

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

**“Efeitos da quantidade de alimento larval sobre a
determinação de castas da abelha sem ferrão *Scaptotrigona*
aff. depilis (Moure, 1942) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)
– uma análise morfométrica, de expressão gênica e de títulos
de hormônio juvenil”**

Gisele de Carvalho P. Cabral

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: Entomologia.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2009

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 ENTOMOLOGIA

**“Efeitos da quantidade de alimento larval sobre a
determinação de castas da abelha sem ferrão *Scaptotrigona*
aff. depilis (Moure, 1942) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)
– uma análise morfométrica, de expressão gênica e de títulos
de hormônio juvenil”**

Gisele de Carvalho Pinto Cabral

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. 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: Entomologia.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2009

Cabral, Gisele de Carvalho Pinto.

Efeitos da quantidade de alimento larval sobre a determinação de castas da abelha sem ferrão *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Moure, 1942) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) – uma análise morfométrica, de expressão gênica e de títulos de hormônio juvenil / Gisele de Carvalho Pinto Cabral; orientador Zilá Luz Paulino Simões.

--Ribeirão Preto, 2009.

83 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Entomologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Palavras-chave: 1. Determinação de castas. 2. Abelhas sem ferrão. 3. Rainhas miniaturas. 4. Hormônio Juvenil. 5. Via de síntese do HJ. 6. Via de degradação do HJ. 7. Metilação do DNA. 8. Receptores nucleares.

CABRAL, Gisele de Carvalho Pinto

Efeitos da quantidade de alimento larval sobre a determinação de castas da abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. depilis* (Moure, 1942) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) – uma análise morfométrica, de expressão gênica e de títulos de hormônio juvenil

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Entomologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico às pessoas que mais amo nesta vida,
a toda minha família e ao meu noivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à prof^a Zilá Luz Paulino Simões, pela orientação, amizade e principalmente, pela confiança no meu trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À Prof^a Márcia M. Bitondi, que, juntamente com a prof. Zilá L. P. Simões, durante a supervisão do estágio PAE, deram o exemplo de dedicação e responsabilidade envolvidas na docência, contribuindo muito para minha formação como professora.

Agradeço ao prof. Dr. Klaus Hartfelder, pela preocupação no bom desenvolvimento do meu trabalho, sugerindo bibliografias importantes e discutindo alguns resultados dessa dissertação.

Ao prof. Ronaldo Zucchi, que também me supervisionou no estágio PAE, também contribuindo muito para minha formação, mostrando toda dedicação e carinho no preparo das aulas.

Aos colegas do bloco A do Departamento da Genética, que direta ou indiretamente contribuíram para o melhor desenvolvimento do meu trabalho.

À Fernanda Torres, por ter me acolhido e me situado no Laboratório de Desenvolvimento de Abelhas, me ajudando muito, principalmente no começo do meu trabalho.

À Aline Mackert dos Santos, por ter me sugerido idéias para adicionar no meu projeto, contribuindo também para a melhor realização do mesmo.

À Aline Aleixo, por ter me ajudado na discussão de alguns dos resultados deste trabalho.

A Vera Figueiredo, por me auxiliado em algumas atividades que desempenhei dentro do laboratório.

À Marcela A. F. B. Laure, pela prontidão em me ajudar com as dissecações realizadas neste trabalho.

Aos colegas e amigos do bloco da Ecologia do Departamento da Biologia, por terem estado comigo, durante todos os momentos.

Ao Cristiano Menezes, por ter me ajudado muito, principalmente na criação das larvas *in vitro*, permitindo que meus experimentos pudessem ser montados; e também por ter discutido alguns dos resultados obtidos.

Ao Ayrton Vollet Neto, por ter me auxiliado no cuidado com as larvas criadas *in vitro*.

À Maria Juliana F. Caliman, por me sugerir testes estatísticos para analisar meus dados, além de sua amizade, estando sempre pronta para me ajudar.

A todos os meus amigos, que mesmo não estando diretamente envolvidos no meu trabalho, me deram muito apoio, acompanhando de perto todo o desenvolvimento desse trabalho, em especial, os amigos: João Paulo Basso Alves, Juliana Feres, Pâmela Adorno, Fernanda Vergamini, Emilena Marques, Cláudia Antunes, Marina Fantucci e Tatiana Nakabayashi

Ao meu noivo, Henrique, pelo auxílio que me prestou em todas as etapas do meu mestrado, mas principalmente, pelo companheirismo, paciência e incentivo, os quais contribuem muito para meu crescimento profissional.

A toda minha família, especialmente aos meus pais, pelo amor, apoio e preocupação.



“É preciso que eu suporte duas ou três lagartas se quiser conhecer as borboletas” (Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

CABRAL, G. C. P. **Efeitos da quantidade de alimento larval sobre a determinação de castas da abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. depilis* (Moure, 1942) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) – uma análise morfométrica, de expressão gênica e de títulos de hormônio juvenil.** 83 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Neste estudo, foi investigado o efeito da dieta larval no desenvolvimento de características morfológicas casta-específicas e na expressão de alguns genes durante o desenvolvimento da abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. depilis*. Nesta espécie, as castas femininas são determinadas pela quantidade de alimento consumida durante o desenvolvimento larval. Grupos experimentais larvas criadas *in vitro* foram feitos com duas quantidades diferentes de alimento larval, obtido de favos recém provisionados nesta espécie. As larvas do primeiro grupo receberam 32µl de alimento larval, correspondente a quantidade média de alimento recebida por larvas de operárias naturalmente, já as larvas do segundo grupo receberam 130µl, correspondente a quantidade média encontrada naturalmente em células reais. Todas as larvas criadas com 130µl de alimento larval se desenvolveram em rainhas, como esperado; da mesma forma, a maioria das larvas criadas com 32µl se desenvolveram em operárias. Interessantemente, porém, algumas larvas deste grupo se desenvolveram em rainhas miniaturas, sugerindo que outros fatores, além do trófico, estejam envolvidos na determinação de castas em *S. aff. depilis*. Subsequentemente, analisamos os títulos de hormônio juvenil (HJ) na hemolinfa por radioimunoensaio durante quatro estágios do último instar larval e encontramos que as larvas do grupo de 130µl de dieta apresentaram maiores títulos no estágio defecante (LD) ($p=0,034$, t-test), se comparado com as larvas do grupo de 32µl. Os níveis de expressão de determinados genes que foram previamente descritos em outras espécies como expressos preferencialmente em rainhas. Um destes genes, *dnmt-3*, codifica a DNA metiltransferase envolvida na metilação do DNA. Para este gene, encontramos maiores níveis de transcritos nas larvas alimentadas como rainhas (130µl) nos estágios LPD e LD ($p=0,029$, Mann-Whitney), do que as larvas que receberam 32µl. Analisamos também dois genes envolvidos no metabolismo do HJ, e para um deles, *jheh*, codificador de uma epóxido-hidrolase do

hormônio juvenil, não encontramos diferença nos níveis de mRNA entre larvas de rainhas e operárias. Para *jhe*, o qual codifica a esterase do hormônio juvenil, encontramos maiores níveis de transcritos no estágio LD nas larvas criadas com 130µl de alimento. Isso indica que a expressão de *jhe* pode ser induzida pelo aumento dos títulos de HJ neste estágio. Os dois genes, *hmgr* e *mfe*, envolvidos no passo inicial e final da síntese do HJ, respectivamente, o primeiro mostrou uma pequena variação nos níveis de expressão, sendo que a expressão de *mfe* foi menor nas larvas criadas com 32µl de alimento larval e foi encontrado um pico de expressão no estágio LPD nas larvas alimentadas com 130µl. O produto desse gene, metilfarnesoato epoxidase, está envolvido no passo limitante da síntese de HJ em *Apis mellifera*. Dois outros genes analisados foram o homólogo ao *EcR*, codificador do receptor de ecdisona e o *usp*, codificador do potencial receptor do HJ. Seus níveis de expressões foram maiores nos estágios LPD e LD, respectivamente, nas larvas alimentadas com 130µl de alimento e os níveis de *EcR* se correlacionaram com o perfil dos títulos de ecdisona e os de *usp* com os títulos de HJ, publicados para esta espécie. Não houve diferença nos níveis de expressão dos genes selecionados que pudessem relacionar ou permitir distinguir as rainhas miniaturas das operárias durante os estágios do desenvolvimento estudados. Uma análise morfométrica de adultos faratos indica claramente que as rainhas miniaturas são rainhas autênticas.

Palavras-chave: 1. Determinação de castas. 2. Abelhas sem ferrão. 3. Rainhas miniaturas. 4. Hormônio Juvenil. 5. Via de síntese do HJ. 6. Via de degradação do HJ. 7. Metilação do DNA. 8. Receptores nucleares.

Abstract

CABRAL, G. C. P. **The role of the quantity of larval diet in caste determination of the stingless bee *Scaptotrigona aff. depilis* (Moure, 1942) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) – a morphometric, gene expression e hormone titer analysis.** 83 f. Master Thesis - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

In this work we investigated the role played by the larval diet in the development of caste-specific morphological traits and in the expression of candidate genes during the development of the stingless bees, *Scaptotrigona aff. depilis*. In this species, the female castes are determinate by the amount of food consume during larval development. Experimental groups of larvae were reared *in vitro* on two different quantities of larval food obtained from newly provisioned brood cells of this species. Larvae of the first group received 32µl of larval food, corresponding to the quantity usually received by the workers larva, whereas larvae of the second group received 130µl, corresponding to the quantity normally deposited in queen cells. All larvae reared on 130µl of larval food developed into queens, as expected, and similarly, most of the larvae reared on 32µl developed into workers. Interestingly, however, some larvae of this group developed into miniature queens, suggesting that factors additional to the trophic ones may be involved in caste determination in *S. aff. depilis*. We subsequently analyzed the hemolymph juvenile hormone (JH) titers by radioimmunoassay during four stages of the last larval instar and we found that larvae of the 130µl diet group had higher JH titer in the defecating stange (LD) ($p=0,034$, t-test) than larvae of the 32µl diet group. Next we analyzed the expression levels of set of candidate genes that had previously been described as preferentially expressed in queens of others bee species. One of these genes *dnmt-3*, encodes DNA methyltransferase involved in DNA methylation. For this gene we found higher transcripts levels in prospective queens during the final larval stage (both in pre-defecating larvae – LPD and defecating larvae- LD) ($p=0,029$, Mann-Whitney). We also analyzed two genes involved in JH metabolism, and for one of them *jheh*, encoding a juvenile hormone epoxide hydrolase, we did not find any differences in mRNA levels for queens and workers larvae. For *jhe*, which codes juvenile hormone esterase we found higher transcript levels in the LD stage in larvae reared on 130µl of larval food. This indicates that *jhe* expression may be induced by an elevated JH titer

during this stage. For two genes, *hmgr* and *mfe*, involved in an initial and a final step of JH synthesis, respectively, the first one showed little variation in expression levels, whereas *mfe* expression was lower in larvae reared on 32µl of larval food and we found an expression peak in the LPD stage ($p=0,029$, Mann-Whitney) of larvae reared on 130µl larval food. The product of this gene, a methylfarnesoate epoxidase, has been shown to be involved in a rate-limiting step of JH synthesis in the honey bee, *Apis mellifera*. The other two genes analyzed were the *EcR* homolog encoding an ecdysone receptor and *usp* coding for potential JH receptor. Their expressions were higher during LPD ($p=0,006$, t-test) stages and LD ($p=0,026$, t-test), respectively, in larvae fed with 130µl of food and the levels of transcripts of *EcR* correlated with changes in the ecdysone titer and *usp* with the JH titer published for this species. We did not find differences in expressions levels for any of these candidate genes that could related to and allow to distinguish between prospective miniature queens and workers in these stages. A morphometric analysis of pharate adults, however, clearly demonstrated that the miniature queens are authentic queens.

Keywords: 1. Determination of caste. 2. Stingless bees. 3. Miniature queens. 4. Juvenile Hormone. 5. Via of synthesis of JH. 6. Via of degradation of JH. 7. DNA methylation. 8. Nuclear receptors.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 As abelhas sem ferrão	16
1.2 Diferenciação de castas	17
1.2.1 Hormônios	19
1.3 Genes envolvidos na diferenciação de castas.....	21
1.4 Epigenética	24
2. OBJETIVO.....	25
2.1 Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 . Material biológico	28
3.2 Medidas	29
3.3 Quantificação do hormônio juvenil (HJ) por Radioimunoensaio	31
3.4 Extração de RNA total e síntese de cDNA	32
3.5 Amplificações por PCR (Polymerase Chain Reaction)	32
3.6 Genes estudados	33
3.7 Clonagem e sequenciamento.....	34
3.8 Quantificação dos níveis de transcritos - RT-PCR semiquantitativa.	35
3.9 Estatística.....	37
4. RESULTADOS	38
4.1 Desenvolvimentos das larvas	39
4.2 Razão sexual.....	40
4.3 Morfologia interna (ovários) das larvas alimentadas com diferentes dietas.....	41
4.4 Morfometria.....	42
4.5 Comportamento	47
4.6 Tempo de desenvolvimento	47
4.7 Peso das larvas.....	48
4.8 Área do corpo das larvas	50

4.9	Peso dos indivíduos após emergência	52
4.10	Genes sequenciados: Esterase do Hormônio Juvenil, Epóxido Hidrolase do Hormônio Juvenil e DNA citosina-5-metil transferase	53
4.11	Análises da expressão dos genes	54
4.11.1	Curva de saturação	55
4.11.2	<i>dnmt-3</i>	56
4.11.3	<i>EcR</i> e <i>usp</i>	57
4.11.4	Genes da via de síntese do HJ	59
4.11.5	Genes da via de degradação do HJ	61
4.12	Títulos de HJ	63
5.	DISCUSSÃO	64
5.1	Metabolismo das rainhas	65
5.2	Títulos de HJ	66
5.3	Níveis de transcritos de <i>mfe</i> e <i>hmgr</i>	68
5.4	Níveis de transcritos de <i>jhe</i> e <i>jheh</i>	69
5.5	Níveis dos transcritos de <i>EcR</i> e <i>usp</i>	70
5.6	Níveis de <i>dnmt-3</i>	71
5.7	O aparecimento de rainhas miniaturas	72
5.7.1	Hipótese 1 – Erro na quantificação do alimento	73
5.7.2	Hipótese 2 - Falta do contexto colonial.....	73
5.7.3	Hipótese 3 – Componentes bioativos	73
5.7.4	Hipótese 4 – Auto determinação de castas em situações de estresse	74
6.	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 As abelhas sem ferrão

A espécie estudada, *Scaptotrigona aff. depilis* (Moure, 1942) pertence ao grupo dos Meliponini, o qual inclui todas as abelhas sem ferrão. Existem centenas de espécies agrupadas em cerca de 60 gêneros descritos até o momento (Roubik, 2006). Na região Neotropical são 384 espécies já nomeadas e um número semelhante de espécies a serem descritas (Camargo, inf. pessoal).

A principal característica dos Meliponini é que as larvas recebem uma alimentação massiva, ou seja, todo alimento ingerido durante o desenvolvimento pós-embrionário é provisionado pelas operárias antes da rainha ovipositar. Depois que esta o faz, as operárias entram em ação de novo, operculando as células de cria. Assim, o desenvolvimento larval prossegue sem alimentação suplementar e contato com outras abelhas da colônia, diferentemente da alimentação progressiva, encontrada nas abelhas melíferas; as operárias, neste caso, são capazes de controlar o número de rainhas que serão produzidas.

Outra característica dos meliponíneos, compartilhada com todas as abelhas do grupo Apini, é a eussocialidade, a qual pressupõe a existência de castas, divisão de tarefas e sobreposição de gerações (Wilson, 1971; Michener, 1974). Numa colônia, são encontradas duas castas convivendo juntas: as fêmeas reprodutoras (rainhas), que têm a principal função de reprodução e as fêmeas não fecundadas, filhas da rainha (operárias), responsáveis por atividades envolvidas com a manutenção da colônia, como limpeza, cuidado com a prole, além de defesa e forrageamento.

Além de diferenças comportamentais, rainhas e operárias se distinguem também morfológicamente pelo tamanho da cabeça, dos olhos compostos, número de segmentos antenais, forma do clipeo (Camargo et al., 1967). Além disso, as rainhas apresentam uma estrutura armazenadora de espermatozoides após acasalamento, a espermateca; possuem também a glândula de Dufour, cuja secreção pode estar relacionada à distinção, por parte das operárias, entre seus próprios ovos e os da rainha (Ratnieks, 1995). Enquanto que as operárias possuem a corbícula, uma estrutura adaptada à coleta de pólen, localizada na tíbia do terceiro par de pernas; não possuem espermateca (ou esta pode estar extremamente atrofiada; Silva, comum. pessoal), os ovários são bem menos desenvolvidos que das rainhas (Michener, 1974) e, em todas as espécies de meliponíneos estudadas, não foi observada a glândula de Dufour nesta casta (Abdalla, 2006).

1.2 Diferenciação de castas

O processo de diferenciação de castas tem sido foco de muitos estudos, que tentam entender como que as fêmeas, provenientes de ovos fecundados, dão origem a duas formas completamente distintas (rainhas e operárias).

A diferenciação de castas é bem estudada em *Apis mellifera*, que influenciada pela quantidade e qualidade da dieta que a larva ingere durante seu desenvolvimento (Beetsma, 1979). As larvas que darão origem a rainhas são alimentadas durante todo o seu desenvolvimento com geléia real, já para as larvas destinadas a serem operárias, este alimento é fornecido até o terceiro dia de vida larval, sendo posteriormente substituído por uma mistura de mel, pólen e secreções das glândulas hipofaríngeas, comumente denominado de “geléia das operárias”.

O que se sabe hoje para os meliponíneos é que há dois mecanismos envolvidos no processo de diferenciação de castas, um trófico, porém diferente do encontrado em *A. mellifera* e outro genético-alimentar, encontrado apenas no gênero *Melipona* (Kerr, 1946).

No gênero *Melipona*, dentre as larvas, igualmente alimentadas, até 25% do total de fêmeas podem se desenvolver em rainhas (Kerr, 1950). O fato de as rainhas ocorrerem em proporções relativamente fixas em uma colônia chamou a atenção, inicialmente, de von Ihering, 1903 *apud* Kerr, 1946 e, posteriormente, de Kerr (1946), levando esse autor a propor, em 1948, um modelo genético-alimentar para explicar a determinação de castas nessas abelhas. Segundo esse autor, dois genes X^a e X^b , com dois alelos cada um, seriam codificadores de produtos feminilizantes, de forma que a dupla heterozigose associada à alimentação suficiente promove a diferenciação em rainhas, enquanto larvas mal alimentadas ou homozigotas para um ou ambos os genes, se desenvolvem em operárias.

Nos demais gêneros de abelhas sem ferrão, por outro lado, há diferença no tamanho das células de cria, nas maiores são produzidas as rainhas, e por isso chamadas de células reais, e das outras, de menor tamanho, nascem operárias e machos. Há exceção para os gêneros *Frieseomellita* e *Leurotrigona*, em que as células de cria são todas do mesmo tamanho, e as larvas que darão origem a rainhas perfuram a célula vizinha, matam a larva presente nela e comem o alimento extra. Um esquema do processo descrito acima para desenvolvimento de rainhas em Meliponini encontra-se na Figura 1.

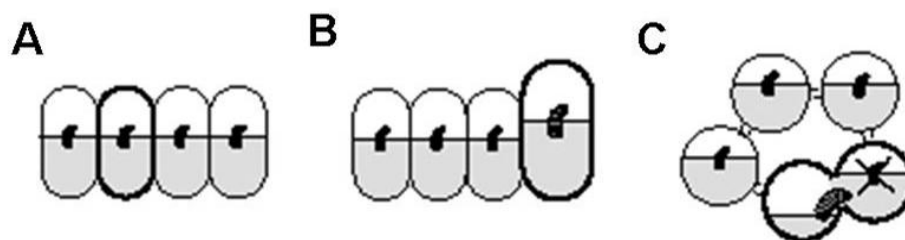


FIGURA 1: Mecanismos de produção natural de rainhas em Meliponini. **A)** No gênero *Melipona*, em células de cria do mesmo tamanho; **B)** Na maioria dos outros gêneros, em células reais, maiores e com maior quantidade de alimento larval; **C)** Nos gêneros *Frieseomelitta* e *Leurotrigona*, com alimentação extra da célula de cria vizinha invadida. Fonte: Ribeiro et al., 2006.

Como larvas que se alimentam mais dão origem a rainhas, pesquisadores como von Ihering (1903) *apud* Kerr (1948) e Kerr (1948) acreditaram que a quantidade de alimento seja responsável pela diferenciação das castas nestes outros gêneros.

Entretanto, há algumas espécies de Meliponini (nove encontradas até hoje), que além de produzirem rainhas nas células reais, produzem também em células de cria de tamanho normal, as mesmas utilizadas para a produção de machos e operárias e com aparentemente, a mesma quantidade de alimento em cada uma delas. Estas rainhas são menores que as típicas, e por isso são chamadas de rainhas anãs ou miniaturas. Esta diferença no tamanho não as impede de serem fecundadas e atuar normalmente como rainhas das colônias (revisado por Ribeiro et al., 2006).

Três principais hipóteses tentam explicar porque as rainhas miniaturas são produzidas. Uma delas, elaborada por Nogueira-Ferreira et al. (2000), diz que elas são produzidas estrategicamente como forma de assegurar o futuro da colônia, em caso da rainha (mãe) morrer; outra hipótese diz que as rainhas miniaturas são consequências de erros no desenvolvimento, algumas larvas alimentadas como operárias podem dar origem à rainhas (miniaturas), da mesma forma que algumas operárias (gigantes) são originadas de larvas alimentadas como rainhas (Campos & Costa, 1989; Nogueira-Ferreira et al., 2000). Já Bourke & Ratnieks (1999), através da teoria da auto determinação de castas, explicam que as larvas são capazes de escolher seus próprios destinos, ou seja, podem dar origem a rainhas ou a operárias, mesmo tendo recebido a mesma quantidade de alimento durante o seu desenvolvimento.

Além disso, pensou-se que, além da quantidade de alimento, outros fatores estivessem envolvidos como desencadeadores do processo de determinação de castas, como a qualidade do alimento. Porém, alguns trabalhos já demonstraram que larvas alimentadas com o mesmo tipo de alimento, podem dar origem tanto a rainhas quanto a operárias, dependendo da quantidade que é oferecida durante o desenvolvimento larval.

Por exemplo, Campos & Costa (1989) mostraram que em *Schwarziana quadripunctata*, uma das espécies que produzem rainhas miniaturas naturalmente, todas as larvas que eram alimentadas com 28-30 μ l originaram operárias e que, duplicando esta quantidade de alimento, nascia 100% de rainhas. Quando lhes foi fornecido valor intermediário (40 μ l de alimento) houve produção de 95% de operárias e 5% de rainhas; infelizmente não há informações se estas rainhas eram miniaturas.

Camargo (1972a) também obteve sucesso na produção *in vitro* de rainhas de *Scaptotrigona postica*, oferecendo às larvas o triplo da quantidade de alimento (120mm³) recebido pelas larvas que darão origem às operárias.

1.2.1 Hormônios

Independente do tipo de alimentação observado em Meliponini foi mostrado por diversos autores (Campos et al., 1975; Campos, 1979a; Campos, 1979b; Buschini & Campos, 1991; Velthuis & Velthuis-Kluppell, 1995; Bonetti et al., 1995) que o desenvolvimento em rainhas pode ser induzido pela aplicação de hormônio juvenil (HJ) ou seus análogos, ou seja 100% das larvas que dariam origem a operárias e que recebem o tratamento com HJ durante o estágio de tecelagem do casulo, no último estágio larval, se desenvolveram em rainhas. Ligando, indiscutivelmente, o HJ ao processo de diferenciação de castas nestas abelhas.

Outros estudos, utilizando a espécie *A. mellifera*, comprovam que a alimentação diferencial atua no sistema nervoso, o qual influencia a ativação de glândulas endócrinas, produtoras de hormônios específicos, como é o caso do hormônio protoracicotrópico (PTTH) e dos morfogenéticos (hormônio juvenil e ecdisteórides). Estes, por sua vez, desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento de características distintas entre rainhas e operárias (Nijhout & Wheeler, 1982; de Wilde & Beetsma, 1982). Como por exemplo, no desenvolvimento ovariano de *A. mellifera*, em que altos níveis de hormônio juvenil (HJ), verificados em larvas que originarão rainhas, previnem a morte celular deste órgão (Capella & Hartfelder, 1998, 2002) e estimulam a

glândula protorácica, a produzir os ecdisteróides, que, por sua vez, atuam conjuntamente com o HJ neste processo (Rembold, 1987; Rachinsky et al., 1990).

Assim como em *A. mellifera*, nos meliponíneos, os processos de diferenciação de castas são também controlados pelo HJ e ecdisteróides (Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990; Hartfelder et al., 2006).

Além disso, estes hormônios podem iniciar e controlar os processos de mudas e metamorfose, sendo que as mudas larvais/larvais ocorrem na presença de ecdisona juntamente com altos títulos de HJ, e a metamórfica, quando os níveis de HJ estão baixos e os de ecdisona altos. Assim, o HJ previne que a muda metamórfica ocorra precocemente (Sakagami, 1982; Riddiford, 1985). Durante o desenvolvimento pupal, a ecdisona estimula a pupa, transformando-a em um indivíduo adulto (Gilbert, 2006).

A regulação dos títulos de HJ está vinculada aos processos fisiológicos e bioquímicos de síntese, degradação, ligação a proteínas específicas e ainda secreção que modulam os títulos finais de HJ na hemolinfa, sendo este último, um processo de autorregulação. Dentre esses fatores, a regulação da síntese tem sido considerada de grande importância; esta é feita por um par de glândulas do complexo retrocerebral, os *corpora allata* (CA), e inclui uma extensa e complexa via enzimática que envolve dois produtos intermediários muito estudados em vertebrados: o mevalonato e o farnesil pirofosfato. Em vertebrados, estes intermediários levam ao produto final, colesterol, molécula de grande interesse devido às suas implicações nas doenças cardiovasculares humanas (revisado por Bellés et al. 2005), nos insetos não há produção de colesterol.

O HJ é secretado na hemolinfa, atingindo então vários órgãos e tecidos. Na hemolinfa, pode ser degradado em momentos precisos do ciclo de vida dos insetos; esta função é atribuída principalmente a duas enzimas: a esterase do hormônio juvenil (JHE), que hidrolisa o grupo metil éster do HJ, resultando como produto o HJ-ácido e a epóxido hidrolase do hormônio juvenil (JHEH), gerando HJ-diol (de Kort & Granger, 1996; Hinton & Hammock, 2001). JHE e JHEH degradam ainda, respectivamente, HJ diol e HJ ácido, produzindo o HJ-ácido-diol, cuja atividade metabólica ainda não foi descoberta (de Kort e Granger, 1996).

Acreditava-se que tanto o HJ-ácido quanto HJ-diol seriam formas inativas (Hammock, 1985), mas estudos mais recentes demonstraram que o primeiro composto tem atividade metabólica (Ismail et al., 1998; 2000), e que HJ-diol é ainda substrato para uma terceira enzima descrita em *Manduca sexta*, JH-diol kinase (JHDK), que o

converte em HJ-diol-fosfato, este, com certeza, composto inativo (Maxwell et al., 2002a; 2002b).

Como até hoje não foi observado armazenamento deste hormônio, os níveis de HJ na hemolinfa estão intimamente relacionados ao controle de sua síntese e degradação.

Já o pró-hormônio ecdisona é produzido, pelas glândulas protorácicas, localizadas no complexo retrocerebral sob influência do PTH (Rachinsky, 1994; Paulino-Simões et al., 1997), tornando-se ativa na hemolinfa e nos tecidos alvos; a forma mais frequente encontrada nos insetos é 20-hidroxiecdisona (20E) (Nijhout, 1994).

A ecdisona possui um receptor específico (EcR), pertencente à família de receptores nucleares, o qual está amplamente distribuído pelo organismo, em embriões, e em vários tecidos pré-pupais como discos imaginais, corpo gorduroso, traquéia, glândulas salivares, sistema nervoso central, intestino e células associadas com estruturas cuticulares (Koelle et al., 1991).

Em *A. mellifera*, este receptor forma um heterodímero com a proteína codificada pelo gene *ultraspiracle* (USP), o homólogo do receptor ácido retinóico em vertebrados, o qual se liga a ecdisteróides e a elementos de resposta a ecdisteróides (EcRs) (Yao et al., 1992, 1993; Patrick et al., 2001; Palli et al., 2005).

O aumento de expressão do gene *EcR* é induzido pela ecdisona, que através de um circuito auto-regulatório, regula os níveis de EcR, em *Drosophila* (Grebe et al., 2003; Lezzi et al., 2002). E em *A. mellifera*, foi observado que o aumento da expressão do gene *usp* é induzido pelos títulos de HJ, sugerindo USP como um possível ligante desse hormônio (Barchuk et al., 2004).

1.3 Genes envolvidos na diferenciação de castas

Até o momento não foram descritos genes específicos de castas, mas, genes diferencialmente expressos nas castas têm sido resultados de pesquisas recentes (Barchuk et al. 2007, Cristino et al. 2006); entre eles estão os genes responsáveis pela diferenciação morfológica e genes ligados ao metabolismo.

Considerando o desenvolvimento de caracteres morfológicos, foram detectados em *A. mellifera* genes diferencialmente expressos nas castas e que participam dos processos de diferenciação de diversos órgãos, tais como, corbícula, aparelho

reprodutor, sistema nervoso e glândula de cera e de Nasanov, entre outros (Barchuk et al. 2007).

Já em relação aos genes ligados aos processos fisiometabólicos diferencialmente expressos nas castas, um maior número foi encontrado nas rainhas. Estes genes estão relacionados com alterações no tamanho e com o crescimento do corpo em geral ou de órgãos específicos, por exemplo, os ovários.

Os dados existentes demonstram que o tamanho final do corpo alcançado depende do diálogo entre inúmeras vias de sinalização, onde o hormônio juvenil é o responsável pela duração do processo e os ecdisteróides pela taxa de crescimento e o principal alvo é a via *insulin/insulin-like* (IIS) (revisado por Shingleton, 2005).

Através de estudos desta via feitos em *Drosophila*, sabe-se que com a nutrição há produção de três tipos de “insulin-like peptides” (ILPs) pelas células neurosecretoras (mNSCs). A ligação dos ILPs com o receptor de insulina (InR) ativa a cascata de sinalização IIS, resultando em ativação da transcrição e tradução gênica e o crescimento do organismo (Mirth & Riddiford, 2007). A figura 2 mostra toda a via IIS.

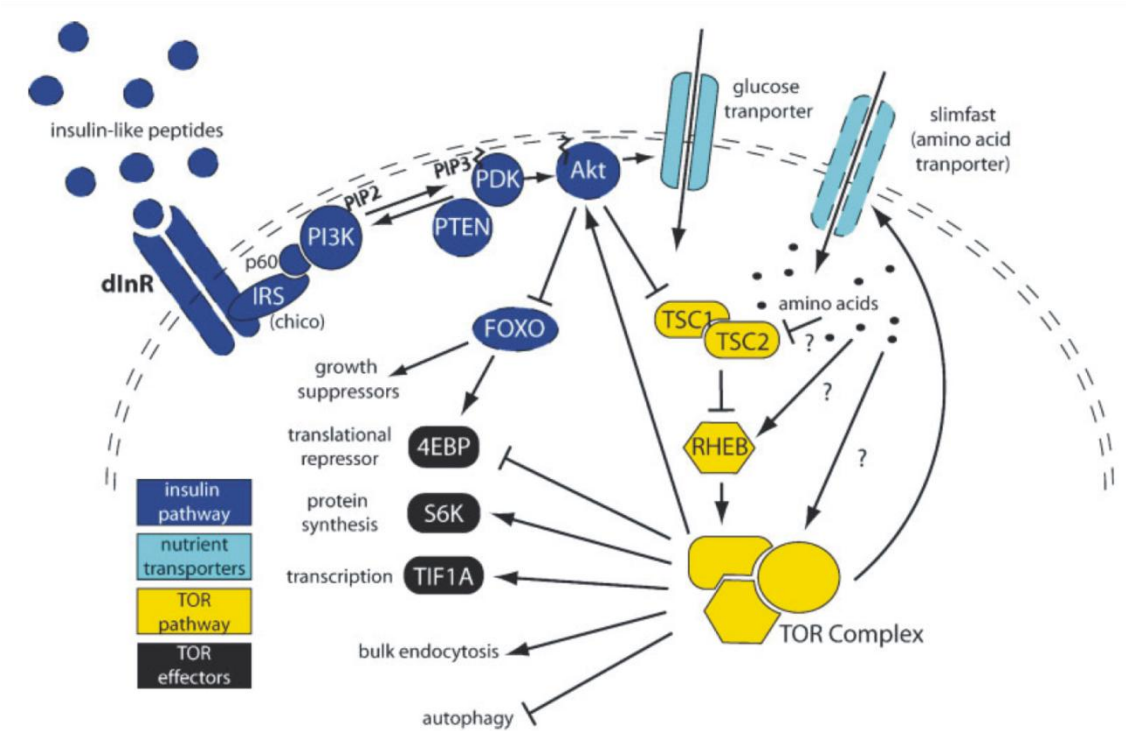


FIGURA 2: Via de sinalização *insulin/insulin-like* (IIS) e TOR. Fonte: Mirth & Riddiford, 2007.

Além disso, foi visto que a nutrição também atua no corpo gorduroso (*Fat body*), provavelmente por meio da via de TOR, produzindo fatores de crescimento ainda não definidos, que podem potencializar a cascata IIS. Acredita-se ainda, que a ecdisona tenha atividade inibitória destes fatores do corpo gorduroso (revisado por Edgar, 2006) (Figura 3).

A via IIS controla o crescimento do animal através de um mecanismo de retroalimentação negativa, no qual os hormônios morfogenéticos (ecdisteróides e HJ) parecem estar envolvidos. Os ILPs atuam também nas células das glândulas protorácicas (GP), as quais produzem o pró-hormônio ecdisona, que, mais tarde, se torna ativo (20E). Foi visto que 20E, quando ligada a seu receptor EcR, antagoniza a sinalização de *ilp*. Isso causa uma supressão no crescimento celular, e pode também eventualmente, finalizar a fase de alimentação e fazer o organismo entrar na metamorfose (revisado por Edgar, 2006) (Figura 3).

O HJ, produzido pelo CA, participa de outro processo de retroalimentação negativa, inibindo a liberação de PTTH, o que suprime, então, a produção de 20E. Contudo, quando o crescimento do animal atinge seu peso crítico, JHE, entra em atividade, degradando o HJ, e a ecdisona volta a ser produzida.

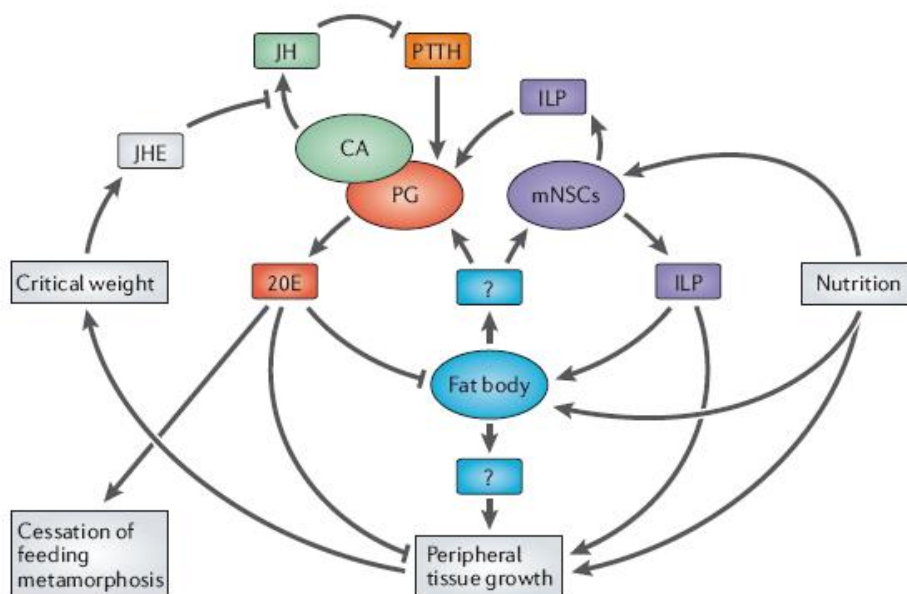


FIGURA 3: Comunicação endócrina entre os órgãos envolvidos no controle do crescimento. Fonte: Edgar, 2006.

1.4 Epigenética

Estudos recentes têm demonstrado que a alimentação diferencial oferecida às larvas pode modificar o programa de metilação e acetilação de suas histonas (epigenética), dando origem a organismos diferentes, por exemplo, as castas em *A. mellifera*, possuem enzimas como citosina-5-transferases (DnMTs), deacetilases de histonas (HDAs) e proteínas metil ligantes diferencialmente expressas (Kucharski et al., 2008).

Kucharski et al. (2008) mostraram que rainhas e operárias têm diferentes programas de metilação. Ao silenciarem o gene *dnmt-3* em larvas jovens de *A. mellifera* que receberam uma alimentação de operárias observaram fêmeas com ovários desenvolvidos, um fenótipo típico de rainhas.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi investigar o efeito da dieta no processo de determinação de castas em abelhas da espécie *Scaptotrigona* aff. *depilis*, quanto a características morfológicas, níveis de HJ e expressão de genes específicos.

2.1 Objetivos específicos

- Produzir *in vitro* rainhas e operárias de *S. aff. depilis* utilizando diferentes quantidades de alimento;
- Analisar parâmetros morfológicos de rainhas e operárias produzidas *in vitro*, como peso, área corpórea e medidas morfométricas do tórax e da cabeça;
- Analisar a presença de estruturas morfológicas específicas de rainhas e operárias entre abelhas alimentadas com diferentes dietas;
- Observar o comportamento das rainhas produzidas *in vitro*;
- Quantificar os títulos de hormônio juvenil na hemolinfa de rainhas e operárias produzidas *in vitro*;
- Quantificar os níveis de mRNA de genes relacionados à via de síntese (*mfe* e *hmgr*) e de degradação do HJ (*jhe* e *jheh*) em rainhas e operárias produzidas *in vitro*;
- Quantificar os níveis de transcritos de importantes receptores nucleares do desenvolvimento de insetos (*EcR* e *usp*) em rainhas e operárias produzidas *in vitro*;
- Quantificar os níveis de mRNA de um gene envolvido no processo de metilação (*dnmt3*) nas rainhas e operárias produzidas *in vitro*;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Este estudo foi realizado utilizando-se larvas de *Scaptotrigona* aff. *depilis* criadas *in vitro*, de acordo com a técnica desenvolvida por Camargo (1972a) e que está sendo aprimorada com bastante sucesso por Menezes (*in prep.*). Esta técnica consiste em retirar o alimento larval das células de cria naturais e colocá-lo em células de cria artificiais; que no caso, foram utilizados os poços de placas de acrílico (Figura 4). Depois, transferir as larvas (recém eclodidas), colocando uma por poço, em cima do alimento. A temperatura é mantida por volta de 28°C e a umidade alta no começo dos estágios larvais e depois, 75%, quando as larvas já acabaram de se alimentar.

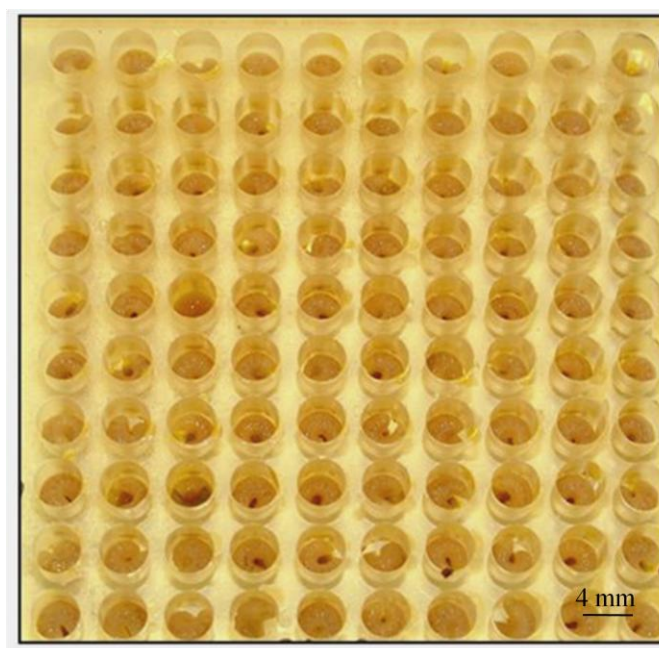


FIGURA 4: Foto da placa de acrílico com 100 poços servindo de células de cria artificiais para criação de abelhas *in vitro* de *Scaptotrigona* aff. *depilis*.

Os ovos, assim como o alimento larval, foram retirados de uma única colônia forte de *S. aff. depilis*, mantida em caixa racional no meliponário do bloco da Ecologia, do Departamento de Biologia da FFCLRP; optou-se por retirar o material biológico apenas de uma colônia para diminuir ao máximo as possíveis variações intra-específicas.

Com esta técnica, o volume de alimento que é disponibilizado às larvas pode ser quantificado e controlado, como fez Camargo (1972a, b). Foram mantidos dois grupos experimentais: um com células de cria contendo 32µl de alimento larval, cada uma medindo 4mm de diâmetro, e outro com 130µl, medindo 7mm de diâmetro. Estes volumes, 32 e 130µl, foram escolhidos por serem as médias encontradas nas células de

cria naturais de operárias e rainhas nesta espécie, respectivamente (Menezes, comun. pessoal). As condições de temperatura e umidade foram mantidas iguais para ambos os grupos.

Foram escolhidos quatro estágios de desenvolvimento para nossas análises, larvas antes do final da fase de alimentação até a fase de pré-pupa. O primeiro deles foi quando havia alimento apenas no fundo das células de cria, estágio chamado de alimento sólido (AS), pois o alimento encontrava-se em sua forma mais densa. O outro estágio coletado foi aquele em que as larvas já tinham terminado de se alimentar, mas ainda não tinham começado a defecar, larvas pré-defecantes (LPD). Coletamos também larvas defecantes (LD), em que já era possível observar defecação nas células de cria; o último estágio coletado foi pré-pupa (PP). A caracterização dos estágios analisados encontra-se na tabela I. Além disso, foram mantidas larvas até o final do desenvolvimento, para as análises após a emergência das abelhas produzidas *in vitro*.

TABELA I: Caracterização dos estágios em que as larvas de *Scaptotrigona aff. depilis* foram coletadas.

Sigla	Estágio	Característica
AS	Alimento Sólido	Final da fase de alimentação (com alimento sólido no fundo da célula de cria)
LPD	Larvas Pré-Defecantes	Sem alimentação e antes da defecação
LD	Larvas Defecantes	Sem alimentação e defecante
PP	Pré-Pupas	Depois da tecelagem do casulo e antes da pupação

Além de análises por estágio do desenvolvimento, algumas medidas, como o peso e a área do corpo, foram analisadas também por idade das larvas, independentes do estágio em que se encontravam. Para isso, quando coletávamos larvas do grupo do grupo que recebeu 32µl de alimento larval em algum dos quatro estágios descritos acima, também coletávamos larvas do grupo de 130µl, mesmo que estas não estivessem no mesmo estágio que as do primeiro grupo.

3.2 Medidas

Assim que as larvas atingiram um dos estágios de nosso interesse, elas foram retiradas das células de cria artificiais e pesadas em uma balança de precisão. Também foram capturadas imagens por meio de uma câmera fotográfica acoplada a um

estereomicroscópio, e através delas, foi possível medir a área do corpo de cada larva nos quatro estágios analisados.

Para distinção entre machos, rainhas e operárias utilizamos alguns caracteres morfológicos, tais como: tamanho das cabeças, dos olhos compostos, número de segmentos antenais, forma do clípeo (Camargo et al., 1967), os quais podem ser visualizados já em pupas de olhos pigmentados, sem que seja necessária sua retirada das células de cria.

Das abelhas adultas criadas *in vitro*, foram feitas oito medidas morfométricas: comprimento do escutelo, comprimento e largura (intertégulas) do escuto, largura entre os olhos, comprimento da cabeça (do ocelo mediano até começo do clípeo), largura máxima da cabeça, largura máxima e comprimento do olho (Figura 5), além do peso medido em balança de precisão. Para efeito comparativo fizemos as mesmas medidas em abelhas criadas naturalmente.

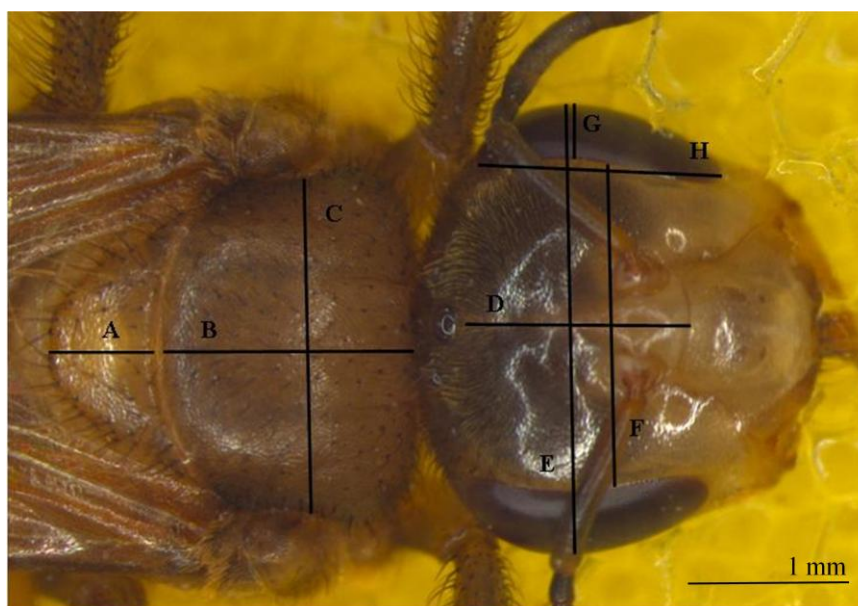


FIGURA 5: Medidas morfométricas feitas em abelhas de *Scaptotrigona* aff. *depilis*. **A)** comprimento do escutelo; **B)** comprimento do escuto; **C)** largura do escuto; **D)** comprimento da cabeça; **E)** largura máxima da cabeça; **F)** largura entre os olhos; **G)** largura máxima do olho e **H)** comprimento do olho.

Algumas das rainhas nascidas foram colocadas em mini-colônias, compostas por alguns favos, algumas operárias que trabalham nos favos e forrageiras. Semanalmente era fornecido alimento extra para elas (xarope e pólen). As rainhas foram marcadas com tinta acrílica não-tóxica no tórax e as colônias foram fechadas com vidros, a fim de podermos observar o comportamento.

3.3 Quantificação do hormônio juvenil (HJ) por Radioimunoensaio

Essa etapa do trabalho foi realizada no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com ajuda do prof. Dr. Klaus Hartfelder.

O método de extração de HJ a partir de hemolinfa foi baseado no protocolo descrito por Huang et al. (1994), sendo feito em três etapas: (1) extração do HJ, (2) ligação entre anticorpo e HJ e (3) preparo das amostras para cintilação.

(1) Extração do HJ: As amostras contendo 2µl de hemolinfa em 500µl de acetonitrila foram colocadas em tubos de vidro de 1 ml, misturadas e centrifugadas a 7500 rpm por 3 minutos a 4°C. Após, centrifugação, o sobrenadante foi transferido para tubos de extração (tubos de 5 ml), aos quais foram também adicionados 1 ml de NaCl 0,9% e 1 ml de hexano. Esta mistura foi cuidadosamente agitada e mantida em gelo por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (750 rpm) a 4°C por 5 minutos e tiveram o sobrenadante (fase hexano – fase contendo o HJ) cuidadosamente transferido, com auxílio de uma pipeta *Pasteur*, para um novo tubo de extração. O passo de extração foi repetido por mais duas vezes, perfazendo um total de 3 ml de hexano no final do procedimento. O volume de hexano foi evaporado utilizando-se centrifugação a vácuo (*SpeedVac*), por aproximadamente 15 minutos. O *pellet* foi redissolvido em 100µl de tolueno.

(2) Reação entre anticorpo e HJ: Para a construção da curva padrão, foram separados 0, 5, 1, 2, 5, 10, 50 e 100 µl de solução de HJ-III (100ng/ml de metanol) em tubos de 1 ml, utilizando-se uma seringa *Hamilton* (1-50 µl). Os tubos das amostras e os da curva padrão foram centrifugados a vácuo para a remoção do solvente, por, aproximadamente, 20 minutos. Em seguida, foram acrescentados 50 µl de solução *Tracer* (solução de 3H-HJ-III com atividade de 6500 cpm por 50 µl de tampão fosfato 0,1 M, pH 7.2 e 0,02% azida sódica) em todos os tubos. Após agitação, acrescentou-se em todos os tubos, exceto no controle zero da curva padrão, 200 µl de soro anti-HJ-III específico, produzido em coelhos. Ao controle zero da curva padrão acrescentou-se 200µl de soro controle (10% de soro de coelho não-imunizado em tampão fosfato). Todos os tubos foram agitados vigorosamente e mantidos a 4°C por 16 horas.

(3) Preparo das amostras para cintilação: Após este período, foram adicionados às amostras 250 µl de solução saturada de sulfato de amônia (para a precipitação das proteínas), que em seguida foram novamente agitados, deixados a 4°C por 30 minutos e centrifugados a 7500 rpm por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados.

Aos precipitados foram adicionados 500 µl de solução de sulfato de amônia 50%. Após agitação e permanência a 4°C por mais 30 minutos, os tubos foram novamente centrifugados por 15 minutos a 7500 rpm, descartando-se em seguida o sobrenadante. Os precipitados foram ressuspensos em 40 µl de água bidestilada estéril. Após agitação, estas amostras foram transferidas para frascos especiais para cintilação líquida; os tubos que continham os precipitados foram novamente lavados com mais 40µl de água e este volume foi transferido, em seguida, para os respectivos frascos. A estes frascos foram acrescentados 5 ml de líquido de cintilação (90 mg de POPOP, 3,6 g de PPO, 300 ml de Triton X-100 e 600 µl de tolueno), e após agitação procedeu-se a quantificação do HJ-III em espectrômetro de cintilação líquida (Multi-Purpose Scintillation Counter/LS 6500 Beckman – USA).

3.4 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi obtido do corpo todo de cada larva colocado em 1 ml do reagente TRIzol, Invitrogen (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento de RNA total, Invitrogen). O protocolo de extração segue os procedimentos recomendados pelo fabricante. O RNA obtido foi ressuspensado em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1%. A quantidade de RNA total foi avaliada por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000). Para estimar a concentração do RNA, considera-se que uma unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 40 µg/ml de RNA (Sambrook et al., 1989). As amostras foram estocadas em freezer a – 80°C.

Anteriormente à síntese do cDNA, o RNA foi tratado com DNase (*RQ1 Rnase-Free Dnase*, Promega) por 30 minutos a 37°C e, em seguida, foi adicionado *Stop Solution* a 65°C por 10 minutos, para a inativação da enzima. A síntese de cDNA foi feita utilizando-se 2 µg de RNA total e sistema de síntese Superscript II (Invitrogen) e *Oligo (dT)₁₂₋₁₈* (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante.

3.5 Amplificações por PCR (Polymerase Chain Reaction)

Para as amplificações dos fragmentos dos genes de interesse era preparada para cada amostra uma reação contendo: 10µl de Master Mix (2X; Promega); 7,4µl de água Milli-Q autoclavada; 0,8µl de cada *primer* (*forward* e *reverse*; 10µM) e 1µl de cDNA e a submetia ao termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) nas seguintes condições: 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura de *Melting* (especificada para cada *primer* na tabela II) por 30 segundos,

72°C por 30 segundos (para *amplicons* até 500pb) ou 45 segundos (para *amplicons* até 750pb)) e extensão final de 72°C por 7 minutos. O tamanho do *amplicon* de cada *primer* está mostrado na tabela II.

Para verificar o resultado das ampliações ao final de todos os ciclos, a reação foi aplicada no gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo (EtBr), onde os fragmentos de DNA se separam por eletroforese.

3.6 Genes estudados

Elegemos sete genes, com funções importantes no metabolismo dos insetos, para serem investigados quanto ao envolvimento no processo de determinação de castas da espécie estudada. Escolhemos genes que codificam enzimas envolvidas no processo de síntese e degradação do HJ, dois receptores nucleares importantes e um gene codificador de uma enzima envolvida no processo de metilação (Tabela II).

TABELA II: Genes estudados, símbolo utilizado neste trabalho, número de acesso no GenBank e sua função no metabolismo dos insetos.

Gene	Símbolo	Nº acesso	Função
Epóxido hidrolase do hormônio juvenil	<i>jheh</i>	GB10771	Enzima de degradação do HJ
Esterase do hormônio juvenil	<i>jhe</i>	GB15327	Enzima de degradação do HJ
<i>Ultraspiracle</i>	<i>usp</i>	GB16648	Possível ligante do HJ; Forma heterodímero com ecdisona e seu receptor
Receptor de ecdisona	<i>EcR</i>	GB15434	Receptor de ecdisona
DNA citosina-5-metil transferase	<i>dnmt-3</i>	XM_394274	Enzima envolvida no processo de metilação do DNA
Metil farnesoato epoxidase	<i>mfe</i>	GB15634	Enzima atuante no último passo da cascata de síntese do HJ
3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase	<i>hmgr</i>	BI503396	Enzima pertencente à cascata de síntese do HJ

3.7 Clonagem e sequenciamento

Para amplificação do primeiro fragmento do gene *jhe* foi utilizado *primers* específicos de *A. mellifera*; para o gene *jheh*, foi utilizado um par de *primers* degenerados, desenhados a partir do consenso de quatro sequências de insetos depositadas no GenBank: *Bombyx mori* (AY377854), *Drosophila melanogaster* (NM176233), *Ctenocephalides felis* (AF503908) e *Aedes aegypti* (AY212033). Para o gene *dnmt-3*, que codifica a enzima DNA citosina-5-metil transferase, um par de *primers* (DnMT-3) foi desenhado numa região conservada, após o alinhamento feito entre as sequências preditas a partir dos genomas de *Nasonia vitripennis* e *A. mellifera* (Tabela III).

TABELA III: Nome e sequência dos *primers* utilizados para os sequenciamentos, tamanho dos seus respectivos *amplicons*, em pares de bases (pb) e sua temperatura de *Melting*, em graus Celsius (°C).

<i>Primer</i>	<i>Primer forward (5' - 3')</i>	<i>Primer reverse (5' - 3')</i>	Tam. <i>Amplicon</i> (pb)	Tm (°C)
JHEHdeg	TNCANGSNGGNGAYTGGGG	GTRTCNGGYTTNGTNGCYTG	300	Touch-Down 45-40
JHE	GCTTTTCAATTAGGTAGTGG	GAATGGATTATAATAGAATCG	150	58
DnMT-3	CAATGGATCATGTGGTACGG	CGGTGCAATAAAAAGCATTTGG	563	55

Os fragmentos obtidos nos géis de agarose após as amplificações por PCR foram recortados e purificados utilizando o Kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN), seguindo orientações do fabricante, sendo em seguida inseridos em plasmídeo comercial (*pGEM T-easy vector*, Promega), de acordo com o protocolo do produto.

Os plasmídeos, já com o inserto, foram utilizados para transformar uma linhagem de bactéria *Escherichia coli* DH5 α , previamente preparada para transformação química. Após transformação, as células foram plaqueadas em meio *Luria Berthani* (LB) ágar (1,5%), contendo Ampicilina (USB; 200mg/ml), X-Gal (5-Bromochloro-3 indolyl-B-D-Galactoside – USB; 50mg/ml) e IPTG (isopropylthio-B-D-galactoside – Invitrogen; 200mg/ml) e, em seguida, incubadas a 37°C por 16 horas. As colônias de bactérias, contendo os clones positivos, foram inoculadas em meio LB líquido com Ampicilina (200mg/ml). Os plasmídeos foram, então, purificados utilizando-se o Kit

Miniprep QuickLyse (Qiagen). A presença do inserto foi verificada por digestão do DNA plasmidial com a enzima EcoRI.

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando reagente DNA Sequencing Kit, *BigDye Terminator v 3.0 Cycle sequencing Ready Reaction* – ABI PRISM (Applied Biosystem) e *primers* universais M13 F (5'-CGACGTTGTAAAACGGCCAGT-3') e M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). O sequenciamento foi feito pelo método de Sanger et al. (1977), usando o sequenciador ABI PRISM 310.

Um *contig* para cada fragmento sequenciado foi obtido com o uso do programa *Sequencher* 4.8. Em seguida, foi realizada uma busca em banco de dados utilizando o programa Blast disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> para confirmação da sequência obtida.

3.8 Quantificação dos níveis de transcritos - RT-PCR semiquantitativa

Para as análises de expressão do gene *dnmt-3* foi utilizado o *primer* DNMT'-3, específico para *S. aff depilis* (DNMT'-3); para os genes *mfe*, *hmgr*, *usp* e *EcR* foram utilizados *primers* baseados na sequência de *A. mellifera*, respectivamente nomeados MFE, HMGR, USP e ECR. Finalmente, a quantificação dos níveis de transcritos de *jhe* e *jheh*, foi feita utilizando os seguintes *primers*: JHE' e JHEH', baseados na sequência de *Schwarziana quadripunctata* (Tabela IV).

TABELA IV: Nome e sequência dos *primers* utilizados para a quantificação dos níveis dos transcritos, tamanho dos seus respectivos *amplicons*, em pares de bases (pb) e sua temperatura de *Melting*, em graus Celsius (°C).

<i>Primer</i>	<i>Primer forward (5' - 3')</i>	<i>Primer reverse (5' - 3')</i>	Tam. Amplicon (pb)	T_m (°C)
DNMT ³ -3	GATTATTGCTCCCGTCTAGG	CCGAAGAGAAACATACAGGG	398	60
MFE	GGAATCATTCTTGGCGGAGA	GTTATGCGCGCTATGGAAAT	145	60
HMGR	CCTGCACAGAATGTTGGAAG	GTGCAGGAAGAATAGTTCCG	178	60
USP	CACCCTCTCTCCGGAAG	TTAGCTACTAGTGCTCTCAAC	300	54
EcR	GCAGGCTTCAGCGACGGGTGCGACG	AGCTGGGTGTTAGTTCATCGTTGTACTGTTTCG	300	58
JHE ¹	GGATCGTGACGTCGTACTIONT	CACCCAATTTCTTGGCTTTC	329	60
JHEH ¹	GACTGGGGAGCTCTTATT	GCTTGTATGTGAAAGTAGC	230	54

A quantificação dos níveis de mRNA foi feita utilizando a técnica RT-PCR semiquantitativa (SqRT-PCR) para todos os genes estudados. Para a realização desta técnica é necessário haver uma padronização, que consiste em determinar o número ideal de ciclos de amplificação para cada gene. Para isso, foram retiradas amostras sequenciais durante a reação de PCR, e aplicadas no gel de agarose 1% em tampão 1xTBE (89mM Tris base; 89mM ácido bórico; 2mM EDTA; pH 8,0), corado com uma solução de EtBr (0,5µg/ml de gel) e fotografados, para que visualmente pudesse ser constatado o número de ciclos em que houve a saturação da reação, ou seja, a partir do qual não há mais diferença com as bandas consecutivas. O DNA utilizado como molde para ser amplificado foi um *pool* preparado com 2µl de cada das bibliotecas de cDNA feitas a partir da extração do RNA das larvas de *S. aff. depilis* coletadas.

Depois disso, uma mistura de 10µl de Master Mix (2X; Promega); 7,4µl de água *Milli-Q* autoclavada; 0,8µl de cada *primer* (*forward* e *reverse*; 10µM) e 1µl de cDNA, das 32 amostras selecionadas.

Ao final da reação, as amostras foram aplicadas no gel de agarose 1% em tampão 1xTBE (89mM Tris base; 89mM ácido bórico; 2mM EDTA; pH 8,0), corado com uma solução de EtBr (0,5µg/ml de gel) e imagens foram capturadas, a partir das quais foi possível fazer densitometria das bandas obtidas, pelo programa Kodak 1D 3.6.

Para esta técnica também é necessário que o mesmo estudo feito para os genes de interesse, também seja feito com um gene que tenha proporções de seus níveis de mRNA relativamente constantes durante todo o desenvolvimento, para que depois, ele possa servir como normalizador. No nosso caso, utilizamos o gene *rp49* e *primers* específicos para *A. mellifera*, cujas sequências *forward* e *reverse* são, respectivamente, CGTCATATGTTGCCAACTGGT e TTGAGCACGTTCAACAATGG.

O valor densitométrico do produto da reação de cada gene visualizado no gel foi dividido pelos de *rp49* correspondente a mesma amostra. O maior número obtido por esta divisão foi atribuído valor 1 e os restantes sendo proporcionais a ele.

3.9 Estatística

Todos os testes estatísticos dessa dissertação foram feitos com auxílio do pacote *Statistica* 6.0 (Statsoft, inc).

Para comparar os dados obtidos na quantificação dos transcritos em cada estágio do desenvolvimento (AS, LPD, LD e PP) entre os dois grupos de alimentação (32 e 130µl) foram feitos teste t, para dados paramétricos e Mann-Whitney, para não-paramétricos. Para comparar os estágios ou idades dentro de um mesmo grupo de alimentação foram utilizados Kruskal-Wallis ANOVA ou *One Way* ANOVA, de acordo com a distribuição dos dados.

A análise estatística multivariada foi utilizada para comparar os grupos experimentais a partir das medidas morfométricas dos indivíduos criados naturalmente e aqueles criados *in vitro*. A análise dos componentes principais (PCA) foi utilizada para caracterizar as variáveis morfométricas de maior projeção, e, posteriormente, realizou-se análise discriminante *stepwise* para se contrastar o perfil morfométrico dos grupos. Para todas as análises, foram considerados significativos os valores de probabilidade menores que 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Desenvolvimentos das larvas

O tempo necessário para que as larvas atingissem os estágios analisados (AS, LPD, LD e PP) foi diferente, de acordo com a dieta. As larvas alimentadas com 130µl de alimento tiveram seus desenvolvimentos mais prolongados se comparado com as que comeram 32µl, na espécie estudada, *Scaptotrigona aff. depilis*. Apesar do tempo gasto para atingir cada estágio do desenvolvimento ter variado entre estes dois grupos de alimentação, como mostra a tabela V, testes estatísticos mostraram que a variação entre eles não foi significativa ($p=0,222$).

TABELA V: Tempo necessário, em dias, para que as larvas criadas *in vitro* de *Scaptotrigona aff. depilis* com diferentes volumes de alimento (32µl e 130µl) atingissem os respectivos estágios analisados: alimento sólido (AS), larvas pré-defecantes (LPD), larvas defecantes (LD), pré-pupas (PP).

Estágio	Número de dias	
	32 µl	130 µl
AS	5	10
LPD	7	15
LD	10	15
PP	18	18

Observamos que larvas que receberam maior quantidade de alimento, em geral, não consumiam todo o volume de alimento disponível (130µl), ou seja, mesmo restando um pouco de alimento, elas encerravam a fase de alimentação e entravam no estágio LPD. O volume de alimento restante foi muito pequeno, e não foi mensurado.

As LPD e LD do grupo com mais alimento larval foram coletadas no mesmo dia, ou seja, depois de 15 dias da transferência. Isso ocorreu porque dentro de um mesmo grupo houve variações no tempo de desenvolvimento entre as larvas, assim, na mesma placa podíamos encontrar larvas em diferentes estágios.

As pré-pupas do grupo que recebeu 32µl foram coletadas no mesmo dia que as do grupo que recebeu 130µl, apesar de terem atingido este estágio primeiro. Por isso, consideramos que, apesar de terem a mesma idade, elas estão em estágio de pré-pupa mais avançado, na verdade seguindo o programa de operárias naturais.

4.2 Razão sexual

A mortalidade encontrada na placa que continha 32 μ l de alimento disponível às larvas foi de 30%. Depois da coleta para os estudos moleculares, restaram ainda 56 larvas, que se desenvolveram até a emergência, das quais 27 nasceram operárias (48,21%), 18 machos (32,14%) e, 11 rainhas (19,64%), que por serem menores que as da outra placa, foram chamadas de rainhas miniaturas; considerando apenas as fêmeas, elas representaram 29%. A figura 6 mostra estes indivíduos identificados, além de células de cria artificiais vazias (que antes eram ocupadas pelas larvas já coletadas) e outras (3) em que as pupas estão viradas de cabeça para baixo, e por isso, nesta fase, não foram identificados quanto a casta ou sexo.

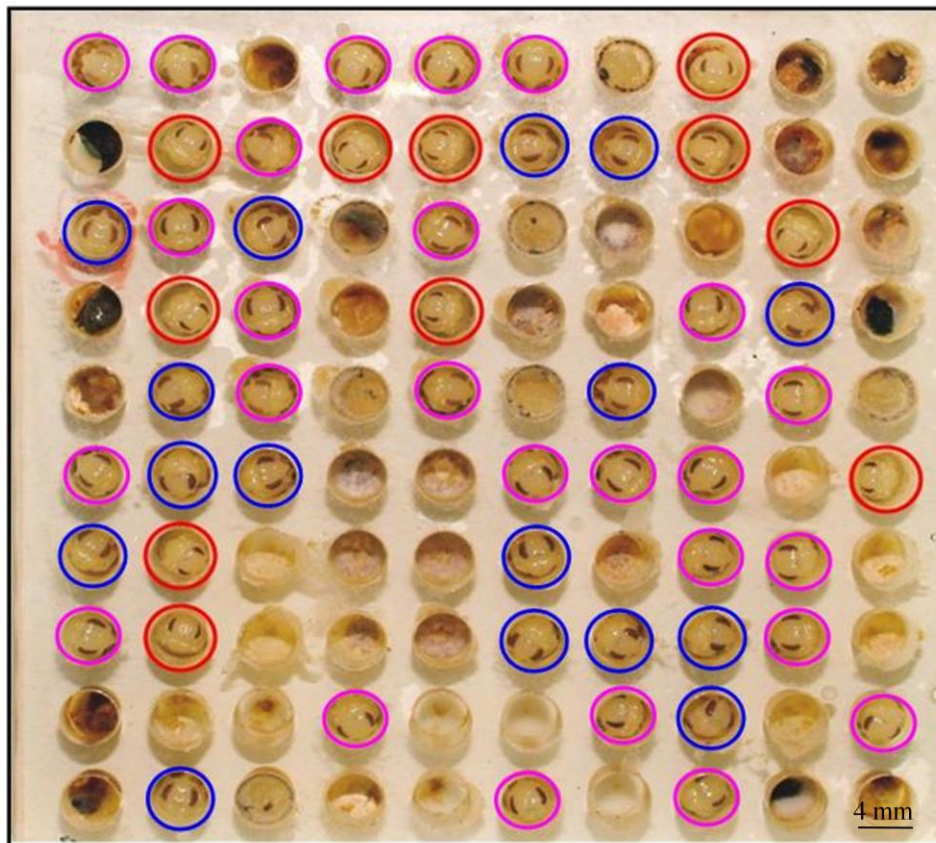


FIGURA 6: Foto da placa de acrílico, com poços contendo pupas de *Scaptotrigona* aff. *depilis*, as quais consumiram 32 μ l de alimento larval durante o desenvolvimento. Indivíduos circulosados em rosa são operárias (26), os circulosados em azul são machos (16), e em vermelho, rainhas (11). As células de cria artificiais que não foram circulosadas estão vazias ou possuem indivíduos de difícil identificação, os quais 2 eram machos e 1, operária.

Não foi verificada produção natural de rainhas miniaturas nos favos de cria coletados da mesma colônia usada na criação *in vitro*; das 1044 células de cria abertas contendo pupas na mesma fase, 1020 eram operárias e 24, machos.

As larvas que receberam 130µl de alimento apresentaram mortalidade bem maior: 75,7%. Destas placas emergiram 15 rainhas, 2 machos gigantes e nenhuma operária. Assim, para facilitar a citação durante o desenvolvimento deste trabalho, nomeamos este grupo como sendo o das rainhas; a elas demos o nome de típicas, já que apresentaram tamanho parecido com o encontrado em rainhas virgens naturais da espécie estudada.

4.3 Morfologia interna (ovários) das larvas alimentadas com diferentes dietas

Analisamos a morfologia dos ovários dos dois tipos de rainhas obtidas na criação *in vitro*: as miniaturas (que consumiram a mesma quantidade de alimento que as operárias e os machos) e as típicas (que ingeriram o volume médio de alimento encontrado nas células reais naturais de *S. aff. depilis*). Da mesma forma, os ovários das operárias criadas *in vitro* também foram dissecados (Figura 7).

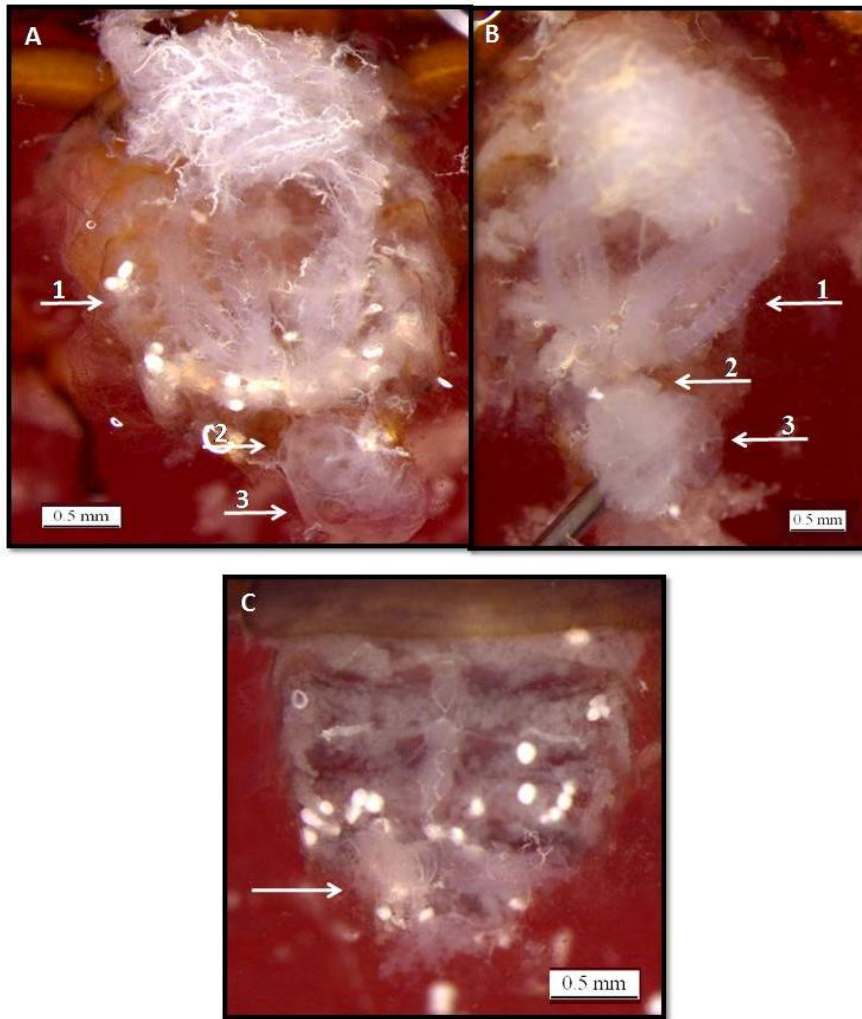


FIGURA 7: Abdomes dissecados de fêmeas criadas *in vitro* de *Scaptotrigona aff depilis* para observação dos ovários. **A)** Rainha miniatura; **B)** Rainha típica; **C)** Operária, **1)** ovários com quatro ovariolos cada um, **2)** espermateca e **3)** glândula de Dufour. Em **C**, a seta aponta o ovário de operária, sensivelmente menor que o das rainhas.

A figura 7 (A e B) mostra que não houve diferença entre os ovários das rainhas, miniaturas e típicas. Cada um contendo 4 ovariolos; além de ter sido constatada a presença da glândula de Dufour e da espermateca. Já na figura 7, C, podemos perceber que os ovários de operárias são muitos reduzidos, quase imperceptíveis; nestas não foram encontradas a glândula de Dufour e a espermateca.

4.4 Morfometria

Fizemos análise dos componentes principais (PCA) das oito medidas morfométricas realizadas tanto em fêmeas criadas artificialmente: rainhas miniaturas

(RMA), rainhas típicas (RA) e operárias (OPA), quanto nas naturais: rainhas virgens (RVN) e operárias (OPN). Foi verificado que a largura do escudo e a largura máxima da cabeça foram as duas variáveis que mais contribuíram para explicar nossos dados, e por isso, foram usadas nas análises dos componentes principais (Figura 8).

Analisando a figura 8, primeiramente vemos que o grupo RMA apresentou as medidas bem menores que as demais. Além disso, percebemos que todas as rainhas apresentam uma proporcionalidade, pelo menos em relação a estas duas medidas, mostrando que a forma entre as típicas (RA e RVN) e as miniaturas (RMA) foi mantida, diferindo apenas no tamanho. Podemos ainda observar que as operárias (OPA e OPN) formaram um grupo distinto das rainhas (RMA, RA e RVN). É interessante notar também que todos os indivíduos criados *in vitro* ficaram ligeiramente menores que os criados naturalmente.

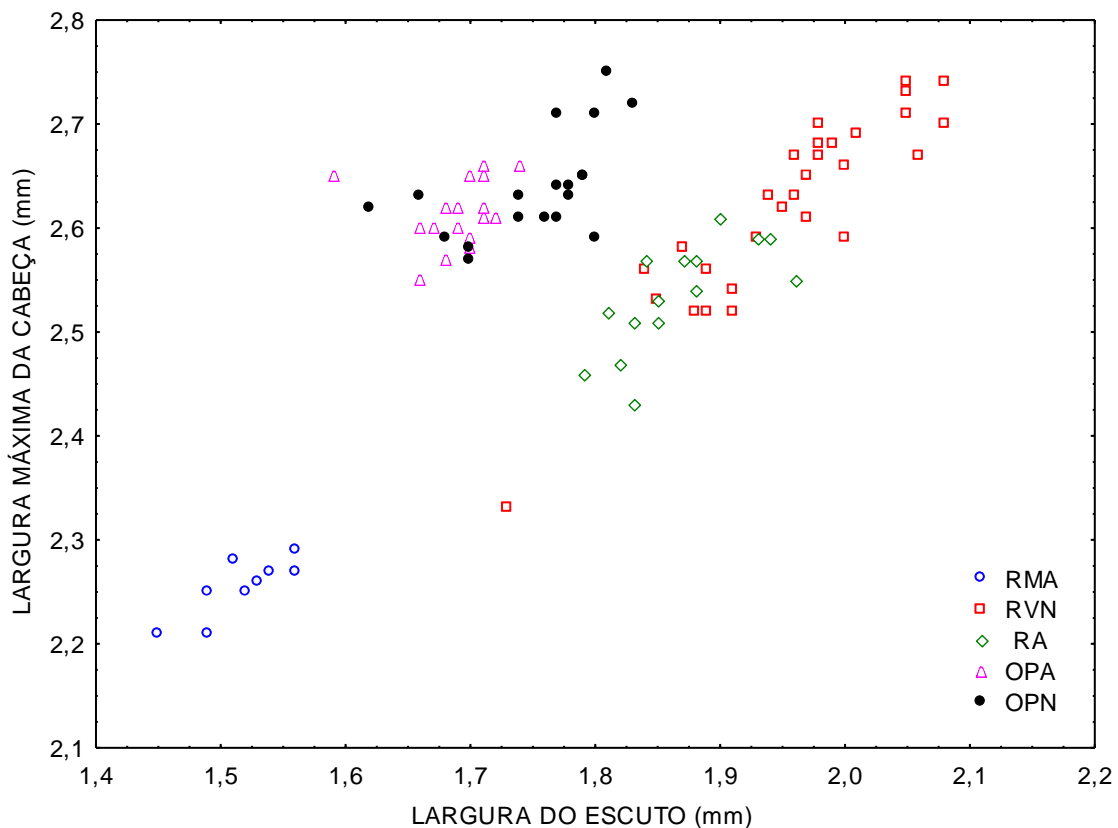


FIGURA 8: Análise dos componentes principais (PCA) entre a largura do escudo (mm) e a largura máxima da cabeça (mm) realizadas nos 5 grupos formados por fêmeas de *Scaptotrigona aff. depilis* criadas *in vitro*: rainhas miniaturas (RMA), rainhas típicas (RA) e operárias (OPA) e naturalmente: rainha virgem natural (RVN) e operária natural (OPN).

Foi feita ainda uma análise discriminante com as oito medidas morfométricas realizadas nos mesmos indivíduos, acrescentando os machos naturais (MN) e os criados artificialmente (MA) (Figura 9).

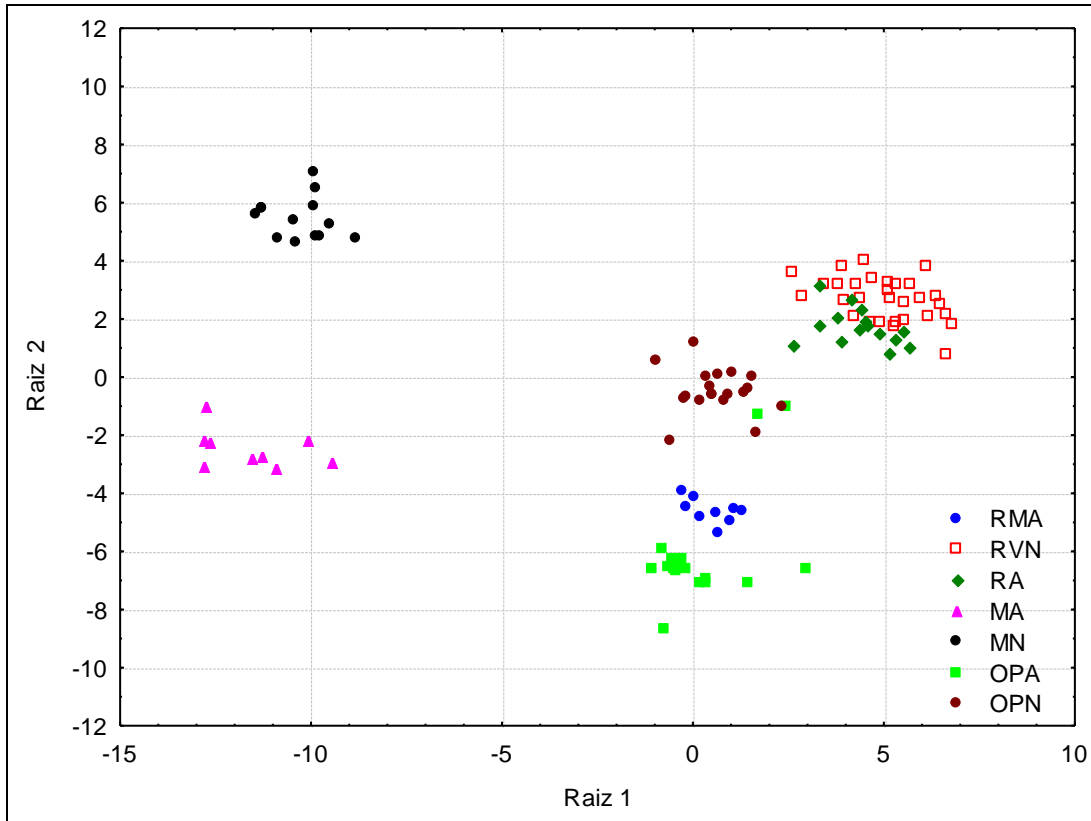


FIGURA 9: Gráfico obtido através da análise discriminante entre 7 grupos formados de abelhas da *Scaptotrigona aff. depilis* (RMA= rainha miniatura criada *in vitro*; RVN= rainha virgem natural; RA= rainha típica criada *in vitro*; MA= macho criado *in vitro*; MN= macho natural; OPA= operária criada *in vitro*; OPN= operária natural) analisando todas as oito medidas morfométricas feitas nos mesmos indivíduos.

Pela matriz de classificação, podemos dizer que todos os indivíduos foram corretamente alocados dentro dos grupos previstos, com exceção de OPA e RVN, que pode ser visualizada na tabela VI.

TABELA VI: Classificação da matriz dos indivíduos criados artificial e naturalmente (RMA= rainha miniatura criada *in vitro*; RVN= rainha virgem natural; RA= rainha típica criada *in vitro*; MA= macho criado *in vitro*; MN= macho natural; OPA= operária criada *in vitro*; OPN= operária natural). Valor esperado para distribuição ao acaso=14,3%.

Grupo Amostral	RAM	RVN	RA	MA	MN	OPA	OPN
Porcentagem de correta alocação	100%	88,9%	100%	100%	100%	86,7%	100%

As distâncias de Mahalanobis e os valores de $F_{8,98}$ das diversas combinações entre os grupos experimentais podem ser verificados na tabela VII. Para todas as combinações $p < 0,0001$.

TABELA VII: Distância de Mahalanobis e valores de $F_{8,98}$ das combinações existentes entre todos os grupos considerados na análise discriminante (RMA= rainha miniatura criada *in vitro*; RVN= rainha virgem natural; RA= rainha típica criada *in vitro* ; MA= macho criado *in vitro*; MN= macho natural; OPA= operária criada *in vitro*; OPN= operária natural).

Combinações	Distância de Mahalanobis	$F_{8,98}$
RMA x RVN	92,16	74,43
RMA x RA	67,78	44,48
RMA x MA	190,49	100,01
RMA x MN	234,54	145,52
RMA x OPA	27,15	18,64
RMA x OPN	66,90	47,67
RVN x RA	6,86	8,01
RVN x MA	315,32	254,68
RVN x MN	255,99	270,87
RVN x OPA	106,73	135,11
RVN x OPN	66,67	90,48
RA x MA	291,34	191,19
RA x MN	238,34	193,65
RA x OPA	86,31	80,24
RA x OPN	57,40	56,13
MA x MN	114,45	71,01
MA x OPA	185,37	127,26
MA x OPN	241,63	172,16
MN x OPA	247,59	212,79
MN x OPN	164,09	147,77
OPA x OPN	46,63	48,81

O menor valor de $F_{8,98}$ e a menor distância de Mahalanobis foram encontrados na combinação entre o grupo das rainhas virgens naturais (RVN) e as rainhas típicas criadas *in vitro* (RA), mostrando que os perfis desses dois grupos são muito próximos.

4.5 Comportamento

Foram montadas mini-colônias com as rainhas criadas *in vitro*, tanto as típicas quanto as miniaturas (Figura 10). Os comportamentos observados de todas elas foram tipicamente desta casta, inclusive das rainhas miniaturas. Nenhuma delas foi fecundada; mas Menezes (*in prep.*) já verificou que rainhas produzidas *in vitro* foram fecundadas.

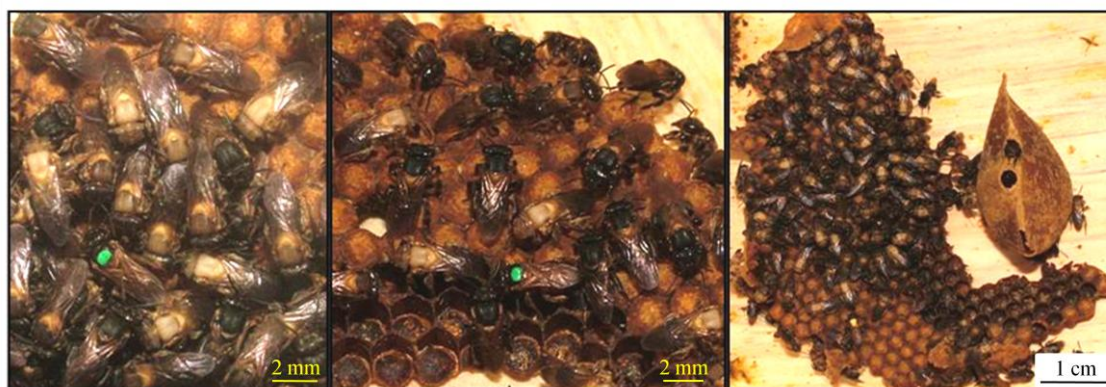


FIGURA 10: Fotos das mini-colônias montadas com as rainhas de *Scaptotrigona* aff. *depilis* nascidas *in vitro*, marcadas no tórax com tinta verde ou amarela.

4.6 Tempo de desenvolvimento

O tempo de desenvolvimento pós-embrionário foi verificado nas operárias, machos e rainhas de *S. aff. depilis*, produzidos *in vitro*. As rainhas miniaturas foram as que emergiram primeiro, seguida das operárias, machos e rainhas típicas, as quais demoraram em média 44,77 dias da eclosão do ovo até a emergência. Os machos gigantes foram os últimos a emergirem, completaram o desenvolvimento em 46 dias (Tabela VIII).

TABELA VIII: Média e seus respectivos erros padrões do tempo de desenvolvimento pós-embrionário (em dias) de operárias, machos, rainhas miniaturas e típicas de *Scaptotrigona aff. depilis* criadas *in vitro*.

Sexo/Casta	Tempo médio de desenvolvimento pós-embrionário (em dias)
Rainhas miniaturas	$38,89 \pm 0,39$
Operárias	$40,94 \pm 0,22$
Machos	$42,06 \pm 0,35$
Rainhas típicas	$44,77 \pm 0,41$
Machos Gigantes	46 ± 1

4.7 Peso das larvas

Comparando os pesos obtidos por estágios larvais do desenvolvimento entre os dois grupos de alimentação (32 e 130 μ l), encontramos diferença significativa em AS, LD e PP, como mostra a figura 11, A. Os mesmos dados também foram analisados considerando-se as idades das larvas, havendo diferença entre as de 10 e 18 dias dos dois grupos comparados (Figura 11, B).

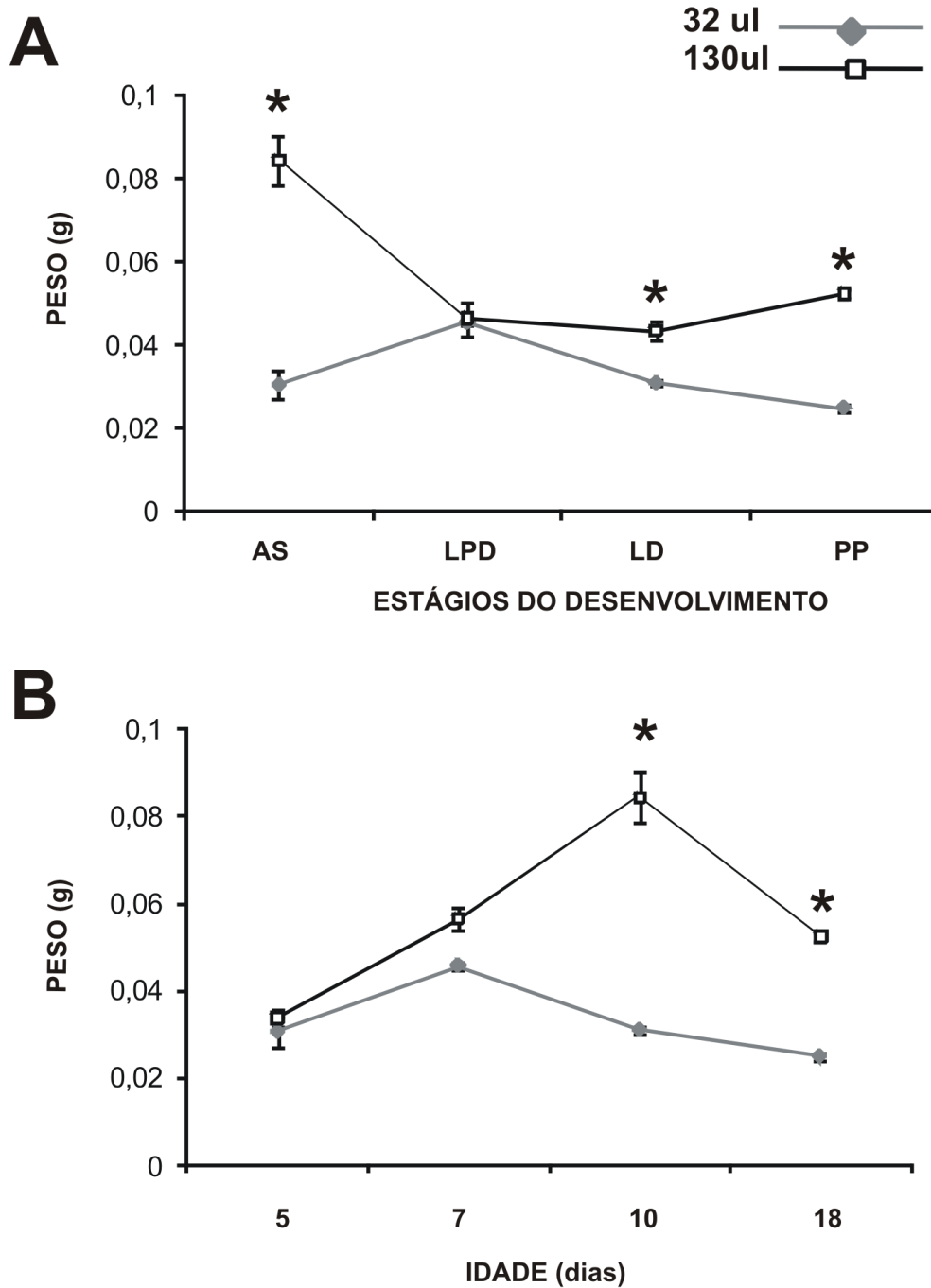


FIGURA 11: Peso, em gramas (g), dos grupos de larvas de *Scaptotrigona* aff. *depilis* de diferentes estágios do desenvolvimento que receberam volumes distintos de alimento: 32µl e 130µl. **A)** Por estágio: houve diferença significativa entre os dois grupos em AS ($p \leq 0,001$), em LD ($p = 0,002$) e em PP ($p \leq 0,001$) pelo teste t. Os estágios do desenvolvimento analisados foram: larvas em fase de alimentação com alimento sólido no fundo da célula de cria (AS), larvas pré-defecantes (LPD), larvas defecantes (LD) e pré-pupas (PP). **B)** Por idade: houve diferença entre os grupos nas larvas de 10 ($p \leq 0,001$) e 18 dias ($p \leq 0,001$) pelo teste t. *Diferença estatística significativa ($p < 0,01$).

A média do peso variou significativamente entre os estágios LPD e PP no grupo de larvas que receberam 32µl de alimento (Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn's, $p < 0,05$).

No grupo que recebeu 130 μ l, a queda na média do peso observada entre AS e LPD foi significativa (*One Way ANOVA post hoc* Holm-Sidak) e nos estágios seguintes (LD e PP) esta medida se manteve estável (Figura 11, A).

Conforme a idade das larvas, o grupo das rainhas (130 μ l) apresentou aumentos significativos de peso entre larvas de 5, 7 e 10 dias; posteriormente, elas perderam peso significativamente (*One Way ANOVA post hoc* Holm-Sidak). Já no grupo que recebeu 32 μ l de alimento, apenas as larvas de 7 com as de 18 dias diferiram significativamente (*ANOVA on Ranks post hoc* Dunn's) (Figura 11, B).

4.8 Área do corpo das larvas

Em relação às áreas corpóreas analisadas na fase larval, houve diferença significativa entre os grupos em todos os estágios do desenvolvimento (Figura 12, A). Analisando os dados por idade das larvas, só não apresentaram diferença significativa entre os dois grupos, as larvas com 5 dias de idade (Figura 12, B).

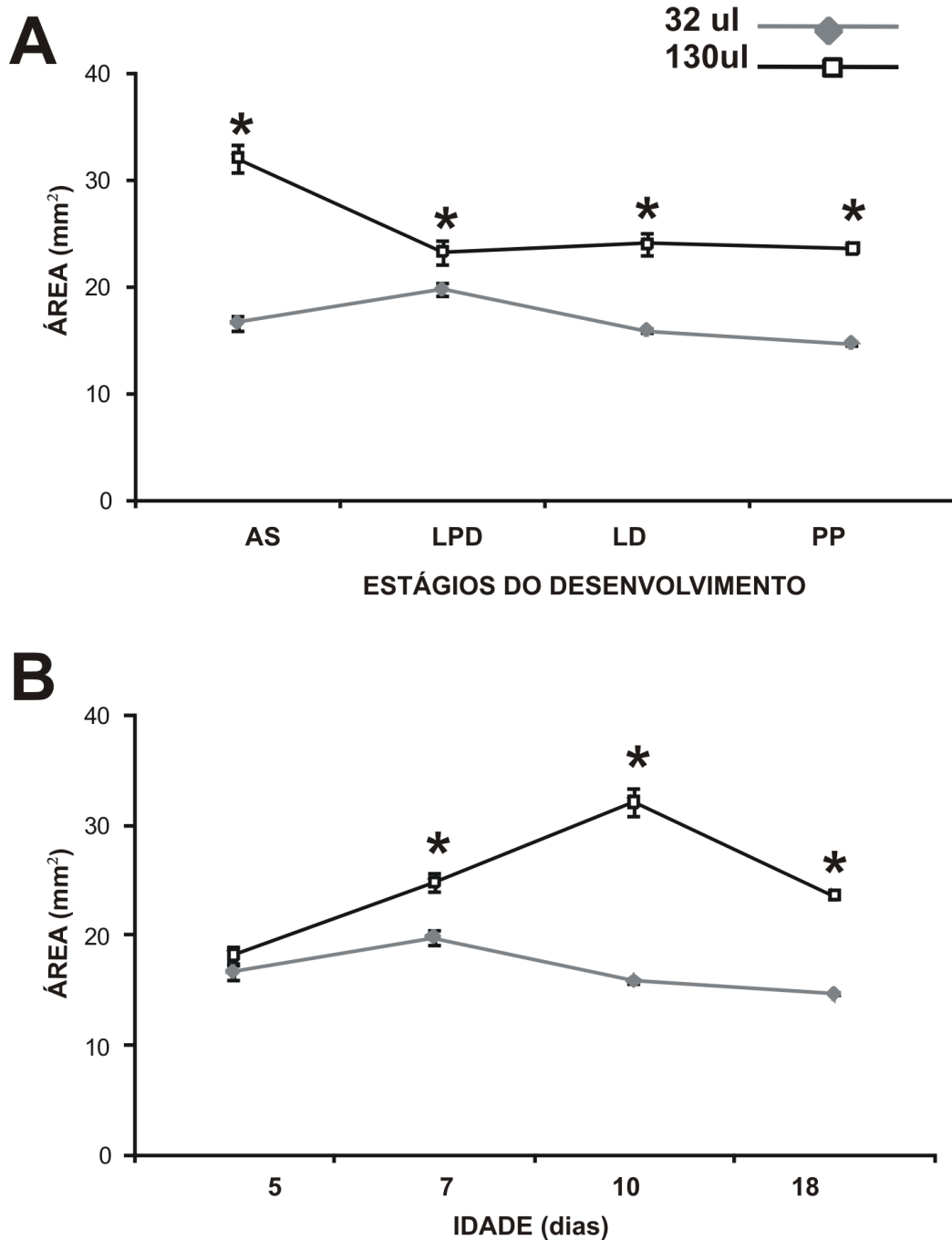


FIGURA 12: Área corpórea medida em milímetros quadrados (mm^2) de larvas de *Scaptotrigona* aff. *depilis* de diferentes estágios do desenvolvimento que receberam volumes distintos de alimento: 32 μl e 130 μl . **A)** Por estágio: houve diferença significativa entre os dois grupos em todos os estágios analisados, em AS ($p \leq 0,001$), em LPD ($p = 0,033$), em LD ($p \leq 0,001$) e em PP ($p \leq 0,001$) pelo teste t. Os estágios do desenvolvimento analisados foram: larvas em fase de alimentação com alimento sólido no fundo da célula de cria (AS), larvas pré-defecantes (LPD), larvas defecantes (LD) e pré-pupas (PP). **B)** Por idade: houve diferença entre os dois grupos nas larvas de 7 ($p = 0,003$), 10 ($p \leq 0,001$) e 18 dias ($p \leq 0,001$) pelo teste t. *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

O grupo das larvas que se alimentaram com 32 μ l de alimento apresentou um aumento significativo na média das áreas corpóreas entre AS e LPD, enquanto que no grupo das rainhas, neste mesmo estágio, foi observada o inverso: uma queda significativa; a diminuição da média de área corpórea encontrada entre os estágios LPD e LD no grupo que recebeu 32 μ l de alimento também foi significativa (*One Way ANOVA post hoc Holm-Sidak*).

As larvas de 7 dias que ingeriram 32 μ l de alimento apresentaram as maiores áreas corpóreas, diferindo significativamente das de outras idades do mesmo grupo (*One Way ANOVA, post hoc Holm-Sidak*) (Figura 12, B). Enquanto que no grupo das rainhas, um aumento significativo da média das áreas corpóreas foi observado também entre as larvas de 5 a 7 dias, mas os maiores valores foram atingidos apenas nas larvas de 10 dias, ocorrendo uma queda, também significativa nas larvas de 18 dias (*One Way ANOVA, post hoc Holm-Sidak*) (Figura 12, B).

O perfil de área corpórea exibido por cada grupo se parece muito com os respectivos obtidos na análise do peso, mostrando que há uma correlação muito forte entre estas duas medidas (Figura 11 e 12). Isso foi comprovado pelos altos índices de Correlação de Pearson (0,959 e 0,993) e os valores de $p < 0,001$ obtidos pela análises dos mesmos dados por estágio do desenvolvimento e por idade das larvas, respectivamente.

4.9 Peso dos indivíduos após emergência

As médias dos pesos dos indivíduos nascidos de células de cria artificiais estão dispostas na tabela IX. Testes estatísticos mostraram que entre os indivíduos que consumiram 32 μ l de alimento, houve diferença significativa de peso entre machos e operárias e entre machos e rainhas miniaturas (*One Way ANOVA post hoc Holm-Sidak*); o que não foi encontrado para as fêmeas deste grupo. As rainhas típicas ficaram 1,9 vezes mais pesadas que as rainhas miniaturas e as operárias, tendo consumido quatro vezes mais alimento.

TABELA IX: Média e os respectivos erros padrões do peso (em mg) dos indivíduos recém-emergidos de *Scaptotrigona* aff. *depilis* criados *in vitro*.

Sexo/Casta	Peso médio após emergência (mg)
Machos	15,71 ± 2,42
Rainhas miniaturas	18,43 ± 2,1
Operárias	18,51 ± 1,76
Rainhas típicas	34,74 ± 1,47

4.10 Genes sequenciados: Esterase do Hormônio Juvenil, Epóxido Hidrolase do Hormônio Juvenil e DNA citosina-5-metil transferase

Os *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos dos genes *jhe*, *jheh* e *dnmt-3* (Tabela III), com base nas informações obtidas do genoma de *A. mellifera*, mostraram baixa eficiência para a espécie estudada; para que as bandas pudessem ser visualizadas nos géis de agarose, foi necessário reamplificar o produto da PCR, exceto para o gene *jhe*. A figura 13 mostra as bandas que foram recortadas, purificadas e utilizadas no processo de clonagem e sequenciamento.

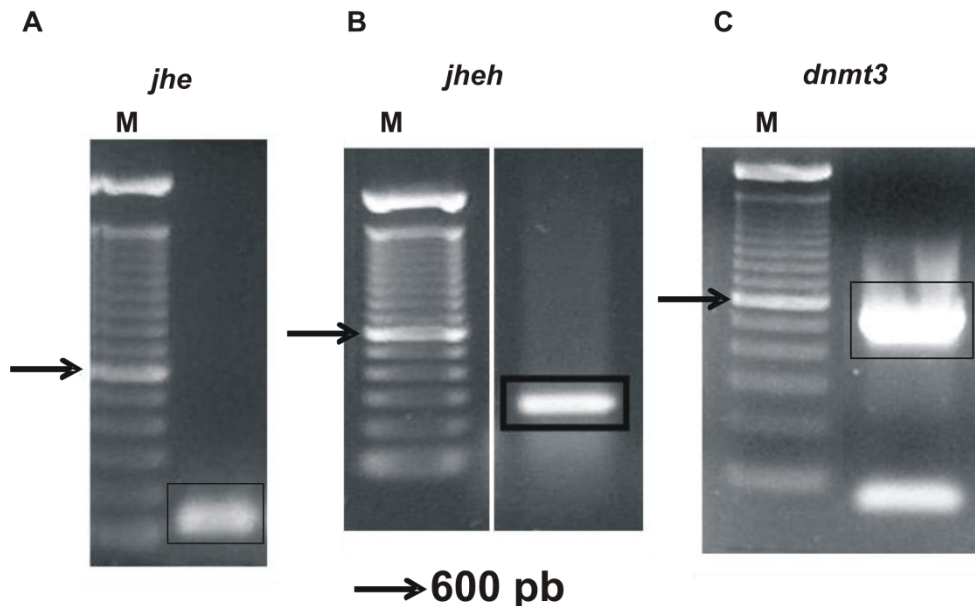


FIGURA 13: Fotos dos géis de agarose 1%, corado com solução (0,5µg/ml) de Brometo de Etídeo (EtBr); M=marcador de 100pb. Resultados da amplificação dos genes: **A)** *jhe*, **B)** *jheh* e **C)** *dnmt-3*, a partir de cDNAs de larvas de *Schwarziana quadripunctata*.

Os fragmentos foram ligados aos vetores e sequenciados como descrito em Material e Métodos. As sequências obtidas para os três fragmentos gênicos foram analisadas no programa BLASTX. Assim, foi verificado que o fragmento amplificado em *Schwarziana quadripunctata*, conceitualmente traduzido, corresponde à JHEH de *M. scutellaris*, *A. mellifera* e de outros insetos; da mesma forma, do fragmento de *jhe* sequenciado correspondeu aos de outras espécies de abelhas, como *Melipona quadrifasciata*, *S. depilis*, *M. scutellaris* e *A. mellifera*. Os fragmentos destes dois genes (*jhe* e *jheh*) foram sequenciados em outra espécie de abelha sem ferrão, *S. quadripunctata*. Diferentemente, a sequência do fragmento do gene *dnmt-3* obtida em *S. aff. depilis*, mostrou similaridade com a enzima DNA citosina-5-metil transferase *A. mellifera* e *N. vitripennis*. Os resultados de todos os BLASTX feitos estão disponíveis no anexo 1, 2 e 3.

Através de alinhamentos feitos com cada sequência obtida e suas correspondentes encontradas nos bancos de dados internacionais foi possível encontrar regiões conservadas dos genes em questão e que foram usadas para construir novos pares de *primers* (JHEH', JHE', DnMT-3', tabela IV), os utilizados no estudo de quantificação dos transcritos de seus respectivos genes.

4.11 Análises da expressão dos genes

Como dito acima, para a quantificação dos níveis de transcritos de *jhe*, *jheh*, e *dnmt-3* foram desenhados *primers* específicos para *S. aff. depilis*. Para os demais genes estudados (*EcR*, *usp*, *mfe* e *hmgr*), foram utilizados *primers* cujas sequências foram baseadas no genoma de *A. mellifera* (Tabela IV). A figura 14 mostra os resultados de ampliações feitas com estes *primers* a partir de cDNA de larvas de *S. aff. depilis*.

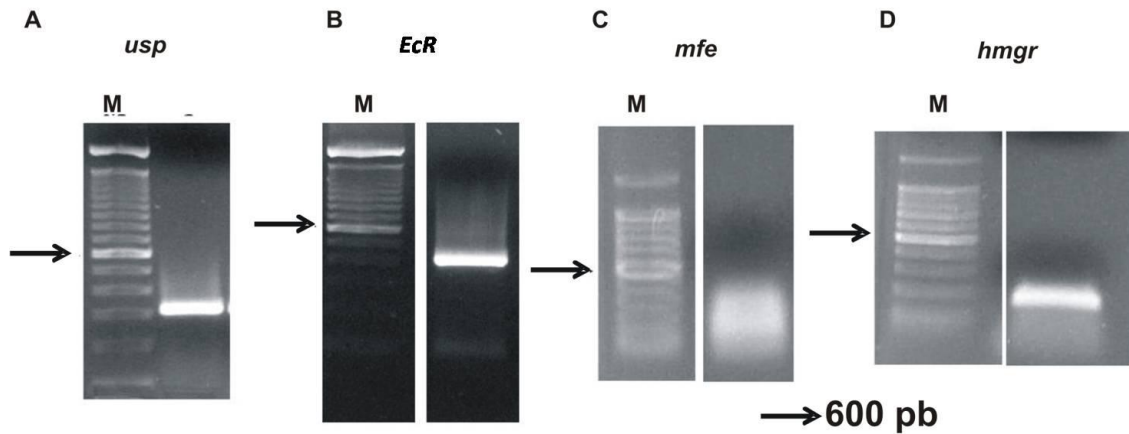


FIGURA 14: Fotos dos géis de agarose 1%, corado com solução (0,5µg/ml) de Brometo de Etídeo (EtBr); M=marcador de 100pb. Bandas obtidas através de ampliações dos fragmentos dos genes **A)** *usp*, **B)** *EcR*, **C)** *mfe* e **D)** *hmgr*, a partir de cDNAs de larvas de *Scaptotrigona* aff. *depilis*, com os respectivos *primers* USP, EcR, MFE, HMGR.

4.11.1 Curva de saturação

Para análise da expressão diferencial dos genes descritos acima foram feitas inicialmente as curvas de saturação, exemplos delas estão na figura 15.

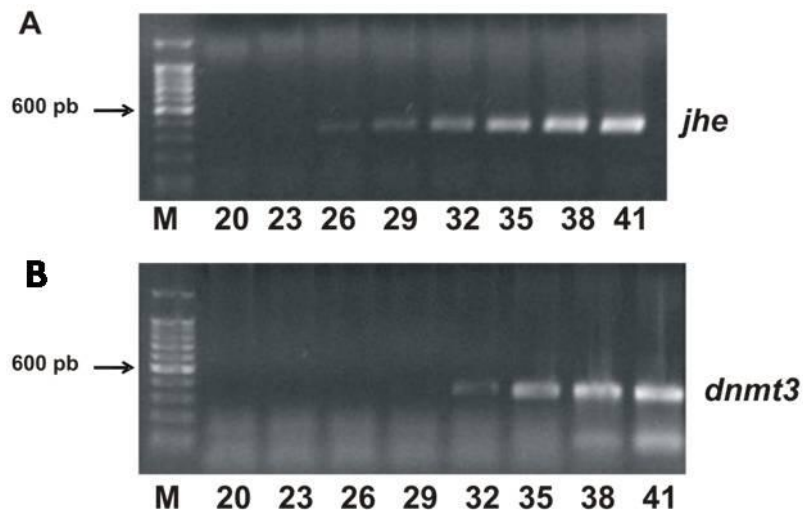


FIGURA 15: Fotos das bandas obtidas em géis de agarose, correspondentes às amostras retiradas sequencialmente da reação de PCR, no final dos ciclos identificados pelos números abaixo das bandas. Esta reação utilizou como DNA molde um *pool* de 2µl de cada biblioteca de cDNA, construído a partir do RNA extraído das larvas de *Scaptotrigona* aff. *depilis*. M= marcador de 100pb. Curva de saturação do gene **A)** *jhe*, com os *primers* JHE' e **B)** *dnmt-3*, com os *primers* DnMT'-3.

Analisando os resultados da curva de saturação do gene *jhe*, feita com os novos primers (JHE') (Figura 15, A), percebe-se que a partir do 32º ciclo a reação de PCR se satura, ou seja, não é possível diferenciar através de análises das bandas, a quantidade de transcritos obtidos no final deste ciclo com os subsequentes (35º, 38º e 41º). Portanto, foi escolhido realizar 30 ciclos na reação de PCR para quantificação do mRNA do gene *jhe*. Da mesma forma, achamos ideal trabalhar com 29 ciclos para o gene *dnmt-3*, e com 33 para o gene *ilp*, analisando suas respectivas curvas de saturação (Figura 15, B e C).

4.11.2 *dnmt-3*

A quantificação dos transcritos de *dnmt-3*, assim como todos os outros estudados, foi feita por RT-PCR semiquantitativa, como já foi dito.

Através de análises densitométricas das bandas dos géis de agarose, os níveis de mRNA foram quantificados nos quatro estágios do desenvolvimento estudados (AS, LPD, LD e PP), em larvas de *S. aff. depilis* criadas com 32µl e com 130µl de alimento (Figura 16).

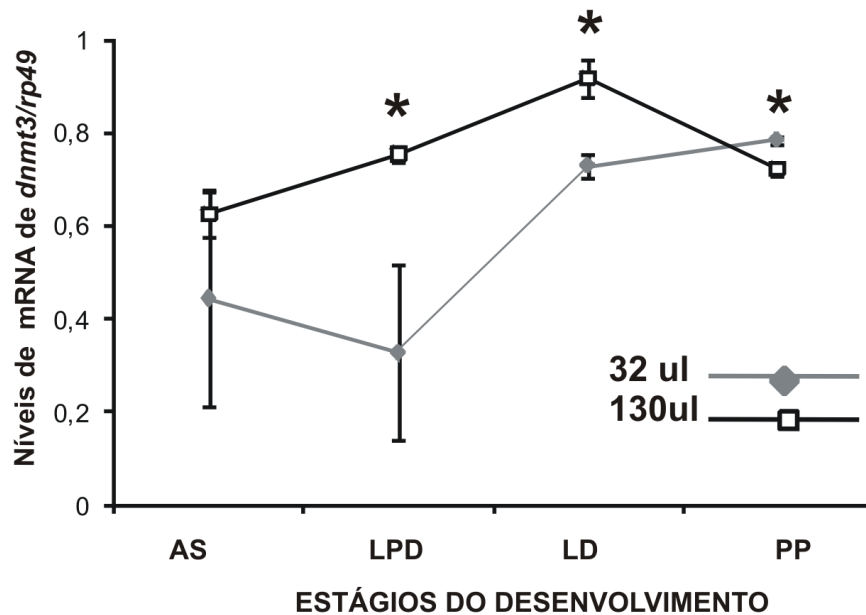


FIGURA 16: Quantificação dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) do gene codificador da enzima DNA citosina-5-metil transferase (*dnmt-3*) em larvas de *Scaptotrigona* aff. *depilis* de diferentes estágios do desenvolvimento que receberam dois volumes distintos de alimento: 32µl e 130µl. Houve diferença significativa entre os dois grupos em LPD ($p=0,029$) e em LD ($p=0,029$) pelo teste Mann-Whitney e em PP ($p=0,017$) pelo teste t. AS: larvas em fase de alimentação com alimento sólido no fundo da célula de cria, LPD: larvas pré-defecantes, LD: larvas defecantes e PP: pré-pupas. *Diferença estatística significativa ($p<0,05$).

A figura 16 mostra que houve diferença significativa entre os grupos de alimentação (32 e 130 μ l) nos 3 últimos estágios do desenvolvimento (LPD, LD e PP), sendo maior em dois deles nas larvas que se alimentaram com 130 μ l.

Foi feita análise também entre os estágios do desenvolvimento dentro de cada grupo, e as larvas que receberam 32 μ l de alimento não apresentaram diferença significativa na expressão de *dnmt-3*, apesar de grandes erros padrões terem sido encontrados nos estágios AS e LPD. Já no grupo que recebeu 130 μ l de alimento larval, houve um aumento significativo nos níveis de transcritos entre os estágios AS e LD (Kruskal-Wallis, *post hoc* Tukey).

4.11.3 *EcR* e *usp*

A expressão gênica do receptor de ecdisona, *EcR*, apresentou diferença significativa entre os dois grupos (32 e 130 μ l) apenas no estágio LPD, sendo maior nas larvas alimentadas com 130 μ l, como pode ser visualizado na figura 17a. Já os níveis de transcritos do gene *ultraspiracle*, *usp*, apresentaram diferença significativa entre os dois grupos de alimentação em dois estágios do desenvolvimento, em AS e LD. Em AS, as larvas que receberam 32 μ l de alimento apresentaram níveis de expressão maiores que aqueles apresentados pelo grupo que consumiu 130 μ l; enquanto que o inverso ocorre no estágio LD, no qual os níveis de transcritos de *usp* foram menores nas larvas alimentadas com 32 μ l em relação às criadas com 130 μ l de alimento (Figura 17, B).

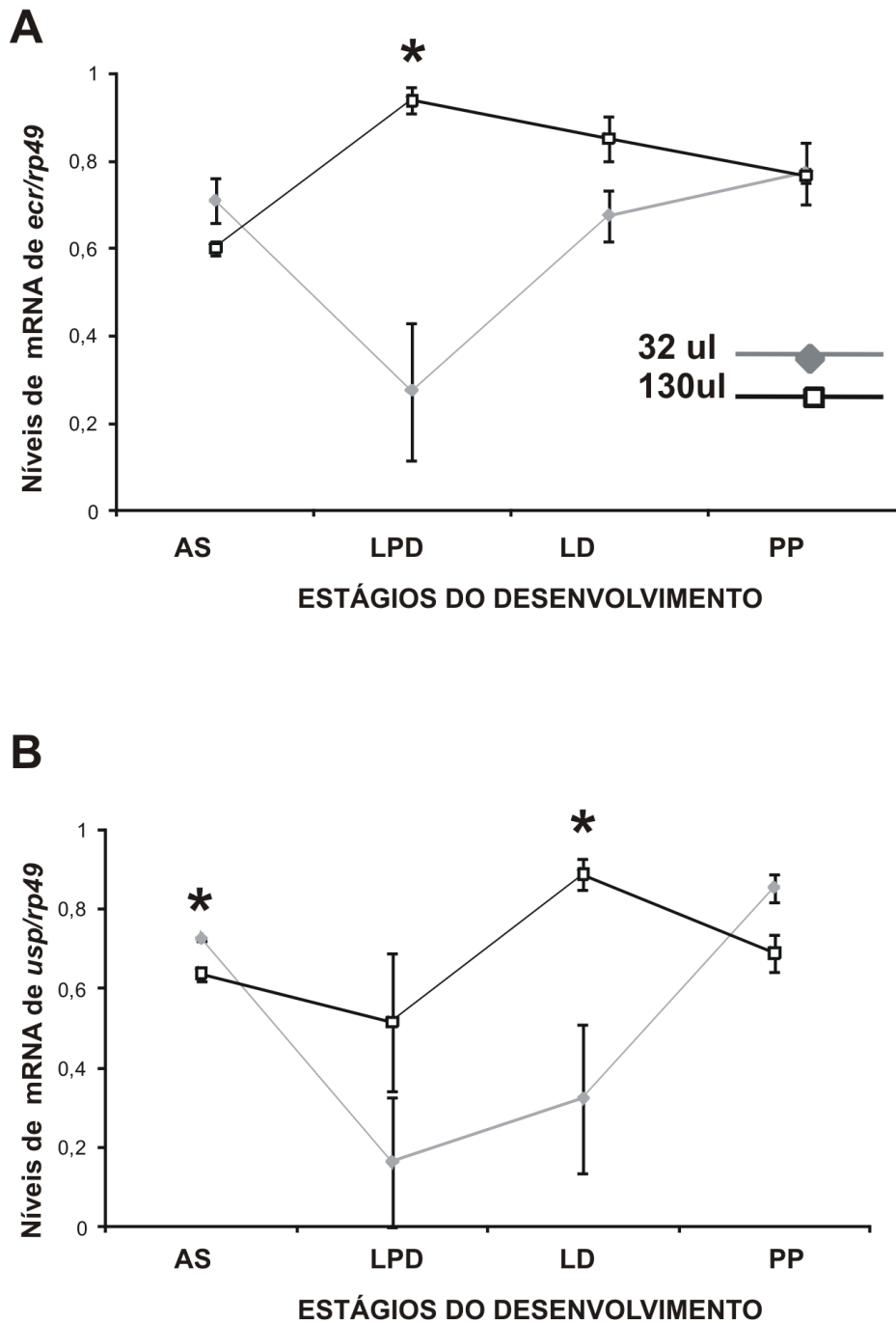


FIGURA 17: Quantificação dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) de genes codificadores de receptores envolvidos na resposta à ecdisona e hormônio juvenil em larvas de *Scaptotrigona aff. depilis* que receberam dois volumes distintos de alimento: 32 μ l e 130 μ l. **A)** Níveis de mRNA do receptor de ecdisona (*EcR*); houve diferença significativa entre os dois grupos em LPD ($p=0,006$; teste t). **B)** Níveis de mRNA de *ultraspiracle* (*usp*); houve diferença significativa entre os dois grupos em AS ($p=0,011$) e em LD ($p=0,026$) pelo teste t. AS: larvas em fase de alimentação com alimento sólido no fundo da célula de cria, LPD: larvas pré-defecantes, LD: larvas defecantes e PP: pré-pupas. *Diferença estatística significativa ($p<0,05$).

Os níveis de expressão de *EcR* foram comparados entre os estágios do desenvolvimento dentro do mesmo grupo de dieta, e foi encontrada diferença entre LPD e PP entre as larvas que receberam 32µl de alimento (*One way ANOVA, post hoc* Dunn's). Entre as larvas que receberam 130µl, não houve diferença entre LPD, LD e PP, mas houve entre AS e todos os demais, mostrando que em LPD houve um pico e ele se manteve até PP (*One Way ANOVA, post hoc* Holm-Sidak) (Figura 17a).

Quanto aos níveis de transcritos do gene *usp* dentro do grupo que recebeu 32µl também apresentaram diferença significativa entre LPD e PP (*One Way ANOVA, post hoc* Holm-Sidak), perfil parecido com o encontrado para o gene *EcR*, a quantidade de transcritos de *usp* não variou durante os primeiros estágios analisados, mas a partir de LD começa a aumentar, atingindo os níveis mais altos em PP. Já no grupo que recebeu 130µl de alimento não foi encontrada diferença estatística significativa entre os estágios, indicando que a expressão do gene *usp* provavelmente se manteve constante no grupo das rainhas, pelo menos durante as fases do desenvolvimento estudadas.

4.11.4 Genes da via de síntese do HJ

Quantificamos os níveis de mRNA de dois genes pertencentes à cascata de síntese do hormônio juvenil, o *mfe* e *hmgr*, codificadores das enzimas metil farnesoato epoxidase e 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase, respectivamente. Os mesmos estágios do desenvolvimento foram analisados (AS, LPD, LD, PP).

O gene *mfe* apresentou maior expressão no estágio LPD no grupo que recebeu 130µl se comparado com o grupo que recebeu 32µl de alimento larval, como se pode ver na figura 18, A.

Este mesmo grupo de alimentação (130µl) apresentou níveis de transcritos de *hmgr* constantes ao longo dos estágios do desenvolvimento, enquanto que no grupo que recebeu 32µl de alimento, os níveis de transcritos deste mesmo gene foram basais e por isso, não estão representados na figura 18, B.

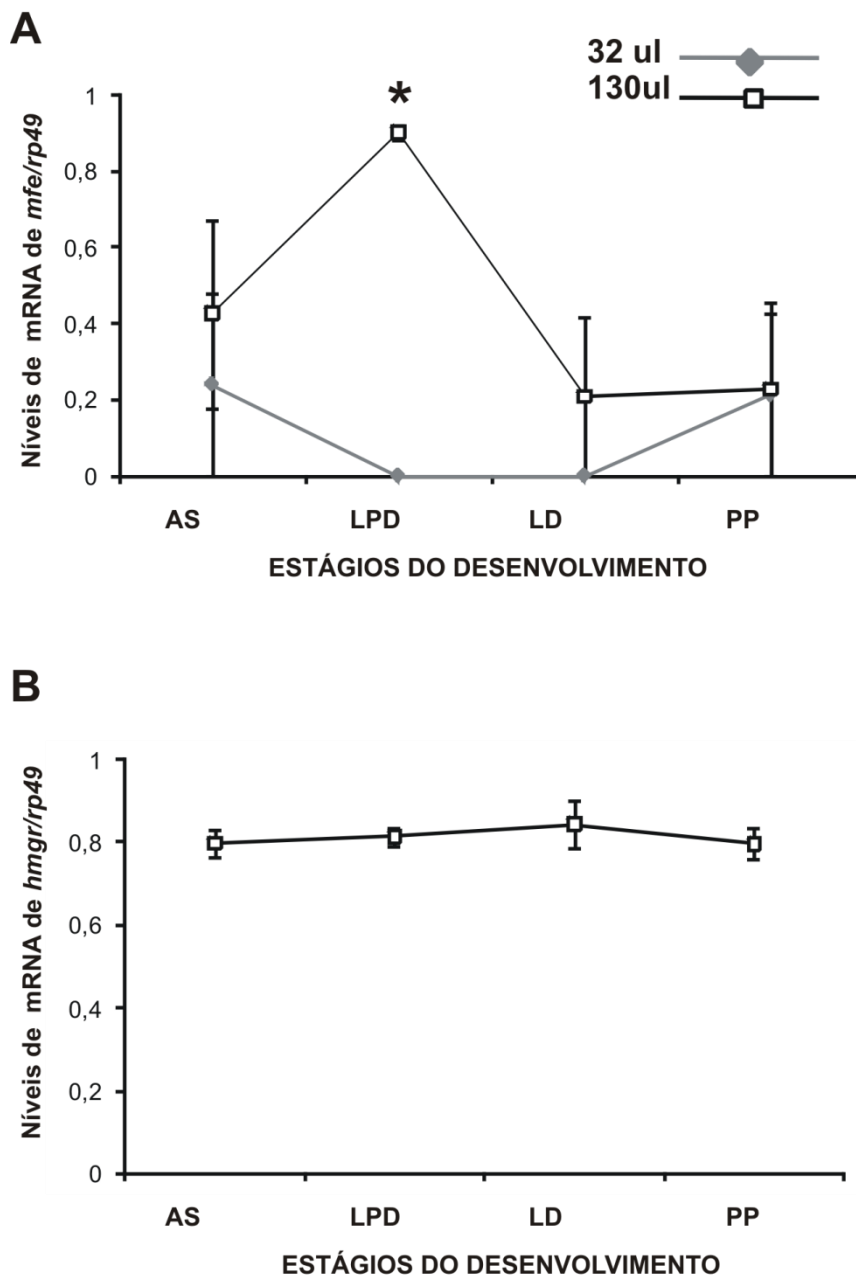


FIGURA 18: Quantificação dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) de genes da via de síntese do hormônio juvenil em larvas de *Scaptotrigona aff. depilis* em diferentes estágios do desenvolvimento. AS: larvas em fase de alimentação com alimento sólido no fundo da célula de cria, LPD: larvas pré-defecantes, LD: larvas defecantes e PP: pré-pupas. * Diferença estatística significativa ($p < 0,05$). **A)** Níveis de mRNA do gene codificador da enzima metil farnesoato epoxidase (*mfe*); houve diferença significativa em LPD ($p = 0,029$, Mann-Whitney) entre o grupo que recebeu 32 μ l e o que recebeu 130 μ l de alimento. **B)** Níveis de mRNA do gene codificador da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase (*hmgr*) em larvas receberam 130 μ l de alimento. * Diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

A análise feita dos níveis de expressão de *mfe* entre os estágios de desenvolvimento, não apresentou diferença significativa dentro dos dois grupos

experimentais, mostrando que os níveis de transcritos desse gene se mantiveram constantes do final da fase de alimentação até o estágio de pré-pupa tanto nos dois grupos de dieta (32 μ l e 130 μ l).

4.11.5 Genes da via de degradação do HJ

Os dois genes pertencentes à via de degradação do hormônio juvenil analisados são codificadores das enzimas esterase do hormônio juvenil (JHE) e da epóxido-hidrolase do hormônio juvenil (JHEH).

A figura 19, A mostra que o gene *jhe* não apresentou diferença significativa entre os dois grupos quanto aos seus níveis de transcritos. Já a expressão do gene *jheh*, no estágio LD, foi maior nas larvas que ingeriram 130 μ l se comparado às que receberam 32 μ l de alimento (Figura 19, B).

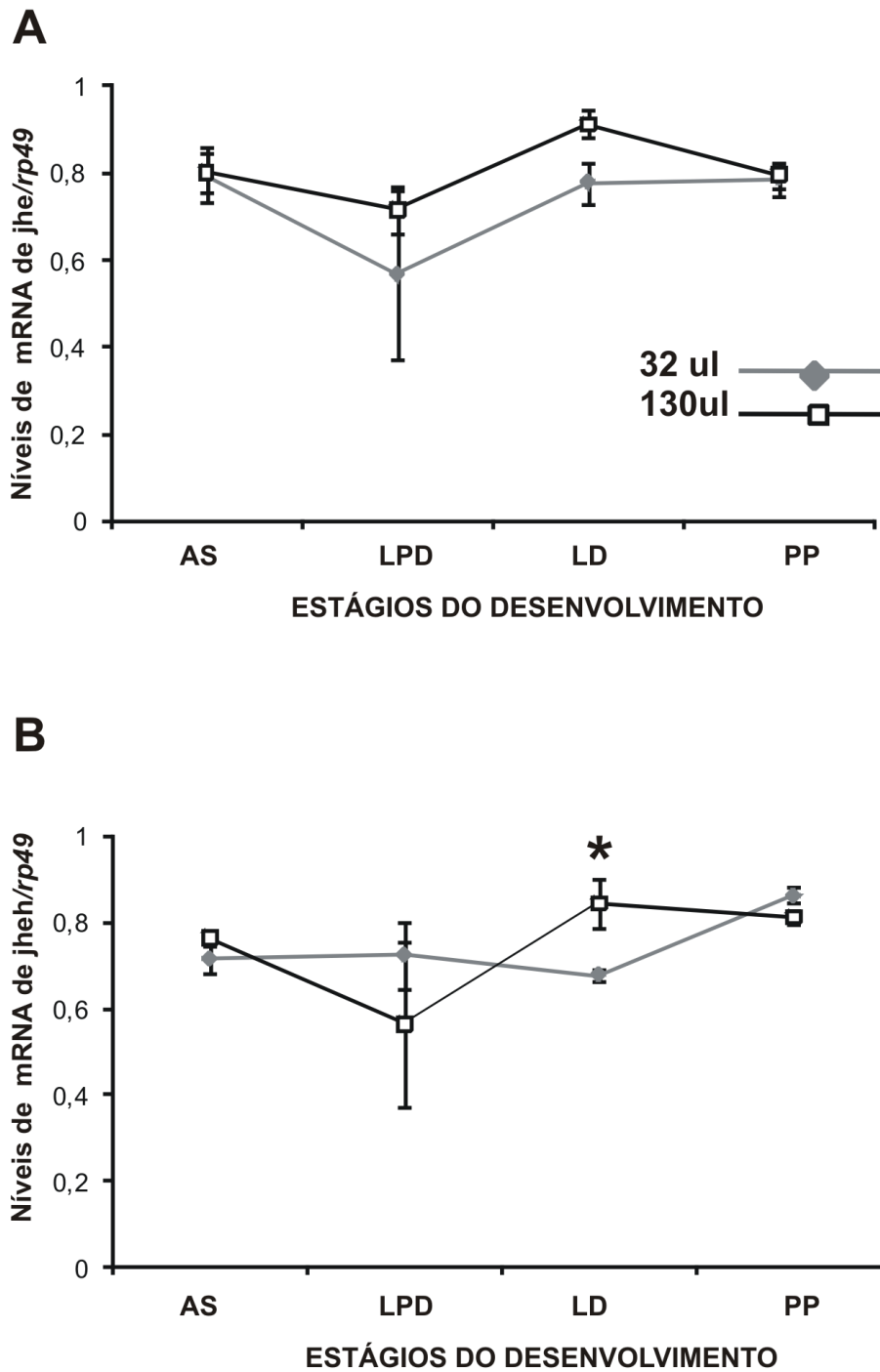


FIGURA 19: Quantificação dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) de genes codificadores de enzimas da via de degradação do hormônio juvenil em larvas de *Scaptotrigona aff. depilis* em diferentes estágios do desenvolvimento que receberam dois volumes distintos de alimento: 32 μ l e 130 μ l. **A)** Níveis de mRNA do gene da esterase do hormônio juvenil (*jhe*); não houve diferença significativa entre os grupos. **B)** Níveis de mRNA do gene da epóxido hidrolase do hormônio juvenil (*jeh*); houve diferença significativa entre os dois grupos em LD ($p=0,028$; teste t). AS: larvas em fase de alimentação com alimento sólido no fundo da célula de cria, LPD: larvas pré-defecantes, LD: larvas defecantes e PP: pré-pupas. * Diferença estatística significativa ($p<0,05$).

Dentro do grupo das larvas que consumiram 32 μ l de alimento não houve diferença significativa dos níveis de transcritos de *jhe* entre os estágios analisados. No grupo das rainhas (130 μ l), por sua vez, houve um aumento significativo de expressão desse gene no estágio LD (One Way ANOVA, *post hoc* Holm-Sidak). Os níveis de transcritos para o gene *jheh* se mantiveram constantes entre os quatro estágios analisados nos dois grupos de alimentação (Figura 19).

4.12 Títulos de HJ

Por meio da técnica de radioimunoensaio realizado com a hemolinfa coletada das larvas de *S. aff. depilis*, foi possível quantificar os títulos de hormônio juvenil (HJ) em três estágios do desenvolvimento (AS, LPD e LD).

Encontrou-se diferença significativa entre os grupos em LD, sendo maior nas larvas que comeram 130 μ l de alimento (Figura 20).

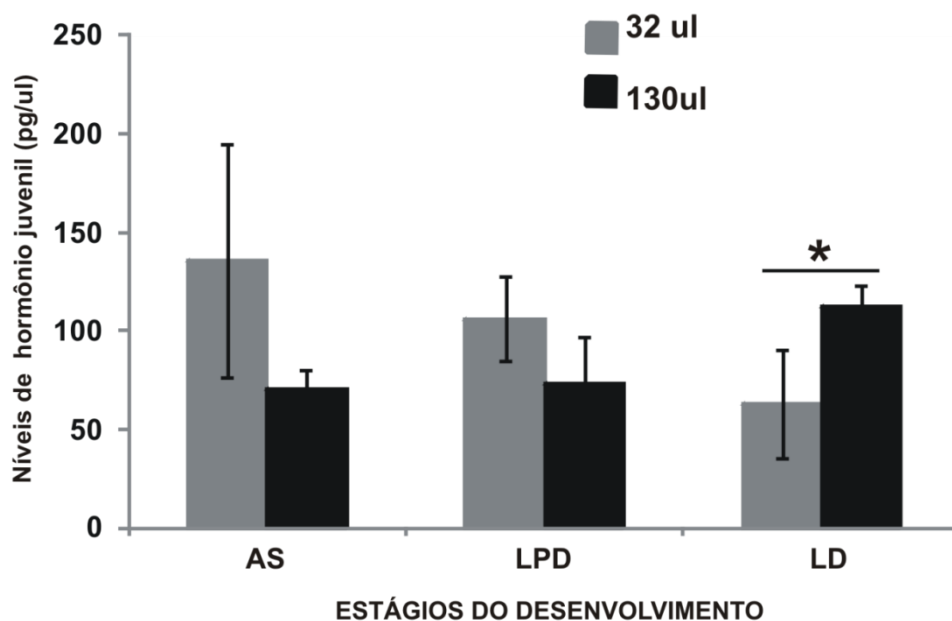


FIGURA 20: Quantificação dos títulos de hormônio juvenil presentes na hemolinfa de larvas de *Scaptotrigona aff. depilis* em diferentes estágios do desenvolvimento que receberam dois volumes distintos de alimento: 32 μ l e 130 μ l. Houve diferença significativa entre os dois grupos em LD ($p=0,034$, teste t). AS: larvas em fase de alimentação com alimento sólido no fundo da célula de cria, LPD: larvas pré-defecantes, LD: larvas defecantes. * Diferença estatística significativa ($p<0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1 Metabolismo das rainhas

Como foi visto, apesar de terem sido criados com a mesma quantidade de alimento, os indivíduos do grupo de 32µl se desenvolveram tanto em rainhas quanto em operárias e machos, semelhante ao que ocorre com espécies do gênero *Melipona*, em que os dois tipos de castas e sexos nascem de células de cria do mesmo tamanho e, aparentemente, com a mesma quantidade de alimento.

As rainhas de *S. aff. depilis* criadas *in vitro* com 32µl de alimento se desenvolveram em um tempo menor que os demais indivíduos do mesmo grupo, sendo que as operárias gastaram 2 dias adicionais e os machos, 3 em relação à elas, para emergirem. Também em *Melipona*, as rainhas se desenvolvem mais rápido que as operárias (Kerr et al., 1996; Moo-Vale et al., 2004).

Já em espécies com alimentação quantitativamente diferente entre as castas, como *S. aff. depilis*, naturalmente, as rainhas demoram mais para se desenvolverem que as operárias e machos; sempre são encontradas células reais isoladas na colônia, pois o restante das células de operárias vizinhas já emergiram (Menezes, comun. pessoal). Isso foi evidenciado em nossos experimentos, em que as rainhas típicas de *S. aff. depilis* criadas *in vitro* com 130µl de alimento demoraram mais para emergirem se comparado com as fêmeas que receberam 32µl de alimento, 4 dias depois das operárias e 6 dias depois das rainhas miniaturas. Já em *Apis mellifera*, as rainhas nascem antes que as operárias, mesmo consumindo maior quantidade de alimento (Winston, 1987) (Figura 21).

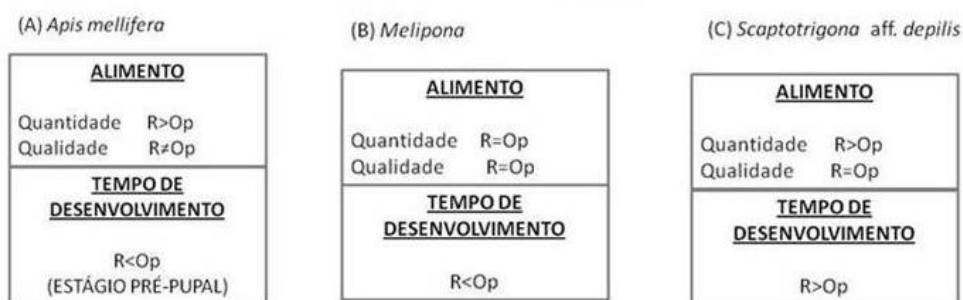


FIGURA 21 – Comparação entre três espécies com diferentes processos de diferenciação de castas. A) *Apis mellifera*; B) *Melipona* e C) *Scaptotrigona aff. depilis*.

Comparando os pesos obtidos entre os dois tipos de rainhas de *S. aff. depilis* produzidas em nossos experimentos, verificamos que as larvas que consumiram 130µl

de alimento originaram as rainhas típicas, que ficaram duas vezes mais pesadas se comparado com as rainhas miniaturas, as quais ingeriram um quarto da quantidade de alimento referida acima durante seu desenvolvimento larval.

Esta proporção está de acordo com a encontrada por Camargo 1972a, na relação entre os pesos das rainhas de *S. depilis* produzidas *in vitro* com quantidades de alimento correspondentes com as que utilizamos em nossos experimentos.

As larvas que receberam 130µl de alimento ganharam e perderam peso abruptamente ao longo do desenvolvimento, diferente do que ocorreu com larvas que consumiram 32µl de alimento. Além disso, no grupo das rainhas, a perda de peso ocorreu em um estágio anterior (AS) ao observado nas larvas do grupo de 32µl (LPD). Interessante ressaltar que, em AS as larvas ainda estão se alimentando, e mesmo assim foi observada uma perda de peso, sugerindo que, nesta fase, o gasto de energia é superior que o ganho nas larvas que consomem 130µl de alimento durante este estágio larval.

5.2 Títulos de HJ

Em Hartfelder & Rembold (1991) foi observado que o período sensível ao HJ para indução das características de rainhas se encontra depois da fase de alimentação em abelhas sem ferrão; por isso, os estágios do desenvolvimento em que quantificamos os títulos de HJ nas larvas criadas *in vitro* de *Scaptotrigona* aff. *depilis* estiveram compreendidos dentro deste intervalo. Infelizmente, não conseguimos dados para o estágio de pré-pupa.

De acordo com Hartfelder & Rembold (1991), os títulos de HJ de operárias e rainhas de *S. postica depilis* mantiveram-se parecidos durante os estágios do desenvolvimento L5F2 e L5S1, começando a aumentar em rainhas no estágio L5S2, anterior ao encontrado em operárias; estes estágios, de acordo com a classificação feita por Michellete & Soares (1993) para *A. mellifera*, se correspondem, respectivamente, aos estágios AS, LPD e LD, analisados neste estudo. Em nossos resultados, obtivemos um perfil semelhante para os títulos de HJ, os quais não apresentaram diferença significativa entre os grupos de alimentação nos estágios AS e LPD; já em LD, o grupo das rainhas (130µl) obteve maiores títulos desse hormônio em relação ao grupo que recebeu 32µl de alimento larval.

Complementarmente, Hartfelder & Rembold (1991) mostraram que o crescimento observado nos títulos de HJ em L5S2 nas rainhas de *S. postica depilis*

esteve ligado ao maior pico de atividade dos CA encontrado nesta mesma casta em relação às operárias. Há indicações que a espécie estudada no trabalho citado seja a mesma que estudamos, portanto, podemos dizer que os maiores títulos de HJ encontrados no grupo das rainhas de *S. aff. depilis* no estágio LD podem ser explicados pelo aumento na atividade de síntese pelos CA nesta casta.

As diferenças casta-específicas nos títulos de HJ descritas em Hartfelder & Rembold (1991) foram encontradas em *S. postica depilis* em três estágios do desenvolvimento, um entre o quarto e o quinto estágio larval, anterior ao estágio em que começamos as análises (AS); e os outros dois, no final do período de tecelagem do casulo e de pré-pupa, estágios posteriores ao que analisamos. Podemos esperar que os títulos de HJ também se diferenciem entre rainhas e operárias de *S. aff. depilis* nos mesmos estágios que *S. postica depilis*.

Em *A. mellifera* e em *Melipona scutellaris* (Rachinsky et al., 1990; Mackert et al. *in prep.*), o pico dos títulos de HJ ocorre anteriormente ao final do processo de alimentação, já em *S. aff. depilis* e em *S. postica depilis* (Hartfelder & Rembold, 1991) este pico está um pouco deslocado, ocorrendo depois que a larva terminou de se alimentar, como pode ser visualizado na figura 21.

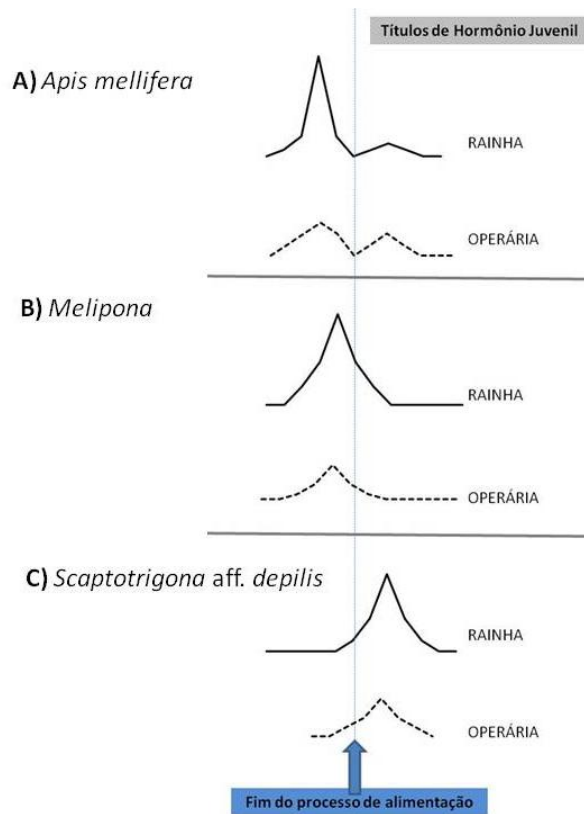


FIGURA 21 - Comparação dos títulos de HJ entre três espécies com diferentes processos de diferenciação de castas. **A)** *Apis mellifera* (Rachinsky et al., 1990); **B)** *Melipona* (Mackert et al., *in prep.*) e **C)** *Scaptotrigona aff. depilis*.

5.3 Níveis de transcritos de *mfe* e *hmgr*

Em *A. mellifera*, o passo que envolve a enzima MFE é considerado limitante na síntese de HJ, ou seja, se uma baixa expressão do gene e, conseqüentemente, uma menor quantidade da enzima, for encontrada, é um forte indicador de que a síntese de HJ esteja menor, ou vice-versa (Bellés et al., 2005). Nossos resultados mostraram que houve um pico da expressão de *mfe* no grupo das rainhas, em LPD, um estágio anterior em que foi encontrado um pico na atividade do CA nas rainhas de *S. postica depilis*, em L5S2 (Hartfelder, & Rembold, 1991). Isso pode ter ocorrido porque a classificação dos estágios do desenvolvimento que utilizamos não foi a mesma que os autores citados utilizaram; apesar de haver uma correspondência entre eles, como já dito, ela não pode ser considerada exata; talvez o final do estágio LPD, em nossa classificação, coincida com o começo do estágio L5S2, classificação segundo Michellete & Soares (1993), considerando *A. mellifera*.

O pico de expressão do gene relacionado à síntese (*mfe*) também ocorreu um estágio anterior, em LPD, ao que encontramos o maior valor nos títulos de HJ no grupo

que recebeu 130µl de alimento, em LD, talvez porque seja o tempo necessário da síntese até a liberação e circulação desse hormônio na hemolinfa.

Não podemos nos esquecer que os valores dos níveis de transcritos de um gene analisado são relativos aos do gene normalizador utilizado, então, o fato de *hmgr* ter expressão basal não necessariamente significa que este gene é pouco expresso, pode ter sido efeito do normalizador que utilizamos, no caso, o *rp49*; outro gene normalizador poderia ser utilizado para se resolver esta questão.

5.4 Níveis de transcritos de *jhe* e *jheh*

Como foi encontrado um pico de expressão de *mfe* no grupo das rainhas em LPD, esperávamos encontrar maiores títulos de HJ neste estágio no grupo que recebeu 130µl de alimento se comparado com o que se alimentou com 32µl, mas não foi observado; isso nos sugeriu que durante este estágio do desenvolvimento uma intensa atividade de degradação desse hormônio no grupo das rainhas (130µl) possa ser a responsável por manter os níveis de HJ semelhantes entre os grupos de alimentação (32 e 130µl), já que não há informações sobre seu armazenamento em nenhum órgão ou tecido.

No entanto, os níveis de transcritos dos genes codificadores das enzimas de degradação de HJ analisadas (JHE e JHEH) também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de *S. aff. depilis* criadas *in vitro*, que receberam diferentes dietas, e, somente no estágio LD, o grupo que recebeu 130µl de alimento apresentou maior expressão do gene *jheh* em relação ao grupo que recebeu 32µl de alimento. Para que a metamorfose aconteça, é necessário que o HJ seja retirado de circulação em momentos precisos do desenvolvimento, geralmente após o período de alimentação (Gilbert, 2004). Assim, uma maior expressão de *jheh* em LD no grupo das rainhas pode significar que a degradação do HJ nesta fase seja mais requerida, já que neste estágio, este mesmo grupo apresentou títulos de HJ maiores que o que recebeu 32µl de alimento.

Apesar disso, experimentos devem ser feitos para se testar a atividade de degradação do HJ por JHEH em *S. aff. depilis*, porque em *A. mellifera*, JHEH mostrou não degradar HJ (Mackert et al., submetido).

Assim como em *A. mellifera* (Mackert et al., 2008), o HJ parece induzir a transcrição de *jhe* também em *S. aff. depilis*, porque nossos resultados mostraram que no mesmo estágio (LD) em que foi encontrado um aumento significativo de expressão

de *jhe* no grupo das rainhas (130µl) foi o que encontramos os maiores títulos de hormônio juvenil no mesmo grupo.

Em LPD, percebemos uma grande variação nos níveis de transcritos de *jhe* e *jheh*, principalmente no grupo que recebeu 32µl de alimento, os quais podem estar representando valores de expressão desses genes apresentados pelas rainhas miniaturas. Como não sabemos discriminá-las pelas larvas, só podemos inferir que talvez sem esta variação, os níveis de mRNAs das enzimas JHE e JHEH apresentem-se maior nas rainhas em comparação com as operárias neste estágio do desenvolvimento em *S. aff. depilis*, sendo possível explicar, então, o fato de não ter sido verificada diferença estatística dos níveis de HJ entre os grupos no estágio LPD.

5.5 Níveis dos transcritos de *EcR* e *usp*

Analisando o perfil apresentado no nível dos transcritos do gene *EcR* em ambos os grupos de alimentação verificamos que o das rainhas apresentou um pico de expressão no estágio LPD; curiosamente, no grupo que recebeu 32µl, neste mesmo estágio, foi encontrada grande variação entre os valores obtidos para os níveis de transcritos do gene, mostrado pelos valores altos do erro padrão. Considerando que no grupo que recebeu 32µl de alimento obtivemos rainhas também, podemos inferir que os valores positivos de erros padrões encontrados neste estágio (LPD), poderiam ser os valores de expressão de *EcR* apresentados pelas rainhas miniaturas, os quais mostram estar intermediários entre as rainhas típicas e os demais indivíduos do outro grupo. Podemos inferir também que este pico encontrado no grupo das rainhas pode ser típico desta casta em *S. aff. depilis*.

As análises para o gene *usp* são semelhantes às de *EcR*, o que difere é que no grupo das rainhas os níveis máximos de *usp* são encontrados um estágio posterior ao encontrado para *EcR*, em LD ao invés de LPD. Também em LD, no grupo de 32µl, são encontrados elevados erros padrões, sugerindo que também há valores intermediários no nível de transcritos desse gene, que podem talvez representar a expressão de *usp* nas rainhas miniaturas, iguais aos encontrados para *EcR*, em LPD.

Nossos resultados mostraram que o pico de expressão do receptor de ecdisona (*EcR*) ocorreu em LPD, estágio correspondente a L5S1, de acordo com a classificação de Michellete & Soares, 1993, o mesmo em que os níveis de ecdisteróides começaram a aumentar em *S. postica depilis* (Hartfelder & Rembold, 1991). Para o gene *usp*, os maiores níveis de expressão foram observados em LD no grupo das rainhas, mesmo

estágio em que se encontram os títulos mais elevados de HJ, por isso podemos sugerir que os níveis de transcritos de *usp* estão em concordância com os títulos desse hormônio encontrados na hemolinfa das larvas analisadas, reforçando ainda mais o envolvimento desse gene com o HJ, provavelmente como sendo seu potencial ligante, assim como sugeriu Barchuk et al., 2004.

Talvez *EcR* tenha resposta mais rápida e imediata a ecdisona, e possivelmente por isso, apresentou altos níveis de transcritos assim que os títulos deste hormônio começaram a subir (Ashbumer et al., 1974; Thummel et al., 1990); ou então pode ser que os altos títulos de HJ sejam necessários para desencadear uma resposta mais pronunciada de *usp* (Jones et al., 2001; Fang et al. 2005), pelo menos nas rainhas, já que os maiores níveis de transcritos de *usp* foram observados no mesmo estágio em que os títulos de HJ estavam mais altos para este grupo, o que explicaria a diferença nos estágios em que são encontrados os picos para os dois genes.

Os altos níveis de transcritos tanto de *EcR* quanto de *usp* na fase de pré-pupas de *S. aff. depilis* criadas *in vitro* podem estar relacionados com títulos de ecdisteróides, que provavelmente estão altos nesta fase que antecede a metamorfose, igual ao encontrado para *S. postica depilis* em Hartfelder & Rembold (1991).

5.6 Níveis de *dnmt-3*

A metilase é uma das enzimas responsáveis pela metilação do DNA. Comparando os dois grupos de alimentação estudados, observamos que houve maior expressão de *dnmt-3* no grupo alimentado como operária no estágio PP, enquanto em LPD e LD a maior expressão desse gene foi encontrada no outro grupo, sugerindo que mais genes sejam metilados nas larvas alimentadas como rainha.

O trabalho de Kucharski et al., 2008 mostra que o inverso ocorreu em *A. mellifera*, que com o gene *dnmt-3* silenciado, as larvas alimentadas como operárias apresentaram ovários fenotipicamente de rainhas. Mas isso não confronta com nossos resultados, já que o estágio analisado (L1) foi bem anterior aos que quantificamos os níveis de transcritos desse gene. Pode ser que, assim como em *A. mellifera*, as larvas de *S. aff. depilis*, alimentadas como rainhas, apresentem menor metilação durante o desenvolvimento dos ovários, mas para confirmarmos isso, larvas em estágios anteriores devem ser consideradas; sabe-se que o desenvolvimento dos ovários ocorre durante o estágio L3 em *A. mellifera* (Dedej et al., 1998), mas não há informações para *S. aff. depilis*.

A grande variação encontrada em AS no grupo que recebeu 32 μ l de alimento pode ser devido à presença das rainhas miniaturas neste grupo. Apesar disso, ainda não sabemos se a metilação é um processo envolvido na diferenciação de castas nestas abelhas.

5.7 O aparecimento de rainhas miniaturas

Sabe-se que em algumas espécies de abelhas sem ferrão foi verificada a produção natural de rainhas miniaturas: *Cephalotrigona capitata* (von Ihering, 1903; Schwarz, 1948), *Plebéia julianii* (Juliani, 1967), *Schwarziana quandripunctata* (Camargo, 1974; Costa, 1977; Imperatriz-Fonseca and Darakjian, 1993; Nogueira-Ferreira et al., 2000; Ribeiro e Alves, 2001; Wenseleers et al., 2005), *P. remota* (Imperatriz-Fonseca et al. 1975; Ribeiro et al., 2003; Ribeiro et al., 2006), *P. emerina* (Kleinert, pers. comm.), *P. droryana* (Imperatriz-Fonseca, pers. comm.), *P. mosquito* (Freitas e Paxton, pers. comm.), *P. pugnax* (in litt.) (Wenseleers e Alves, unpubl. data) e *N. testaceicornis* (Imperatriz-Fonseca et al., 1994; Imperatriz-Fonseca et al., 1997) (revisado por Ribeiro et al., 2006). Em *S. aff. depilis* não há nenhum registro a este respeito, por isso, o aparecimento das rainhas miniaturas delas em nossos experimentos foi surpreendente.

Todos os nossos resultados indicaram que elas eram de fato rainhas miniaturas e não intercastas como já obtido por outros autores (Camargo, 1972b e Mateus & Zucchi, 2002). Em nossa análise discriminante, os valores esperados de uma distribuição ao acaso foram muito menores que os encontrados, mostrando que cada grupo de indivíduos, criados *in vitro* e naturalmente, apresentou um perfil característico, que o distingue dos demais, e que os indivíduos pertencentes a um determinado grupo se enquadraram neste perfil. Mostramos também, pela PCA, que as rainhas criadas com menor quantidade de alimento mantiveram uma proporcionalidade de tamanho com as rainhas do outro grupo (130 μ l), ou seja, a forma (de rainha) foi mantida; as rainhas miniaturas eram apenas menores que as demais. A morfologia dos ovários se apresentou muito parecida entre os dois tipos de rainhas produzidas: com 4 ovariolos cada um, espermateca e glândula de Dufour; além do comportamento de ambas nas mini-colônias ter sido também muito semelhante.

Apesar do nosso objetivo principal não ter sido de explicar como e por que elas ocorreram, algumas hipóteses foram levantadas a este respeito, como podemos ver a seguir.

5.7.1 Hipótese 1 – Erro na quantificação do alimento

A primeira hipótese a ser levantada é a possibilidade de ter ocorrido um erro na quantificação do alimento colocado nas células de cria artificiais, ou seja, no grupo de 32µl, algumas larvas teriam recebido uma quantidade maior de alimento do que outras, o que poderia ter sido a causa do aparecimento de quase 20% de rainhas miniaturas neste grupo. Mas esta hipótese pode ser descartada, pois rainhas miniaturas ocorrem naturalmente em outros grupos de abelhas sem ferrão.

5.7.2 Hipótese 2 - Falta do contexto colonial

O contexto colonial é um fator importante que varia de colônia para colônia e tem grande influência nas atividades que a sociedade desempenha, inclusive na produção de machos, rainhas e operárias, como já visto por Bego, 1982 na espécie *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica*. Na criação *in vitro* que fizemos em nossos experimentos, as larvas foram mantidas sem qualquer contato com as demais abelhas de sua colônia de origem; portanto o aparecimento de rainhas miniaturas no grupo que recebeu 32µl de alimento pode ter sido consequência dessa falta do contexto colonial em *S. aff. depilis*. Chama atenção também a alta produção de machos verificada (32,14%) neste mesmo grupo, sendo que em condições naturais esta porcentagem nunca foi atingida por nenhuma colônia de *S. postica* (Bego, 1982).

Apesar disso, esta hipótese precisa ser melhor trabalhada, porque isolamos da colônia de origem favos naturais contendo larvas bem jovens de *S. aff. depilis*, os quais foram mantidos nas mesmas condições que as placas em que criamos as larvas artificialmente, e nenhuma rainhas miniatura foi produzida, apenas nasceram machos, em porcentagens normais e operárias.

5.7.3 Hipótese 3 – Componentes bioativos

Alguns materiais que utilizamos em nosso dia-a-dia podem ser constituídos de compostos bioativos, ou seja, que continuam tendo atividade e atuam em diversas funções do metabolismo de animais. O bisfenol A (BPA) é um exemplo desse tipo de composto, o qual é utilizado em embalagem para alimentos, revestimento de recipiente de leite, tubulação plástica e até mesmo seladores dentais. Foi visto que alimentos ou líquidos que são armazenados em recipientes feitos com esta substância podem estar contaminados e, dependendo da quantidade, pode causar anomalias cromossômicas e ter diversos efeitos no desenvolvimento de animais, inclusive na formação morfológica dos

órgãos sexuais do feto (vom Saal et al., 1998; Palanza et al., 2002; Kubo et al., 2003 *apud* Gilbert, 2006).

Outra explicação para a produção de rainhas no grupo que recebeu 32µl de alimento pode ser o efeito do material utilizado para a criação *in vitro* das larvas de *S. aff. depilis*, que foi o acrílico, polimetil 2-metilpropenoato (PMMA). Este composto pode conter substâncias bioativas, as quais podem ter interferido na determinação de castas e sexo das mesmas.

Esta hipótese é ainda reforçada se compararmos nossos resultados com os obtidos por Camargo (1972), pois a quantidade mínima necessária para a produção de rainhas naquele trabalho foi 120mm³, ou seja, muito acima do que as larvas que deram origem às rainhas miniaturas consumiram. Além disso, outros autores (Hartfelder & Engles, 1992) também criaram abelhas *in vitro* de *S. postica*, e neste caso, as células de cria artificiais utilizadas eram de cera e não encontraram rainhas miniaturas.

5.7.4 Hipótese 4 – Auto determinação de castas em situações de estresse

Esta hipótese defende a ideia de que quando as abelhas percebem estar em situações que coloquem em risco a sua sobrevivência, elas mesmas, através da auto determinação de castas (Bourke & Ratnieks, 1999), escolhem seu destino.

Apesar de todo o cuidado em tentar reproduzir fielmente o ambiente natural, a criação *in vitro* pode apresentar diversas variações que devem ser consideradas, como por exemplo, a temperatura e umidade dentro da estufa elas são fixadas, mas naturalmente devem variar dentro de uma colônia. Estes e outros fatores, juntamente com a baixa quantidade de alimento (32µl), que foi oferecida ao grupo que apresentou as rainhas miniaturas, podem ter significado uma situação de estresse a colônia, e algumas larvas deram origem a rainhas (as miniaturas) e outras em operárias, garantindo assim, o sucesso da colônia.

6. CONCLUSÃO

Através desse estudo, pode-se concluir que:

- Em condições experimentais, a quantidade média de alimento encontrada em células de cria naturais de operárias (32µl) pode dar origem a rainhas miniaturas;
- Larvas que receberam 32µl de alimento larval apresentaram níveis mais baixos de *dnmt-3*mRNA em todos os estágios analisados, exceto em PP;
- Os títulos de HJ foram maiores no grupo das rainhas no estágio LD;
- Os níveis de transcritos de *jhe* e *jheh* nos dois grupos experimentais não variaram durante os estágios analisados, exceto no estágio LD, que dentro do grupo das rainhas apresentou um aumento de expressão. Concluimos ainda, que HJ induz a expressão do gene *jhe* na espécie estudada.
- O gene *mfe* apresentou um pico de expressão no estágio LPD, no grupo que recebeu 130µl de alimento larval;
- Os níveis de mRNA do gene *hmgr* foram menores no grupo que recebeu 32µl de alimento larval em todos os estágios analisados; apesar disso, a expressão desse gene não variou dentro de cada um dos grupos, ao longo dos estágios do desenvolvimento analisados.
- Os níveis de *EcR* são controlados pela ecdisona, e que os de *usp* estão relacionados aos títulos de HJ. A expressão desses dois genes foi maior no grupo que recebeu 130µl de alimento, após a alimentação, em LPD e LD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla, F. C. 2006. Morphological, Chemical and Developmental Aspects of the Dufour Gland in some Eusocial bees (Hymenoptera, Apidae): a review. **Rev. Bras. de Entomol.**, 50 (4): 153-162.
- Barchuk, A. R.; Maleszka, R.; Simões, Z. L. P. 2004. *Apis mellifera* ultraspiracle: cDNA sequence and rapid up-regulation by juvenile hormone. **Insect Molecular Biology**, 13(5): 459-467.
- Barchuk, A. R.; Cristino, A. S.; Kucharski, R.; Costa, L. F.; Simões, Z. L. P.; Maleszka, R. 2007. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. **BMC Developmental Biology**, 7 (70).
- Beetsma, J. 1979. The process of queen-worker differentiation in the honeybee. **Bee World**, 60: 24-39.
- Bellés, X.; Martín, D.; Piulachs, M. D. 2005. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. **Annu. Rev. Entomol.**, 50: 181–199.
- Bonetti, A. M, Kerr, W. E, Matusita, S. H. 1995. Effects of juvenile hormones I, II and III, in single and fractionated dosage in *Melipona* bees. *Rev. Bras. Biol.*, 55(1): 113-120.
- Bourke, A. F. G. & Ratnieks, F. L. W. 1999. Kin conflict over caste determination in social Hymenoptera, *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 46: 287–297.
- Buschini, M. L. & Campos, L. A. O. 1991. Influência da alimentação e hormônio juvenil na determinação das castas em "*Trigona spinipes*" (Hymenoptera, Apidae). In: **Anais da 43ª reunião da SBPC**, Rio de Janeiro, RJ.
- Camargo, J. M. F.; Kerr, W.E. & Lopes C. R. 1967. Morfologia externa de *Melipona* (*Melipona*) *marginata* Lepeletier (Hymenoptera, Apoidea). **Pap. Av. Zool.**, 20 (20): 229-58.
- Camargo, C. A. 1972a. Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Bras. Biol.**, 32(1): 133-138.
- Camargo, C. A. 1972b. Produção "in vitro" de intercastas em *Scaptotrigona postica* Latreille. (Hymenoptera, Apidae). In: Homenagem à W. E. Kerr: 37-45.

- Campos, L. A. O. & Costa, M. A. 1989. Determinação do sexo em abelhas. XXVIII. Determinação das castas em *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Bras. Biol.**, 49: 706.
- Campos, L. A. O.; Velthuis-Kluppell, F. M.; Velthuis, H. H. W. 1975. Juvenile Hormone and caste determination in a stingless bee. **Die Naturwissenschaften**, 62 (2): 98-99.
- Campos, L. A. O. 1979a. Determinação do sexo nas abelhas. XIV. Papel do hormônio juvenil na diferenciação das castas na sub-familia Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). **Ver. Bras. de Biol.**, 39 (4): 965-971.
- Campos, L. A. O. 1979b. Determinação do sexo nas abelhas. XIII. Determinação das castas em "*Partamona cupira*" (Hymenoptera, Apidae): papel hormônio juvenil. **Ciência e Cultura**, 31 (1): 65-69.
- Capella, I. C. S. & Hartfelder, K. 1998. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. **Journal of Insect Biology**, 44: 385-391.
- Capella, I. C. S. & Hartfelder, K. 2002. Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honey bee ovary. **Cell Tissue Res**, 307: 265–272.
- Cristino, A. D. S.; Nunes, F. M. F.; Lobo, C. H.; Bitondi, M. M. G.; Simões, Z. L. P.; Costa, L. D. F.; Lattorff, H. M. G.; Moritz, R. F. A; Evans, J. D.; Hartfelder, K. 2006. Caste development and reproduction – a genome-wide analysis of hallmarks of insects eusociality. **Insect Mol. Biol.**, 15: 703-714.
- Dedej, S.; Hartfelder, K.; Aumeier, P.; Rosenkranz, P.; Engels, W. 1998. Caste determination is a sequential process: effect of larval age at on ovariole number, hind leg size and cephalic volatiles in the honey bee (*Apis mellifera carnica*). **J. Apic. Res.**, 37: 187-190.
- de Kort, C. D. A. & Granger, N.A. 1996. Regulation of JH titers: The relevance of degradative enzymes and binding proteins. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 33: 1-26.

- de Wilde, J. & Beetsma, J. 1982. The physiology of caste development in social insects. **Adv. Insect Physiol.**, 16: 167-256.
- Edgar, B., A. 2006. How flies get their size: genetics meets physiology. **Nature Rev. Genectics**, 7(12): 907-916.
- Engels, W. & Imperatriz-Fonseca, V.L. 1990. Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. In: W. Engles (ed) **Social Insects: an evolutionary approach to castes and reproduction**. Springer Verlag, Berlim, 158-230 p.
- Gilbert, S. F. 2006. **Developmental Biology**. 8ª edição. Sinauer, USA.
- Grebe, M.; Przibilla, S.; Henrich, V.C.; Spindler-Barth, M. 2003. Characterization of the Ligand-Binding Domain of the Ecdysteroid Receptor from *Drosophila Melanogaster*. **Biol. Chem.**, 384: 105 – 116.
- Hammock, B. D. 1985. Regulation of juvenile hormone titer: degradation. In: Kerkut GA, Gilbert LI (eds) **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, vol 7. Pergamon, Oxford, 431–472 p.
- Hartfelder, K. & Rembold, H. 1991. Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. **J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.**, 160: 617-620.
- Hartfelder, K.; Makert, G. R.; Judice, C.C.; Pereira, G.A.G.; Santana, W.C.; Dallacqua, R.; Bitondi, M.M.G. 2006. Physiological and genetic mechanism underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidologie**, 37: 144-163.
- Hinton, A. C. & Hammock, B. D. 2001. Purification of juvenile hormone esterase and molecular cloning of the cDNA from *Manduca sexta*. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, 32: 57-66.

- Ismail, S. M.; Satyanarayana, K.; Bradfield, J. Y.; Dahm, D.H.; Bhaskaran, G. 1998. Juvenile hormone acid: evidence for a hormonal fat body of the bean bug, *Riptortus clavatus* by mRNA differential display. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 28: 181-189.
- Ismail, S. M.; Goin, C.; Muthumani, K.; Kim, M.; Dahm, K. 2000. Juvenile hormone acid and ecdysteroid together induce competence for metamorphosis of the Verson's gland in *Manduca sexta*. **J. Insect Physiol.**, 46: 59-68.
- Kerr, W. E. 1946. Formação das castas no gênero *Melipona* (Illiger 1806) **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, 3: 299-312.
- Kerr, W. E. 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. In: **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" USP**, 5 (88): 181-226.
- Kerr, W. E. 1950. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. **Genetics**, 35: 143-152.
- Kerr, W. E.; Carvalho, G. A.; Nascimento, V. A. 1996. **Uruçu: biologia, manejo e conservação**. Ed. Fundação Acangaú. Belo Horizonte, 144p.
- Koelle, M. R.; Talbot, W. S.; Segraves, W. A.; Bender, M. T.; Cherbas, P.; Hogness, D. S. 1991. The *Drosophila EcR* gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. **Cell**, 67: 59-77.
- Kucharski, R.; Maleszka, J.; Foret, S.; Maleszka, R. 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. **Science**, 319(5871):1827-30.
- Lezzi, M.; Bergman, T.; Henrich, V. C.; Vogtli, M.; Fromel, C.; Grebe, M.; Przibilla, S.; Spindler-Barth, M. 2002. Ligand induced heterodimerization between the ligand binding domains of the *Drosophila* ecdysteroid receptor and ultraspiracle. **Eur. J. Biochem.**, 269: 3237-3245.
- Mateus, S. & Zucchi, R. 2002. Ocorrência de intercastas adultas em colônias de *Melipona seminigra*: aspectos morfo-etológicos preliminares (Hymenoptera, Apidae, Meliponini. In: **Anais do V Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto**. 211-216p.

- Maxwell, R. A.; Weleh, W. H.; Schooley, D. A. 2002a. Juvenile hormone kinase I. Purification, characterization, and substrate specificity of juvenile hormone-selective diol kinase from *Manduca sexta*. **J. Biol. Chem.**, 277: 21874–21881.
- Maxwell, R. A.; Weleh, W. H.; Horodyski, F. M.; Schegg, K. M.; Schooley, D. A. 2002b. Juvenile hormone kinase II. Sequencing, cloning, and molecular modeling of juvenile hormone-selective diol kinase from *Manduca sexta*. **J. Biol. Chem.**, 277: 21882–21890.
- Michellete, E. R. F. & 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 bee: a comparative study**. Belknap, Harvard University Press, Cambridge.
- Mirth, C., K. & Riddiford, L., M. 2007. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. **Bioassays**, 29: 344-355.
- Moo-Vale, H.; Quezada-Euán, J. J. G.; Canto-Martín, J.; Gonzalez-Acereto, J. A. 2004. Caste ontogeny and the distribution of reproductive cells on the combs of *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini). **Apidologie**, 35: 587–594.
- Moure, J. S. 1942. Abelhas de Salobra (Hym. Apoidea). Papéis Avulsos (SP), 2 (21): 291-321.
- Nijhout, H. F. 1994. **Insects hormones**. Princeton University Press, New Jersey.
- Nijhout, H. F. & Wheeler, D. E. 1982. Juvenile hormone and physiological basis of insect polymorphism. **Quarterly Review Biol.**, 57: 109-133.
- Palli, S. R.; Hormann, R. E.; Schlattner, U.; Lezzi, M. 2005. Ecdysteroid receptors and their applications in agriculture and medicine. **Vitam Horms**, 73: 59-100.
- Patrick, C. W. Jr; Zheng, B.; Wu, X.; Gurtner, G.; Barlow, M.; Koutz, C.; Chang, D.; Schmidt, M.; Evans, G.R. 2001. Muristerone a-induced nerve growth factor release from genetically engineered human dermal fibroblasts for peripheral nerve tissue

- engineering. **Tissue Eng.**, 7: 303-311.
- Paulino-Simões, Z. L.; Boleli, I. C.; Hartfelder, K. 1997. Occurrence of a prothoracicotropic hormone-like peptide in the developing nervous system of the honeybee (*Apis mellifera*). **Apidologie**, 28: 399-409.
- Rachinsky, A. 1994. Octopamine and serotonin influence on *corpora allata* activity in honeybee (*Apis mellifera*) larvae. **J. Insect Physiol.**, 40: 549-554.
- Rachinsky, A.; Strambi, C.; Strambi, A.; 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.
- Ratnieks, F. L. W. 1995. Evidence for a queen-produced egg-marking pheromone and its use in worker policing in the honey-bee. **J. of apicultural research**, 34(1): 31-37.
- Rembold, H. 1987. Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. **Insect Biochem.**, 17: 1003-1006.
- Riddiford, L. M. 1985. Hormone action at the cellular level. In Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (eds). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**, Vol 8. Pergamon Press, Oxford, pp 37-83.
- Roubik, D. W. 2006. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, 37(2): 124-143.
- Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. N. York.
- Sakagami, S. F. 1982. Stingless bees. In: **Social Insects**. Vol.3 Ed. Hermann, H. R., Academic Press, New York, USA, PP 362-376.
- Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **PNAS**, 74: 5463.
- Shingleton, A. W. 2005 Body-size regulation combining genetics and physiology. **Current Biology**, 15(20).

- Teles, A. C. A. S.; Mello, T. R. P.; Barhuk, A. R.; Simões, Z. L. P. 2007. *Ultraspiracle* of de stingless bees *Melipona scutellaris* and *Scaptotrigona depilis*: cDNA sequence and expression profiles during pupal development. **Apidologie**, 38: 462-471.
- Velthuis, H. H. W. & Velthuis-Kluppel, F. M. 1995. Caste differences in a stingless bee, *Melipona quadrifasciata* Lep., influenced by juvenile hormone application. **Proc. Kon. Ned. Akad. Wt**, 78:81-94.
- Wheeler, D. E.; Buck, N.; Evans, J. D. 2006. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. **Insect Mol. Biol.**, 15: 597-602.
- Wilson, E. O. 1971. **The Insects Societies**. Belknap, Harvard University Press, Cambridge.
- Winston, M. L. 1987. **The biology of the Honey Bee**. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Yao, T.P.; Sagraves, W. A.; McKeown, M.; Evans, R.M. 1992. *Drosophila ultraspiracle* modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. **Cell** 71: 63-72.
- Yao T. P., Forman B. M., Jiang Z., Cherbas L., Chen J. D., McKeown M., Cherbas P., Evans R. M. 1993. Functional ecdysone receptor is the product of *EcR* and *Ultraspiracle* genes. **Nature**, 366: 476-479.

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](#)