidugli et al., 2005b). Neste estágio do desenvolvimento, Pbd, além dos baixos títulos de ecdisteróides, ocorre o aumento dos títulos de HJ em rainhas. Em operárias, este mesmo aumento só ocorre em recém nascidas (Rembold, 1987). Desta forma, a diferença na expressão de *ftz-fl* nas duas castas pode ser resultado da diferença nos títulos de HJ. Barchuk et al. (2002) demonstraram que a aplicação tópica de HJ em Pp ou Pbm faz com que a expressão e síntese de Vg ocorram mais cedo e em maior quantidade do que em abelhas controle. FTZ-F1 poderia atuar como mediador da ativação da transcrição de *vg* induzida pelo HJ.

Além destes resultados, Barchuk et al. (2002) observaram ainda que a injeção de 20E em Pbl provoca o atraso no aparecimento de Vg na hemolinfa. Ou seja, *ftz-fl* e *vg* parecem responder da mesma maneira aos títulos hormonais no período pupal, tendo suas expressões inibidas por altos títulos de 20E, como demonstramos para *ftz-fl* com a injeção do hormônio. Além desta inibição *in vivo*, a simulação do pico de ecdisona pela incubação *in vitro* de tegumentos torácicos na presença do hormônio e subsequente lavagem, confirma o efeito

---

inibitório da ecdisona sobre a expressão de *ftz-fl* (Figura 11, B). Sabe-se que a expressão de vários genes em *D. melanogaster* requer um pulso de ecdisona, ou seja, um aumento seguido de queda nos títulos do hormônio (Hiruma & Riddiford, 1990; Apple & Fristrom, 1991; Suzuki et al., 2002). No entanto, como observamos a inibição da expressão de *ftz-fl* mesmo em tegumentos submetidos à lavagem, podemos supor que o complexo EcR/USP/Ecdisona permanece após a lavagem e retirada do excesso de hormônio restante; ou ainda, que este complexo pode ter induzido proteínas reguladoras intermediárias que reprimem a expressão de *ftz-fl* mesmo após a remoção da ecdisona.

Para confirmar nossa hipótese de que *ftz-fl* tem sua expressão induzida pelo aumento nos títulos de HJ da mesma maneira que ocorre com *vg*, são necessários estudos de aplicação de HJ em pupas. Porém, analisando o perfil de expressão de *ftz-fl*, de *vg* e os resultados obtidos por Barchuk et al. (2002), temos fortes indícios de que FTZ-F1 realmente atua mediando a ação dos hormônios na regulação da expressão de *vg*.

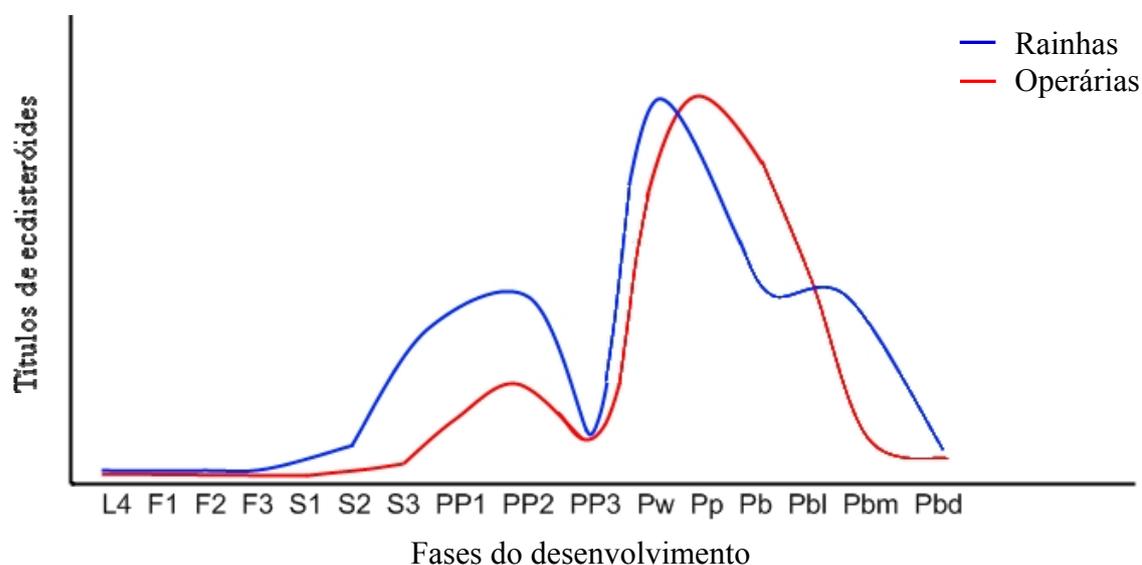


Figura 12: Títulos de ecdisteróides durante o desenvolvimento de rainhas e operárias de *Apis mellifera* (modificado de Rachinsky, 1990; Hartfelder & Engels, 1998; Pinto et al., 2002).

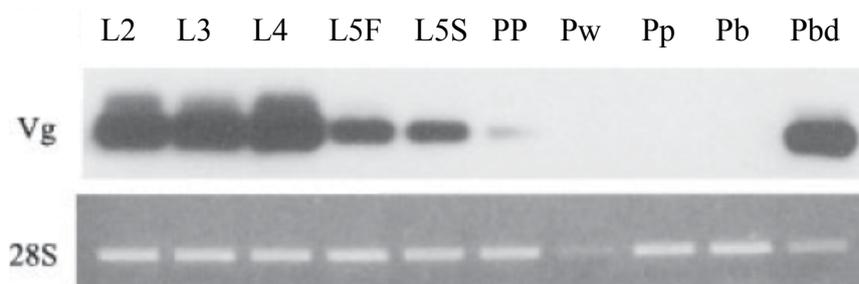


Figura 13: Expressão do gene codificador de vitelogenina durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*. RT-PCR semi-quantitativa. A amplificação do transcrito de 28S foi usada como controle. L2, L3, L4 L5F e L5S: estágios larvais. PP: pré-pupa. Pw: pupa de olho branco. Pp: pupa de olho rosa. Pb: pupa de olho marrom sem pigmentação do corpo. Pbd: pupa de olho marrom com pigmentação escura do corpo. (Guidugli et al., 2005b).

### **5.3 – Sobre os efeitos do *knockdown* de *ftz-fl***

O atraso no desenvolvimento das pupas tratadas com dsFTZ-F1 sugere que este fator de transcrição desempenha uma função importante no desenvolvimento pupal de *A. mellifera*. É possível que, nesta espécie, FTZ-F1 desempenhe a mesma função que em *D. melanogaster*, na qual este um fator de transcrição provê competência para a ação de ecdisona (Broadus et al., 1999), e mutantes para o gene *ftz-fl* não passam pela muda metamórfica, apresentam falhas na eversão da cabeça, na histólise das glândulas salivares e na alongação das pernas (Yamada et al., 2000). Transpondo este modelo para abelhas, as diminuições dos transcritos de *ftz-fl* e da proteína correspondente após o tratamento com dsFTZ-F1 impediriam que o pico do hormônio observado em Pp (Figura 12) desencadeasse as cascatas gênicas controladas pelo mesmo. Barchuk et al. (2008), em experimentos de *knockdown* de *usp* pela técnica de RNA de interferência também observaram um atraso no desenvolvimento em relação ao grupo controle, e podemos supor que este fato deu-se devido à queda nos níveis de transcritos de *ftz-fl* que foi provocada no experimento.

O gene *jhe* não teve os níveis de seus transcritos significativamente alterados em nossos experimentos de silenciamento de *ftz-fl*. Mackert et al. (2008) sugerem que *jhe* (*esterase do HJ*) pode ser regulado positivamente por Vg. Assim, quando ocorre um declínio nos níveis de Vg na hemolinfa de abelhas adultas, *jhe* seria menos expresso, aumentando os níveis de HJ circulante. Estas mudanças estão associadas à troca de comportamento de nutridoras para forrageadoras nas operárias. Como o *knockdown* foi realizado em operárias, e os títulos de HJ nesta casta só sobem em abelhas recém nascidas, e os transcritos de *jhe* começam a aumentar em Pbd e estão presentes em quantidades muito maiores também em recém nascidas, pode-se supor que não observamos efeitos do *knockdown* de *ftz-fl* sobre a expressão de *jhe* por termos analisado abelhas no estágio

---

Pbd. A análise dos efeitos deste experimento em recém nascidas poderia comprovar se FTZ-F1 tem alguma participação na regulação de *jhe* neste estágio do desenvolvimento.

EH foi primeiramente identificado em *M. sexta* (Truman & Riddiford, 1970). Decidimos analisar os efeitos do *knockdown* de *ftz-fl* sobre a expressão do gene codificador de EH devido à sua importância no processo de muda. EH atua no sistema nervoso e inicia o comportamento motor que leva ao desprendimento da cutícula em cada muda (Truman, 1978). Não observamos alteração significativa nos níveis de transcritos de *eh*, sugerindo que outros fatores, e não FTZ-F1, regulam a expressão deste gene.

O mesmo acontece com a bursicona  $\alpha$ . Esta proteína forma um heterodímero com a bursicona  $\beta$  (ambas codificadas pelo mesmo gene em *D. melanogaster*) e leva ao escurecimento e enrijecimento da cutícula após a eclosão (ver em De Loof, 2007).

USP e EcR formam o heterodímero receptor de ecdisona e foram estudados em *A. mellifera* por Barchuk et al. (2004 e 2008) e Teles (2007). O *knockdown* de *usp* provoca a queda nos transcritos de *ftz-fl* (Barchuk et al., 2008). Como nossos experimentos não mostraram mudanças significativas na expressão dos genes codificadores das proteínas formadoras do receptor de ecdisona, provavelmente *ftz-fl* tem sua transcrição regulada por elas – o que podemos supor pela inibição que 20E causa na expressão de *ftz-fl* e pelos resultados de Barchuk et al. (2008) – mas não ocorre um *feedback*.

Actinas, incluindo as três principais isoformas,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , são as proteínas mais abundantes nas células eucarióticas, tendo funções na mobilidade celular e manutenção do citoesqueleto (Hunter & Garrels, 1977). O gene codificador da actina é expresso constitutivamente e, por isso, é comumente usado como controle interno para normalização em estudos de expressão gênica (Sturzenbaum & Kille, 2001; Lourenço et al., 2008). A não alteração dos níveis de transcritos de *act* em nosso experimento de *knockdown* de *ftz-fl* mostra que as mudanças provocadas na expressão de outros genes foram efeitos específicos para os mesmos.

---

O aumento da quantidade de transcritos de *amelCRP14* nas abelhas *knockdown* de *ftz-fl* foi inesperado, uma vez que a ausência de ecdisona provocada por ligadura abdominal em pupas de *A. mellifera* diminui a transcrição deste gene (Soares et al., 2007). Esperar-se-ia, portanto, que, se a diminuição de *ftz-fl* impede a atuação normal de ecdisona, a expressão de um gene que depende de um pulso deste hormônio diminuiria após o experimento. No entanto, os mecanismos moleculares do controle da expressão de *amelCRP14* ainda não estão totalmente esclarecidos, sendo necessários outros estudos para responder a estas questões, como a análise por meio de micro arranjos dos efeitos do *knockdown* de *ftz-fl*. Em *D. melanogaster*,  $\beta$ FTZ-F1 induz a transcrição de genes codificadores de proteínas cuticulares como Edg84A e Edg78E (Murata et al., 1996; Kawasaki et al., 2002).

ProPo participa da cascata que leva à síntese de melanina (Mason, 1965), e foi caracterizada em *A. mellifera* por Lourenço et al. (2005). Como *proPo* parece estar sob o controle dos ecdisteróides (Zufelato et al., 2004), decidimos analisar os efeitos do *knockdown* de *ftz-fl* sobre sua expressão. Os resultados mostram um aumento significativo nos níveis de transcritos de *proPo* tanto no grupo que recebeu a injeção de dsGFP quanto no grupo que recebeu injeção de dsFTZ-F1, o que pode ser resultado da atuação da proteína em reações de resposta imune (ver Söderhäll & Cerenius, 1998).

No caso da diminuição na quantidade de transcritos de *vg* nas abelhas *knockdown* de *ftz-fl*, os resultados corroboram nossa hipótese inicial de que FTZ-F1 desempenha um papel na regulação da expressão deste gene, assim como ocorre em *A. aegypti* (Zhu et al., 2006). Poder-se-ia supor que este resultado foi observado devido ao atraso no desenvolvimento das abelhas tratadas com dsFTZ-F1, já que a expressão de *vg* é maior em Pbd (principal fase em que se encontram as abelhas controles) do que em Pbl (fase em que se encontram as abelhas *knockdown* de *ftz-fl*) (Figura 13). No entanto, se esta fosse a real causa dos resultados observados, o mesmo teria ocorrido para *jhe*, que possui maior expressão em Pbd e principalmente em recém nascidas

---

(2 abelhas do grupo sem injeção já haviam emergido) em relação a Pbl (Mackert et al., 2008); e ainda assim, o nível de transcritos de *jhe* não foi significativamente diferente entre os grupos. Além disso, Barchuk et al. (2008) realizaram experimentos de *knockdown* de *usp* e também observaram um atraso no desenvolvimento nas abelhas tratadas com dsUSP; e o nível de transcritos de *vg* não foi significativamente alterado.

Em *A. mellifera*, o tratamento com ecdisona inibiu a expressão de *ftz-f1*, e o mesmo ocorre com *vg* (Barchuk et al., 2002; Guidugli et al., 2005b). Em mosquitos, ao contrário, a ecdisona é essencial na expressão desse gene, que possui, em sua região promotora, sítios de ligação para o complexo EcR/Usp. O complexo EcR/Usp/ecdisona por sua vez, aumenta ainda mais a transcrição de *vg* quando ligado à proteína FISC, necessária para a acetilação da histona H4 no promotor de *vg*. O *knockdown* de *ftz-f1* em *A. aegypti* diminui o recrutamento de FISC na região promotora de *vg*, diminuindo muito a transcrição do gene (Zhu et al., 2006). Apesar de sabermos os efeitos de altas doses de ecdisona na expressão de *vg* em *A. mellifera*, o efeito que seria causado pela ausência do hormônio não é conhecido, e, portanto, não se sabe se o pico que ocorre em Pp é necessário para desencadear essa expressão tardia. Estudos futuros do efeito do *knockdown* de *EcR*, que impediria a ação da ecdisona, colaborarão para o esclarecimento do mecanismo de regulação da expressão de *vg* em *A. mellifera*.

Ainda assim, nossos resultados do *knockdown* de *ftz-f1* que provoca a queda no nível de transcritos de *vg*, somados à análise do perfil de expressão de ambos os genes que se mostram coincidentes temporalmente em pupas e em níveis mais altos em rainhas do que em operárias, e somados à inibição da transcrição de ambos provocada pelo tratamento com ecdisona, sugerem que FTZ-F1 é um forte candidato a mediar a ação hormonal na regulação da expressão de *vg*.

## *6 – Conclusão e Perspectivas*

---

O presente estudo mostra a importância de FTZ-F1 no desenvolvimento de *A. mellifera*, posto que o *knockdown* de seu gene provocou o atraso no desenvolvimento pupal. Os resultados também sugerem que FTZ-F1 regula a expressão de *vitelogenina* em *A. mellifera*, bem como de *AmelCRP14*. Além disso, demonstra que altos níveis de ecdisona inibem a expressão de *ftz-fl* e indica uma possível participação deste fator na capacitação para respostas à ecdisona.

Ainda não sabemos os efeitos do HJ e da ausência de ecdisona sobre a expressão de *ftz-fl*. Portanto, para esclarecer os mecanismos de ação deste fator de transcrição, pretendemos realizar estudos dos efeitos da supressão de 20E sobre a expressão de *ftz-fl*. Este experimento pode ser realizado por meio de ligadura abdominal, que impede a passagem de 20E para o abdômen. O *knockdown* de *EcR* também pode impedir a ação de 20E e permitir analisar o que ocorreria com a expressão de *ftz-fl* e de *vg* na ausência da atuação do hormônio. Além disso, a aplicação tópica de HJ permitiria verificar se a expressão de *ftz-fl* é ativada por este hormônio no final do período pupal da mesma forma que acontece com *vg*.

A análise dos efeitos do *knockdown* de *ftz-fl* por meio de micro arranjos de DNA permitiria avaliar a influência que este fator de transcrição desempenha em um maior número de genes.

Por fim, a expressão do domínio de união ao DNA de FTZ-F1, a produção de anticorpo para o mesmo e estudos de ligação à região promotora de genes, especialmente os codificadores de vitelogenina e *AmelCRP14*, podem mostrar se este fator regula diretamente a expressão destes genes, como mostram nossos resultados de *knockdown*.

## *7 – Referências Bibliográficas*

---

**Agrell I.P.S. and Lundquist A.M.** (1973) Physiological and Biochemical changes during insect development. In: The physiology of insecta 2<sup>nd</sup> Edition, ed. M. Rockstein, *Academic Press*, New York and London. 1: 159-247

**Amdam G.V and Omholt S.W.** (2003) The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *J. Theor. Biol.*, 223(4): 451-64

**Apple R.T. and Fristrom J.W.** (1991) 20-Hydroxyecdysone is required for, and negatively regulates, transcription of *Drosophila* pupal cuticle protein genes. *Devel. Biol.*, 146: 569-582

**Applied Biosystems** (1997) User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System. Applied Biosystems Inc., Foster City, CA. Disponível online: [docs.appliedbiosystems.com/pebi/docs/04303859.pdf](https://docs.appliedbiosystems.com/pebi/docs/04303859.pdf)

**Aranda A and Pascual A.** (2001) Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Phys. Rev.*, 31:1269-1304

**Barchuk A.R., Bitondi M.M.G. and Simões Z.L.P.** (2002) Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *J. Insect Science*, 2: 1-8. Disponível online: [insectscience.org/2.1](http://insectscience.org/2.1)

**Barchuk A.R., Maleszka R. and Simões Z.L.P.** (2004) *Apis mellifera ultraspiracle*: cDNA sequence and rapid up-regulation by juvenile hormone. *Insect Mol. Biol.*, 13: 459-467

**Barchuk A.R., Figueiredo, V.L.C. and Simões Z.L.P.** (2008) Downregulation of *ultraspiracle* gene expression delays pupal development in honeybees. *J. Insect Physiol.*, 54(6): 1035-1040

**Beckstead R., Ortiz J.A., Sanchez C., Prokopenko S.N., Chambon P., Losson R. and Bellen H.J.** (2001) Bonus, a *Drosophila* homolog of TIF1 proteins, interacts with nuclear receptors and can inhibit betaFTZ-F1-dependent transcription. *Mol. Cell.* 7(4): 753-765

**Beetsma J.** (1979) The process of queen-worker differentiation in the honey-bee. *Bee Wld*, 60: 24-39

**Borud B., Hoang T., Bakke M., Jacob A.L., Lund J. and Mellgren G.** (2002) The nuclear receptor coactivators p300/CBP/cointegrator-associated protein (p/CIP) and transcription intermediary factor 2 (TIF2) differentially regulate PKA-stimulated transcriptional activity of steroidogenic factor 1. *Mol. Endocrinol.* 16(4): 757-773

**Broadus J., McCabe J.R., Endrizzi B., Thummel C.S. and Woodard C.T.** (1999) The *Drosophila*  $\beta$ FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Mol. Cell* 3: 143-149

**Campos L.A. de O., Velthuis H.H.W. and Velthuis-Kluppel F.M.** (1975) Juvenile hormone and caste determination in a stingless bee. *Naturwissenschaften*, 62: 98-99

**Danielian P.S., White R., Lees J.A. and Parker M.G.** (1992) Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.*, 11(3): 1025-1033

**De Loof A.** (2007) Ecdysteroids, juvenile hormone and insect neuropeptides: Recent successes and remaining major challenges. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 155(1): 3-13

**Durand B., Saunders M., Gaudon C., Roy B., Losson R. and Chambon P.** (1994) Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J.* 13(22): 5370-5382

**Engels W., Kaatz H., Zillikens A., Paulino Simões Z.L., Trube A., Braun R. and Dittrich F.** (1990) Honey bee reproduction: Vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In: *Advances in Invertebrate Reproduction 5*, eds. Hoshi M. and Yamashita O. Elsevier, Amsterdam, 495-502

**Escriva H., Delaunay F. and Laudet V.** (2000) Ligand binding and nuclear receptor evolution. *BioEssays*, 22: 717-727

**Feldlaufer M.F., Herbert Jr E.W., Svoboda J.A., Thompson M.J. and Lusby W.R.** (1985) Makisterone A. The major ecdysteroid from the pupa of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem.*, 15: 597-600

**Gilbert S.F.** (2006) *Developmental Biology*. 8th edition, *Sinauer*, USA

**Guichet A., Copeland J.W., Erdelyi M., Hlousek D., Zavorszky P., Ho J., Brown S., Percival-Smith A., Krause H.M. and Ephrussi A.** (1997) The nuclear receptor homologue FTZ-F1 and the homeodomain protein Ftz are mutually dependent cofactors. *Nature* 385: 548-552

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

**Guidugli K.R., Piulachs M.D., Bellés X., Lourenço A.P. and Simões Z.L.P** (2005b) Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 5994: 211-218

**Gullan P.J. and Cranston P.S.** (1994) *The insects: an outline of entomology*. Chapman & Hall, London

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

**Henrich V.C. and Brown N.E.** (1995) Insect Nuclear Receptors: A developmental and comparative perspective. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 25: 881-897

**Hiruma K. and Riddiford L.M.** (1990) Regulation of dopa decarboxylase gene expression in the larval epidermis of the tobacco hornworm by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone. *Dev. Biol.*, 138: 214-224

**Horner M., Chen T. and Thummel C.S.** (1995) Ecdysone regulation and DNA binding properties of *Drosophila* nuclear hormone receptor superfamily members. *Dev. Biol.*, 168: 490-502

**Hunter T., and Garrels J.I.** (1977) Characterization of the mRNAs for alpha-, beta- and gamma-actin. *Cell*, 12: 767-781

**Ito, M., Yu, R.N. and Jameson, J.L.** (1998) Steroidogenic factor-1 contains a carboxyterminal transcriptional activation domain that interacts with steroid receptor coactivator-1. *Mol. Endocrinol.*, 12(2): 290-301

**Jung-Hoffman L.** (1966) Die Determination von Königin und Arbeiterin der Honigbiene. *Z. Bienenforsch.*, 8: 296-322

**Kageyama Y., Masuda S., Hirose S and Ueda H.** (1997) Temporal regulation of the mid-prepupal gene FTZ-F1: DHR3 early late gene product is one of the plural positive regulators. *Genes to Cells*, 2: 559-569

- Kastner P., Mark M. and Chambon P.** (1995) Nonsteroid nuclear receptors: What are the genetic studies telling us about their role in real life? *Cell*, 83: 859-869
- Kawasaki H., Hirose S. and Ueda H.** (2002) BetaFTZ-F1 dependent and independent activation of Edg78E, a pupal cuticle gene, during the early metamorphic period in *Drosophila melanogaster*. *Dev Growth Differ.*, 44(5): 419-425
- Lavorgna G., Ueda H., Clos J. and Wu C.** (1991) FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu. *Science*, 252: 848-851
- Lavorgna G., Karim F.D., Thummel C.S. and Wu C.** (1993) Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 3004-3008
- Li C., Kapitskaya M.A., Zhu J., Miura K., Segraves W. and Raikhel A.S.** (2000) Conserved molecular mechanism for the stage specificity of the mosquito vitellogenic response to ecdysone. *Dev. Biol.*, 224: 96-110
- Lourenco A.P., Zufelato M.S., Bitondi M.M. and Simoes Z.L.P.** (2005) Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(6): 541-552
- Lourenço A.P., Mackert A., Cristino A.S. and Simões Z.L.P.** (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., do Nascimento A.M., Bitondi M.M., Hartfelder K., Simões Z.L.** (2008) Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. - expression analysis and functional assays. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 150(1): 33-44
- Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P. and Evans R.** (1995) The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell*, 83: 835-839
- Mason H.S.** (1965) Oxidases. *Ann. Rev. Biochem.*, 34: 595-634

- Michelette E. R. D. and Soares A. E. E.** (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey-bee workers (*Apis mellifera*, L.). *Apidologie*, 24: 431–440
- Michener C.D.** (1974) The social behavior of the bees. A comparative study. Harvard University Press, Massachusetts
- Monte D., DeWitte F. and Hum D.W.** (1998) Regulation of the human P450scc gene by steroidogenic factor 1 is mediated by CBP/p300. *J Biol Chem.*, 273(8): 4585-4591
- Murata T., Kageyama Y., Hirose S. and Ueda H.** (1996) Regulation of the EDG84A gene by FTZ-F1 during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.*, 16(11): 6509-6515
- Nijhout H.F. and Wheeler D.E.** (1982) Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphism. *The Quart. Rev. of Biology*, 57: 109-133
- Oba K., Yanase T., Nomura M., Morohashi K., Takayanagi T. and Nawata H.** (1996) Structural characterization of human Ad4bp (SF-1) gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 226: 261-267
- Oberlander H.** (1985) The imaginal discs. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, ed. G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, *Pergamon Press*, 2: 151-182
- Parker K.L. and Schimmer B.P.** (1997) Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev.*, 18(3): 361-377
- Parker K.L., Rice D.A., Lala D.S., Ikeda Y., Luo X., Wong M., Bakke M., Zhao L., Frigeri C., Hanley N.A., Stallings N. and Schimmer B.P.** (2002) Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development, *Recent Prog. Horm. Res.*, 57: 19–36
- Parvy J.P., Blais C., Bernard F., Warren J.T., Petryk A., Gilbert L.I., O'Connor M.B. and Dauphin-Villemant C.** (2005) A role for betaFTZ-F1 in regulating ecdysteroid titers during post-embryonic development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.*, 282: 84-94
- Paulino Simões Z.L.** (1984) Haploid and diploid honey bee drones are JH sensitive: female specific proteins in fat body and hemolymph. In *Advances in Invertebrates Reproduction 3*, ed. Engels et al, Elsevier, Amsterdam

- Pfaffl M.W.** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9): 45
- Pinto Z.L., Bitondi M.M.G. and Simões Z.L.P** (2000) Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *J. Insect Physiol.*, 46: 153-160
- Pinto Z.L., Hartfelder K., Gentile Bitondi M.M. and Simões Z.L.P.** (2002) Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J. Insect Physiol.*, 48: 783-790
- Piulachs M.D., Guidugli K.R., Barchuk A.R., Cruz J., Simoes Z.L. and Belles X.** (2003) The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem Mol Biol.*, 33: 459-465
- Rachinsky A., Strambi C., Strambi A. and Hartfelder K.** (1990) Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of juvenile hormone and ecdisteroids in last instar honey bee larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 79: 31-38
- Rachinsky A. and Hartfelder K.** (1998) *In vitro* biosynthesis of juvenile hormone in larval honey bees: comparison of six media. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 34: 646-648
- Raikhel A.S and Dhadialla T.S.** (1992) Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 217-251
- Raikhel A.S., Kokoza V.A., Zhu J., Martin D., Wang S.F., Li C., Sun G., Ahmed A., Dittmer N. and Attardo G.** (2002) Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 1275-1286
- Rembold H., Kremer J.P. and Ulrich G.M.** (1980) Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L, *Apidologie*, 11: 29–38
- Rembold H.** (1987) Caste differentiation of the honeybee - Fourteen years of biochemical research at Martinsried. In Eder J and Rembold H. (Eds). *Chemistry and Biology of social insects*. Verlag J. Peperny, Munchen, 3-13
- Richards G.** (1976) Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. IV. The mid prepupal period. *Dev. Biol.*, 54: 256-263

**Riddiford L.M.** (1980a) Interaction of edysteroids and juvenile hormone in the regulation of larval growth and metamorphosis of the tobacco hornworm. In: Progress in ecdysone research, ed. J.A. Hoffmann, Elsevier, Amsterdam, 409-433

**Riddiford L.M.** (1980b) The hormonal control of morphogenesis of a lepidopteran epidermal cell. In: Insect biology in the future, eds. M. Locke and D.S. Smith, Academic Press, New York, 403-421

**Rodriguez J.C.** (2005) Receptores nucleares implicados en la regulación endocrina en *Blattella germanica* (L) (Dictyoptera, Blattellidae). Caracterización de los genes BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1. Tese de Doutorado. Universidade de Barcelona, Barcelona.

**Sanger F.; Nicklen S. and Coulson A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *PNAS*, 74: 5463

**Schwartz C.J.E., Sampson H.M., Hlousek D., Percival-Smith A., Copeland J.W.R., Simmonds A.J. and Krause H.M.** (2001) FTZ-Factor1 and Fushi tarazu interact via conserved nuclear receptor and coactivator motifs. *EMBO J.*, 20: 510-519

**Segraves W.A. and Hogness D.S.** (1990) The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev.*, 4: 204-219

**Snodgrass R.** (1956) Anatomy of the honey bee. *Ithaca, Comstock Publishing Associates, USA*

**Soares M.P., Elias-Neto M., Simões Z.L. and Bitondi M.M.** (2007) A cuticle protein gene in the honeybee: expression during development and in relation to the ecdysteroid titer. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(12): 1272-1282

**Söderhäll K. and Cerenius L.** (1998) Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 10: 23-28

**Struhl G.** (1985) Near-reciprocal phenotypes caused by inactivation or indiscriminate expression of the *Drosophila* segmentation gene *FTZ*. *Nature*, 318: 677-680

**Sturzenbaum S.R. and Kille P.** (2001) Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comp. Biochem. Physiol. Part B, Biochem. Mol. Biol.*, 130: 281-289

**Sun G. C., Hirose S. and Ueda H.** (1994) Intermittent expression of BmFTZ-F1, a member of the nuclear hormone receptor superfamily during development of the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Biol.*, 162: 626-437

**Suzuki T., Kawasaki H., Yu R.T., Ueda H. and Umesono K.** (2001) Segmentation gene product Fushi tarazu is an LXXLL motif-dependent coactivator for orphan receptor FTZ-F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(22): 12403-12408

**Suzuki Y., Matsuoka T., Iimura Y. and Fujiwara H.** (2002) Ecdysteroid-dependent expression of a novel cuticle protein gene BMCPG1 in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 599-607

**Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S.** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596-1599

**Teles A.C.A.S.** (2007) Sequência de cDNA e modulação hormonal da expressão do receptor de ecdisona (EcR) em fêmeas de *Apis mellifera*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

**Thummel C.S.** (1996) Flies on steroids - *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action., *Trends Genet.*, 12: 306-310

**Thummel C.S.** (2001) Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. *Dev. Cell.*, 1: 453-465

**Truman J.W. and Riddiford L.M.** (1970) Neuroendocrine control of ecdysis in silkmoths, *Science*, 167: 1624-1626

**Truman J.W.** (1978) Hormonal release of stereotyped motor programmes from the isolated nervous system of the cecropia silkmoth, *J. Exp. Biol.*, 74: 151-173

**Ueda H., Sonoda S., Brown J.L., Scott M.P. and Wu C.** (1990) A sequence-specific DNA-binding protein that activates fushi tarazu segmentation gene expression. *Genes Dev.*, 4: 624-635

**Ueda, H. and Hirose, S.** (1991) Defining the sequence recognized with BmFTZ-F1, a sequence specific DNA binding factor in the silkworm, *Bombyx mori*, as revealed by direct sequencing of bound oligonucleotides and gel mobility shift competition analysis. *Nucleic Acids Res.*, 19(13): 3689-3693

**Ueda H., Sun G.C., Murata T and Hirose S.** (1992) A novel DNA-Binding motif abuts the zinc finger domain of insect nuclear hormone receptor FTZ-F1 and mouse embryonal long terminal repeat-binding protein. *Mol. Cell. Biol.*, 12: 5667-5672

**Val P., Lefrançois-Martinez A.M., Veyssière G. and Martinez A.** (2003) SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues, *Nucl. Recept.*, 1: 8

**Valle D.** (1993) Vitellogenesis in insects and other groups - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88: 1-26

**Wakimoto B.T., Turner F.R. and Kaufman T.C.** (1984) Defects in embryogenesis in mutants associated with the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 102: 147-172

**Weller J., Sun G-C., Zhou B., Lan Q., Hiruma K. and Riddiford L.M.** (2001) Isolation and developmental expression of two nuclear receptors, MHR4 and FTZ-F1, in the hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(8): 827-837

**White K.P., Hurban P., Watanabe T. and Hogness D.S.** (1997) Coordination of *Drosophila* metamorphosis by two ecdysone-induced nuclear receptors. *Science*, 276:114-117

**Wirtz P and Beetsma J.** (1972) Induction of caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera*) by juvenile hormone. *Ent. Exp. Appl.*, 15: 517-520

**Wong M., Ramayya M.S., Chrousos G.P., Driggers P.H. and Parker K.L.** (1996) Cloning and sequence analysis of the human gene encoding steroidogenic factor 1. *J. Mol. Endocrinol.*, 17(2): 139-147

**Woodard C.T., Baehrecke E.B. and Thummel C.S.** (1994) A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. *Cell.*, 79: 607-615

**Wu W., Niles E.G., Hirai H. and LoVerde P.T.** (2007) Evolution of a novel subfamily of nuclear receptors with members that each contains two DNA binding domains. *BMC Evol. Biol.*, 23: 7-27

**Wurtz J.M., Bourguet W., Renaud J.P., Vivat V., Chambon P., Moras D. and Gronemeyer H.** (1996) A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.*, 3:87-94

**Yamada M., Murata T., Hirose S., Lavorgna G., Suzuki E. and Ueda H.** (2000) Temporally restricted expression of transcription factor FTZ-F1: significance for embryogenesis, molting and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 127: 5083–5092

**Yu Y., Li W., Su K., Yussa M., Han W., Perrimon N. and Pick L.** (1997) The nuclear hormone receptor FTZ-F1 is a cofactor for the *Drosophila* homeodomain protein FTZ. *Nature.*, 385: 552-555

**Zhu J., Chen L. and Raikhel A.S.** (2003) Posttranscriptional control of the competence factor betaFTZ-F1 by juvenile hormone in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(23): 13338-13343

**Zhu J., Chen L., Sun G. and Raikhel A.S.** (2006) The competence factor beta FTZ-F1 potentiates ecdysone receptor activity via recruiting a p160/SRC coactivator. *Mol. Cell Biol.*, 26(24): 9402-9412

**Zufelato M.S., Lourenco A.P., Simoes Z.L.P., Jorge J.A. and Bitondi M.M.** (2004) Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(12): 1257-1268

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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