

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Perfil de expressão dos genes da cascata de determinação e diferenciação sexual no desenvolvimento embrionário e larval de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae).**

**FLÁVIA CRISTINA DE PAULA FREITAS**

**RIBEIRÃO PRETO, SP  
– 2010 –**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**FLÁVIA CRISTINA DE PAULA FREITAS**

**Perfil de expressão dos genes da cascata de determinação e diferenciação sexual no desenvolvimento embrionário e larval de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae).**

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

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

RIBEIRÃO PRETO, SP  
– 2010 –

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

Freitas, Flávia Cristina de Paula

Perfil de expressão dos genes da cascata de determinação e  
diferenciação sexual no desenvolvimento embrionário e larval de  
*Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae).

– Ribeirão Preto, 2010.

90 p. : il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Simões, Zilá Luz Paulino

1. *Apis mellifera*. 2. Determinação do sexo. 3. Expressão gênica. 4.  
Diferenciação sexual. 5. *doublesex*.

**PARECER DA BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Parecer: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Parecer: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Parecer: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Ribeirão Preto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2010.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, João e Milza, pelo comprometimento com que me educaram, pela dedicação com que me ajudaram em algumas etapas deste trabalho e, principalmente, por todo o amor que experimento todos os dias ao lado deles.*

*A minha irmã Fernanda pela amizade e amor.*

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível graças a muitas mãos que me foram estendidas. Gostaria de deixar registrados meus agradecimentos:

À Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões pela delicadeza e cuidado com que conduziu minha orientação, pelas conversas agradáveis e discussões produtivas. Agradeço-a também por me ensinar muito sobre abelhas, sobre genética e sobre tantos outros assuntos que contribuíram para meu crescimento pessoal.

À Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi pela gentileza com que responde as minhas dúvidas, pela amizade e confiança.

Ao Dr. Alexandre dos Santos Cristino pela co-orientação, pelos desafios propostos que contribuíram para o meu crescimento profissional e por me ensinar o quão encantador pode ser o estudo sobre os mecanismos de determinação e diferenciação sexual nas abelhas.

Ao Dr. Francis de Moraes Franco Nunes pelo apoio irrestrito, pela paciência e dedicação com que me ajudou durante a realização deste trabalho e, principalmente, pela amizade e pelas conversas produtivas e divertidas.

Aos técnicos Luiz Roberto Aguiar, pelas inúmeras posturas controladas e pelo manejo das colônias de abelhas e Pedro de Assis Caetano pelas sugestões preciosas.

À Vera Lucia Castelo Figueiredo, por toda a paciência com que me ajudou durante os experimentos e pela companhia sempre divertida.

À Profa. Dra. Nádia Monesi pelo suporte e discussões sobre técnicas de manipulação de embriões.

Aos colegas que me ajudaram, de alguma forma, neste trabalho: Aline Aleixo, Tathiana Mello, Francis Nunes, Ana Bomtorin, Gisele Cabral, Fernanda Torres e Anete Lourenço.

A todos os colegas do bloco A pela companhia diária, em especial agradeço pela amizade: Aline Aleixo, Ana Bomtorin, Claudinéia Pereira, Fernanda Torres, Guaracini Lotério, Liliane Macedo, Lívia Moda, Marcela Lauren, Michelle Soares, Moysés Neto, Omar Martinez, Rodrigo Dallacqua, Tathiana Mello, Vanessa Bonatti e Giovana Leandro.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares pela oportunidade de fazer parte deste programa e pelas oportunidades de crescimento profissional e à Susie Adriana Penha Nalon por toda a atenção e gentileza com que me ajudou.

Às agências financiadoras Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e, em especial, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

*“Quer achemos espantoso ou plausível que um pequeno mas altamente organizado grupo de átomos (cromossomo) seja capaz de agir dessa forma, a situação não tem precedentes, sendo desconhecida em qualquer outro lugar além da matéria viva”*

(Erwin Schrödinger)

## RESUMO

### **Perfil de expressão dos genes da cascata de determinação e diferenciação sexual no desenvolvimento embrionário e larval de *Apis mellifera*.**

A determinação do sexo é um dos principais eventos do desenvolvimento em metazoários superiores. Após a decisão do destino sexual, inicia-se a diferenciação que determina características morfológicas, fisiológicas e comportamentais. O sinal inicial varia entre os grupos, mas os sinais terminais são conservados entre os metazoários. *doublesex* está entre os genes mais conservados da cascata de determinação do sexo em insetos. Este gene codifica um fator de transcrição do tipo *zinc-finger* que regula a transcrição sexo-específica de vários genes-alvo. Em *Apis mellifera*, o sinal inicial da cascata de determinação do sexo é resultante da composição alélica do gene *complementary sex determiner (csd)*: se o embrião em desenvolvimento for heterozigoto, desenvolve-se em fêmea, se for hemizigoto ou homozigoto, desenvolve-se em macho. O produto do gene *csd* regula o processamento do pré-mRNA do gene *feminizer (fem)*, que apresenta transcritos sexo-específicos. Acredita-se que o gene *fem* esteja envolvido na regulação do processamento dos transcritos do gene *amdsx*. Em insetos, o pré-mRNA de *dsx* sofre processamento alternativo nos sexos que determina variações na estrutura do fator de transcrição DSX e consequente regulação diferencial em machos e fêmeas. Faltam evidências, no entanto, para determinação da função do *dsx* em abelhas, em particular sobre a expressão desse gene e de outros genes envolvidos na cascata de determinação sexual. Assim, o objetivo deste trabalho foi a caracterização da expressão das variantes de *amdsx* e outros genes da cascata de determinação e diferenciação sexual (*csd*, *fem*, *dachshund* and *intersex*) no desenvolvimento embrionário e larval. De modo geral, os genes estudados apresentam perfis de expressão antagônicos nos sexos e castas. Nossos resultados se contrapõem à ideia da expressão sexo-específica das variantes do gene *amdsx*. É possível dizer que os genes aqui estudados, em especial no desenvolvimento embrionário, apresentam expressão sexualmente dimórfica. Nossos dados sugerem, portanto, que a diferenciação sexual em abelhas ocorre pela expressão diferencial dos genes.

## ABSTRACT

### **Expression profile of sex-determining genes in embryonic and larval development of *Apis mellifera***

Sex determination is one of the major developmental events in higher metazoans. After the decision of sexual cell fate, sexual differentiation initiates and determines many morphological, physiological and behavioral traits. The initial signals in the sex determination pathway vary, but the terminal signals are conserved throughout the metazoan phyla. *doublesex (dsx)* is among the most highly conserved genes in the sex determination cascade in insects. It encodes a zinc-finger transcription factor which regulates sex-specific expression of many target genes. In honey bees, the primary sex-determining signal results from an allelic combination of the *complementary sex determiner (csd)* gene: males develop from hemi- or homozygous embryos, whereas females develop from heterozygous ones. *Csd* controls the splicing of *feminizer* mRNA resulting in two sex-specific transcripts. The *fem* gene product itself supposedly regulates the splicing of *amdsx* transcripts. In insects, the pre-mRNA of *dsx* undergoes alternative splicing giving rise to sex-specific variants in DSX protein structure. These then are held responsible for differential regulation of gene expression patterns between the sexes. Up till now there are still many open questions concerning the function of *amdsx* splice variants and of other sex determining genes in honey bees. Thus, our goal was to characterize the expression of *amdsx* variants and other sex-determining genes expression (*csd*, *fem*, *dachshund* and *intersex*) during embryonic and larval development. In general, the genes studied have antagonistic expression profiles in sexes and castes of *A. mellifera*. Our results oppose the idea of sex-specific expression of *amdsx* variants. We could show that the expression profiles of these sex-determining genes are sexually dimorphic, especially during embryonic development, indicating that these genes indeed play a role in sexual differentiation in this insect.

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 – <u>Motivação</u> .....	14
1.2 – <u>Determinação do sexo</u> .....	14
1.2.1 – <b>Determinação do sexo entre os insetos</b> .....	16
1.3 – <u>As abelhas <i>Apis mellifera</i></u> .....	19
1.3.1 – <b>Biologia de <i>Apis mellifera</i></b> .....	19
1.3.2 – <b>Ciclo de vida de <i>Apis mellifera</i></b> .....	21
<b>2 – OBJETIVO .....</b>	<b>29</b>
<b>3 – MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
3.1 – <u>Análise computacional dos genes de determinação e diferenciação sexual em <i>Apis mellifera</i></u> .....	32
3.1.1 – <b>Aquisição de dados das sequências gênicas analisadas</b> .....	32
3.1.2 – <b>Anotação dos genes da cascata de determinação e diferenciação sexual em <i>Apis mellifera</i></b> .....	32
3.1.3 – <b>Desenho dos iniciadores</b> .....	34
3.1.4 – <b>Busca por domínios conservados nos genes estudados</b> .....	34
3.2 – <u>Análise dos níveis de transcritos dos genes da cascata de determinação e diferenciação sexual de <i>Apis mellifera</i></u> .....	35
3.2.1 – <b>Coleta de material biológico</b> .....	35
3.2.2 – <b>Extração do RNA total</b> .....	37
3.2.3 – <b>Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</b> .....	39
3.2.4 – <b>Clonagem e Sequenciamento</b> .....	40
3.2.5 – <b>Padronização dos iniciadores por PCR em tempo real</b> .....	42
3.2.6 – <b>Análise estatística dos dados de expressão quantitativa</b> .....	43
3.3 – <u>Tratamento com Hormônio Juvenil</u> .....	44
3.3.1 – <b>Análise estatística dos dados de expressão quantitativa</b> .....	44
<b>4 – RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>

4.1 – <u>Cr�terios para classifica�o dos est�gios iniciais do desenvolvimento larval de zang�es</u> .....	47
4.2 – <u>An�lise computacional dos genes da cascata de determina�o e diferencia�o sexual em <i>Apis mellifera</i></u> .....	49
4.2.1 – <b>Anota�o das variantes genes da cascata de determina�o e diferencia�o sexual em <i>Apis mellifera</i></b> .....	49
4.2.2 – <b>Dom�nios conservados nos genes estudados</b> .....	49
4.3 – <u>Express�o das variantes <i>amdsxM</i> e <i>amdsxF1</i> em f�meas e machos de <i>Apis mellifera</i></u> .....	54
4.4 – <u>Perfis de transcri�o dos genes da cascata de determina�o e diferencia�o sexual de <i>Apis mellifera</i></u> .....	57
4.4.1 – <i>Complementary sex determiner</i> .....	57
4.4.2 – <i>Feminizer</i> .....	59
4.4.3 – <i>Doublesex</i> .....	61
4.4.4 – <i>Intersex</i> .....	65
4.4.5 – <i>Dachshund</i> .....	67
4.4.6 – <b>Correla�o entre os perfis de express�o</b> .....	69
<b>5 – CONCLUS�ES</b> .....	<b>76</b>
<b>6 – PERSPECTIVAS</b> .....	<b>78</b>
<b>7 – REFER�NCIAS BIBLIOGR�FICAS</b> .....	<b>80</b>

# Introdução

---



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Motivação

As cascatas de regulação gênica são sistemas que controlam a transcrição do DNA pela transmissão de sinais bioquímicos e conectam os três principais componentes celulares: membrana, citoplasma e núcleo. Essas vias de transmissão de sinais são fundamentais para a formação e manutenção de tecidos e órgãos dos organismos multicelulares. A compreensão de mecanismos celulares envolvidos na transcrição gênica desperta o interesse da comunidade científica pelo seu potencial de aplicação nas áreas de saúde e no avanço conceitual em biologia teórica. Entender a integração das instruções genéticas e dos sinais bioquímicos para a formação de um tecido específico é crítico nos estudos com células-tronco, por exemplo. Nesta direção, importantes resultados culminaram de estudo em organismos modelo e descoberta de marcadores fenotípicos, tais como: a formação do cristalino do olho em vertebrados (Saha *et al.*, 1989; Grainger 1992; Li *et al.*, 1994; Cvekl e Tamm 2004), a assimetria entre os lados esquerdo e direito do corpo dos mamíferos (Hummel e Chapman 1959; Layton 1976; Yokoyama *et al.*, 1993), a determinação do eixo ântero-posterior em *Drosophila* (Stephanson *et al.*, 1988; Ray e Schüpbach 1996; Peri *et al.*, 1999) e a determinação e manutenção de fenótipos sexuais em metazoários (Sanchez e Guerrero, 2001; Keisman e Baker, 2001; Kopp *et al.*, 2000; Meng *et al.*, 1999; Beye, 2004), entre outros.

## 1.2. Determinação do sexo

Como o sexo de um organismo em desenvolvimento é determinado? Esta é uma questão intrigante e que instiga pesquisadores desde a antiguidade. Os primeiros registros que revelam tal curiosidade a cerca da determinação do sexo são do filósofo Aristóteles e datam de, aproximadamente, 335 a.C.. Desde então, muitos estudiosos se dedicaram a entender esse

evento, que tem o potencial de formar dois fenótipos cujas características os tornam especializados na perpetuação da espécie.

Após a decisão do destino sexual do organismo, inicia-se a diferenciação sexual, ou seja, são ativadas vias que determinam diferencialmente aspectos da morfologia, fisiologia e comportamento em machos e fêmeas. Os metazoários apresentam uma grande variedade de mecanismos por meio dos quais o sexo do embrião em desenvolvimento é decidido (Bull, 1983). Os genes no topo da via reguladora da determinação do sexo são responsáveis pela sinalização inicial que define a identidade sexual do organismo e são pouco conservados, mesmo em espécies evolutivamente próximas. Em contraste, os genes terminais ou na base desta hierarquia, são responsáveis por direcionar e manter os diferentes aspectos da diferenciação sexual, e são bem conservados em diferentes espécies de metazoários (Cline e Meyer, 1996; Marín *et al.*, 1998; Waterbury *et al.*, 1999).

Os mecanismos de determinação do sexo têm sido caracterizados em várias espécies de metazoários, dentre os quais se destacam o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Brenner 1974; Shen e Hodgkin 1988; Mason *et al.*, 2008), vertebrados como *Homo sapiens* (Sinclair *et al.*, 1990; Giese *et al.*, 1992; Pontiggia *et al.*, 1994; Werner *et al.*, 1995), *Mus musculus* (Koopman *et al.*, 1991; Barrionuevo *et al.*, 2006) e *Danio rerio* (Meng *et al.*, 1999) e os insetos. O conhecimento sobre a determinação do sexo entre o diverso grupo dos insetos é baseado em estudos com as espécies *Drosophila melanogaster* (Bridges, 1921; Bridges 1925; Burtis *et al.*, 1991), *Ochlerotatus atropalpus* (Jinwal *et al.*, 2006), *Musca domestica* (Hediger *et al.*, 2004), *Megaselia scalaris* (Kuhn *et al.*, 2000), *Bombyx mori* (Hashimoto, 1933 citado em Fujii e Shimada, 2007; Suzuki *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2005), *Anastrepha* (Ruiz *et al.*, 2007) e *Apis mellifera* (Dzierzon, 1845 citado em Herrmann *et al.*, 2005; Beye *et al.*, 2003. Beye, 2004; Cristino *et al.*, 2006a; Cho *et al.*, 2007; Hasselmann *et*

*al.*, 2008; Gempe *et al.*, 2009) e *Nasonia vitripennis* (Beukeboom *et al.*, 2007 ; Oliveira *et al.*, 2009; Bertossa *et al.*, 2009).

### 1.2.1. Determinação do sexo entre os insetos

Diferentes mecanismos moleculares envolvidos na determinação do sexo têm sido caracterizados entre os insetos. Em *Bombyx mori* (Lepidoptera), os sexos são determinados pela presença dos cromossomos sexuais ZW, em que os machos são homogaméticos (ZZ) e as fêmeas heterogaméticas (ZW). O sexo feminino no bicho-da-seda é determinado por fatores dominantes presentes no cromossomo W (Hashimoto, 1933 citado em Fujii e Shimada, 2007). Nas espécies de moscas pertencentes aos gêneros *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Anastrepha* e *Musca*, as fêmeas apresentam duas cópias do cromossomo sexual X (XX) e os machos possuem um cromossomo X e um Y (XY). Nessas moscas, o cromossomo Y carrega fatores determinantes do sexo masculino (Sanchez, 2008). Embora o sexo da mosca-das-frutas *D. melanogaster* também seja determinado pelo sistema de cromossomos sexuais XY (fêmeas são XX e machos são XY), a presença do cromossomo Y não define a identidade sexual dos machos. Em *Drosophila melanogaster* o sinal inicial da cascata de determinação do sexo é a razão X:A. Se a razão X:A for igual a um (2X:2A) ocorre o desenvolvimento de fêmeas; se a razão X:A resultar em 0,5 (1X:2A), os zigotos em desenvolvimento serão machos (Bridges, 1921; Bridges1925).

Nos himenópteros, a arrenotoquia predomina como modo de reprodução, ou seja, os machos se originam de ovos não fertilizados (e, portanto, são haplóides) e as fêmeas de ovos fertilizados (diplóides) (Dzierzon, 1845 citado em Herrmann *et al.*, 2005). Na espécie *Apis mellifera*, não é a ploidia que determina o sexo, mas a composição alélica do gene *complementary sex determiner (csd)*. Se o organismo em desenvolvimento for heterozigoto

(diplóide) para o gene *csd*, desenvolve-se uma fêmea. Caso o organismo seja hemizigoto ou homozigoto para o *csd* (haplóide ou diplóide, respectivamente) ocorre o desenvolvimento de um macho (Beye *et al.*, 2003; Beye, 2004). No entanto, em *A. mellifera*, os machos diplóides não chegam a fase adulta em condições naturais, pois são mortos pelas operárias assim que eclodem (Woyke, 1967 citado em Herrmann *et al.*, 2005).

Dentre as cascatas de determinação do sexo descritas para insetos, a mais bem caracterizada é de *D. melanogaster*. A razão X:A regula a transcrição do gene *Sex-lethal (Sxl)* (Salz *et al.*, 1989). SXL é ativo apenas em fêmeas e regula o processamento dos mRNAs dos genes *transformer (tra)* e *transformer-2 (tra-2)*. Tra e Tra-2 se ligam a elementos *dsxRE* (repetições da sequência (T/A)C(T/A)(T/A)C(A/G)ATCAACA) presentes nos exons fêmea-específicos de *doublesex (dsx)* e *fruitless (fru)* (Hedley e Maniatis, 1991; Heinrichs *et al.*, 1998).

*dsx* está entre os genes mais conservados no processo de diferenciação dos sexos em insetos. Ele ocupa a base da hierarquia reguladora dos genes envolvidos na diferenciação sexual somática (Burtis *et al.*, 1991). O gene *dsx* codifica um fator de transcrição do tipo *zinc-finger (DSX)*, que regula a transcrição sexo-específica de vários genes-alvo (Burtis *et al.*, 1991). O processamento sexo-específico do pré-mRNA do gene *dsx* foi minuciosamente descrito em *D. melanogaster* (Burtis *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 2005; Jinwal *et al.*, 2006), *Bombyx mori* (Suzuki *et al.*, 2005), *Musca domestica* (Hediger *et al.*, 2004), *Ceratitis capitata* (Graham *et al.*, 2002) e *Bactrocera tryoni* (Shearman e Frommer, 1998).

Uma das funções caracterizadas do DSX é a regulação da expressão das proteínas de estocagem em *D. melanogaster* (*yolk protein-1* e *yolk protein-2*; Burtis *et al.*, 1991), em *B. mori* (vitelogenina e *hexamerin storage protein 1* fêmea-específica; Suzuki, *et al.*, 2003) e no mosquito *Ochlerotatus atropalpus* (*hexamerina 1.2*; Jinwal *et al.*, 2006). Além disso, sabe-se

que *dsx* controla indiretamente a expressão sexo-específica do gene *dachshund* (*dac*) no disco genital de *D. melanogaster* (Keisman e Baker, 2001; Estrada e Sanchez-Herrero, 2001). Em fêmeas de *D. melanogaster*, a isoforma fêmea-específica DSXF atua em conjunto com produtos do gene *intersex* (*ix*), que codifica um ativador de transcrição (Garret-Engel *et al.*, 2002).

Uma análise computacional comparando duas espécies de insetos demonstrou que vários genes envolvidos na determinação do sexo de *D. melanogaster* estão conservados no genoma de *Apis mellifera* e evidências experimentais indicaram que o gene *dsx* é transcrito diferencialmente nos sexos de abelha (Cristino *et al.*, 2006a). Cho *et al.* (2007) confirmaram esse resultado e descreveram outras variações de mRNAs a partir da transcrição desse gene (a partir de agora, denominado *amdsx*): duas variantes exclusivas de fêmeas (*amdsxF1* e *amdsxF2*), uma exclusiva de macho (*amdsxM*) e uma presente em ambos os sexos (*amdsxB*). As variantes *amdsxF1* e *amdsxF2* diferem no comprimento da região 3' UTR: *amdsxF1* apresenta 3.359 pb e *amdsxF2*, 2.737pb, e ambas codificam a mesma proteína de 277 aminoácidos. A variante *amdsxM* possui 2.504 pb e codifica uma proteína de 336 aminoácidos e a variante *amdsxB*, 1.992 pb e produz uma proteína de 130 aminoácidos.

Hasselmann *et al.* (2008) sugerem que o gene *feminizer* (*fem*) de *A. mellifera* e o gene *tra* de *D. melanogaster* desempenhem funções equivalentes na determinação do sexo desses insetos. Os transcritos sexo-específicos do *fem* (*femF* e *femM*, em fêmeas e machos, respectivamente) foram caracterizados, demonstrando que o produto do gene *csd* regula o processamento do pré-mRNA do gene *fem*. Em seguida, Gempe *et al.* (2009) mostraram a expressão de *femM* nas fêmeas. Assim como o *tra* regula o processamento dos pré-mRNA de *dsx* em *D. melanogaster*, há indícios de que o gene *fem* exerça a mesma função em *A. mellifera*. Ensaio funcionais provaram que *fem* é essencial para o desenvolvimento das fêmeas, controlando o processamento dos transcritos do gene *amdsx* e a diferenciação das

células germinativas e somáticas das abelhas melíferas (Hasselmann *et al.*, 2008; Gempe *et al.*, 2009).

Ainda que os principais genes da cascata de determinação do sexo tenham sido descritos para *A. mellifera*, pouco é conhecido sobre seus perfis de expressão no desenvolvimento e sobre os mecanismos que resultam na formação das estruturas específicas de machos e fêmeas.

### 1.3. As abelhas *Apis mellifera*

As abelhas ditas africanizadas são resultantes da hibridação entre a subespécie *A. mellifera scutellata* e as abelhas européias (*A. mellifera ligustica*, *A. mellifera mellifera*, *A. mellifera carnica*, *A. mellifera caucasica*) (Kerr, 1967). As abelhas *A. mellifera* constituem um bom modelo para estudos de comportamento e melhoramento animal principalmente pela possibilidade de criação em larga escala e grande conhecimento sobre o manejo desta espécie. Nos últimos anos, *A. mellifera* ganhou destaque nos estudos de genética do desenvolvimento, amparados pela publicação do genoma dessa espécie (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). A disponibilidade das sequências genômicas facilita o emprego de diversas técnicas de biologia molecular para a espécie, associadas a análises e predições computacionais. Nessa direção, tornou-se bastante oportuno investigar um assunto singular como a determinação do sexo nessa abelha, em que esse assunto foi pouco explorado na ontogênese.

#### **1.3.1. Biologia de *Apis mellifera***

As abelhas são insetos sociais que vivem em colônias altamente organizadas, em que são encontrados três tipos de indivíduos: operárias, rainhas e zangões. As operárias realizam

tarefas variadas, enquanto as rainhas e os zangões exercem funções particularmente associadas à reprodução.

A função das rainhas e dos zangões é garantir a reprodução da espécie *A. mellifera*. As rainhas possuem ovários formados por 150 a 180 ovariolos e apresentam espermateca em forma globular que armazena o esperma dos zangões por 2 a 4 anos (em regiões temperadas; em regiões tropicais, até dois anos) após a cópula. Nos zangões, as estruturas envolvidas na orientação, vôo e acasalamento são altamente desenvolvidas. Os olhos compostos são maiores e as sensilas olfatórias estão presentes em maior número em relação às operárias. Tais estruturas são importantes na orientação visual e olfativa para encontrar a rainha durante o vôo e acasalar. O esperma é produzido pelos testículos e fica armazenado nas vesículas seminais até o acasalamento, quando será totalmente ejaculado com o muco produzido nas glândulas de muco (Snodgrass, 1984; revisado em Winston, 1987).

As operárias desempenham inúmeras tarefas tais como limpar os alvéolos, cuidar das crias, construir favos, guardar a colméia e forragear. O tipo de tarefa executada varia de acordo com a idade das operárias (polietismo etário). Estas tarefas são dependentes não só da idade, mas também de condições fisiológicas, tais como: níveis hormonais, composição da hemolinfa circulante e atividade glandular, bem como de caracteres morfológicos específicos das operárias. Entre as características morfológicas típicas das operárias estão a corbícula (expansão das tíbias das pernas traseiras), o ferrão (ovopositor modificado conectado à glândula de veneno), glândulas de cera e as glândulas hipofaríngeas (sintetizam geléia real). As operárias são fêmeas facultativamente estéreis, ao contrário das rainhas, apresentam apenas 2 a 12 ovariolos em seus ovários, que podem ser ativados na ausência da rainha. No entanto, operárias não podem acasalar, por terem o aparelho reprodutor modificado e a espermateca rudimentar, não podendo, portanto, armazenar espermatozóides (Snodgrass, 1984; revisado em Winston, 1987).

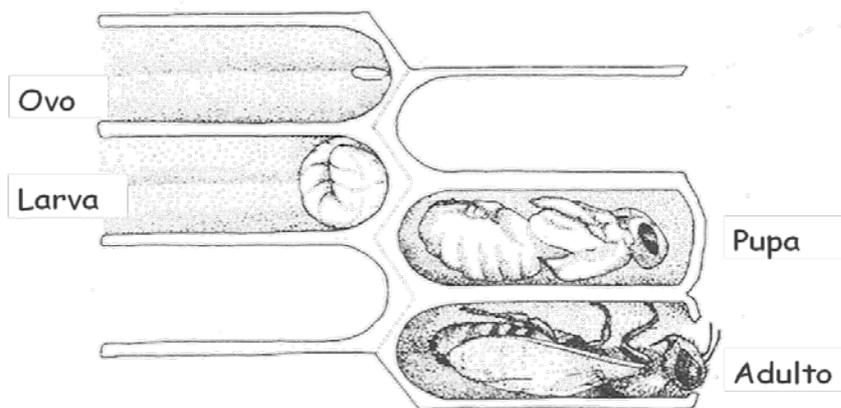
### 1.3.2. Ciclo de vida de *Apis mellifera*

As abelhas são insetos holometábolos (apresentam metamorfose completa), passando pelos estágios embrionário, larval, pupal e adulto (**Figura 1**).

A ovulação nas abelhas ocorre quando o ovócito está na metáfase da primeira divisão meiótica, a qual só se completa com a fecundação. No caso dos ovos haplóides que originam machos, as informações sobre os estímulos que disparam o desenvolvimento embrionário são ainda controversas (Snodgrass, 1984; revisado em Cruz-Landim, 2008).

Os ovos das abelhas apresentam o vitelo distribuído na região central do ovoplasma e por isso são classificados como ovos centrolécitos. Após o estímulo para iniciar o desenvolvimento (seja pelo espermatozóide nos ovos diplóides ou qualquer outro estímulo nos ovos haplóides), iniciam-se sucessivas divisões dos núcleos. A clivagem que ocorre nos embriões de abelhas é do tipo superficial, em que os núcleos resultantes das divisões mitóticas migram para o citoplasma periférico do ovo, formando um grande sincício. As divisões dos núcleos iniciam-se nas primeiras horas após a postura do ovo (APO) (Nelson, 1915). Depois do estabelecimento dos núcleos na periferia do ovo, as membranas plasmáticas se formam, isolando os núcleos e o citoplasma circundante, estabelecendo assim a blastoderme celular. O processo de celularização da blastoderme é bastante complexo (Nelson, 1915 e Fleig e Sander, 1985) e se completa 33 horas APO. Durante as próximas horas, inicia-se a gastrulação, em que movimentos celulares resultam na diferenciação dos folhetos germinativos: ecto-, meso- e endoderme. A gastrulação se completa 44 horas APO com a formação da banda germinativa na região ventral e a diferenciação da membrana serosa na região dorsal. Todas as estruturas do embrião se formam a partir da banda germinativa e a serosa é a uma membrana extra-embriônica e, portanto, não dará origem a nenhuma estrutura do embrião. A gastrulação e a fase da banda germinativa são momentos onde ocorrem eventos

críticos no desenvolvimento embrionário. Durante a extensão e posterior retração da banda germinativa, dispara-se a diferenciação das células que foram comprometidas durante a gastrulação. Nessa fase, que vai de 40 a 55 horas APO,



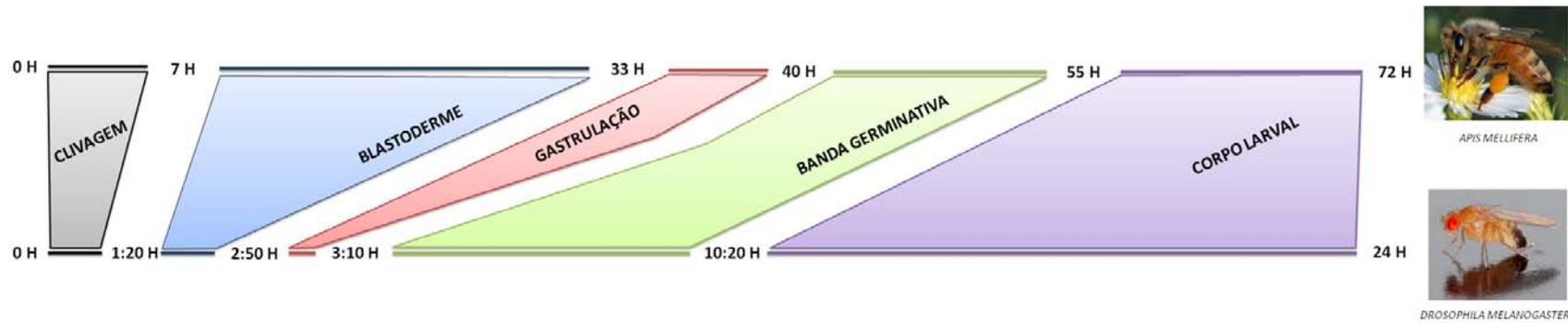
**Figura 1** – Fases do desenvolvimento de *Apis mellifera* (modificado de Winston, 1984).

inicia-se a diferenciação do sistema nervoso na linha mediana ventral do embrião, das estruturas ectodérmicas (como os apêndices bucais) e dos rudimentos do intestino médio, entre outros importantes eventos. A partir daí, o embrião passa por processos que resultam na formação do corpo da larva e na sua eclosão 72 horas APO. A **Figura 2** apresenta a duração das fases do desenvolvimento embrionário de *A. mellifera* em relação a *D. melanogaster*, cuja embriogênese acontece em 24 horas.

Após as 72 horas do período embrionário, as larvas eclodem do ovo e passam por um período caracterizado por intensa alimentação e crescimento, com quatro mudas (que designam os subestágios que vão de larva 1 (L1) a 5 (portanto: L2, L3, L4 e L5)).

As larvas fêmeas têm o potencial de originar tanto operárias como rainhas. Até o segundo estágio larval, as fêmeas são alimentadas com geléia real, que são secreções das glândulas hipofaríngeas de operárias nutridoras (Rachinsky *et al.*, 1990). A partir do terceiro estágio larval a quantidade e a qualidade do alimento oferecido determinam o destino das

fêmeas. A larva que originará a rainha continua sendo alimentada com geléia real, enquanto as futuras operárias recebem um alimento com menor proporção de geléia real: uma mistura de geléia real, mel e pólen. Essa alimentação diferencial é



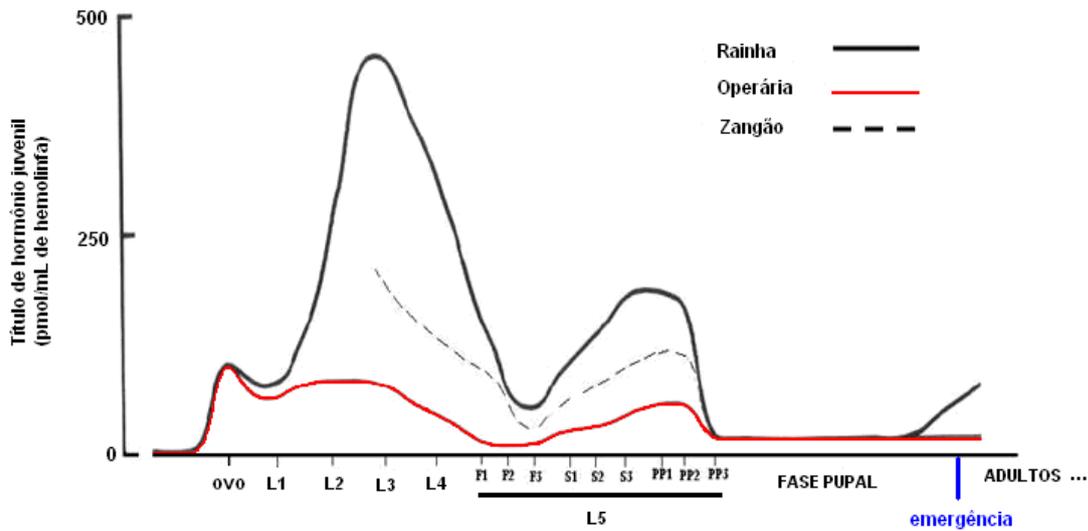
**Figura 2** – Duração dos eventos da embriogênese do himenóptero *Apis mellifera* e do díptero *Drosophila melanogaster* (baseado em informações de Fleig e Sander, 1986; Campos-Ortega e Hartenstein, 1997).

percebida pelo sistema neuroendócrino e resulta na ativação dos *corpora allata*, que produzem e secretam hormônio juvenil (HJ) (Penzlin, 1985; Boleli *et al.*, 1995; Boleli *et al.*, 1998). A grande quantidade de geléia real que é fornecida às larvas leva ao aumento nos níveis HJ e resulta na diferenciação dessas larvas em rainhas. A partir do terceiro estágio larval, os títulos de HJ são mais baixos nas larvas que recebem menor proporção de geléia real no alimento, as quais diferenciam-se em operárias (Dogra *et al.*, 1977; Rembold, 1987; Rachinsky *et al.*, 1990). A diferença nos títulos de HJ (**Figura 3**), como consequência da alimentação casta-específica, resulta na expressão diferencial de genes entre rainhas e operárias (Severson *et al.*, 1989; Hartfelder *et al.* 1995; Corona *et al.*, 1999; Evans e Wheeler, 1999; Cristino *et al.*, 2006b; Barchuk *et al.*, 2007). Portanto, as larvas fêmeas têm potencial para seguir duas vias de desenvolvimento: uma que levará a caracteres morfológicos específicos de rainhas e outra à morfologia típica de operárias.

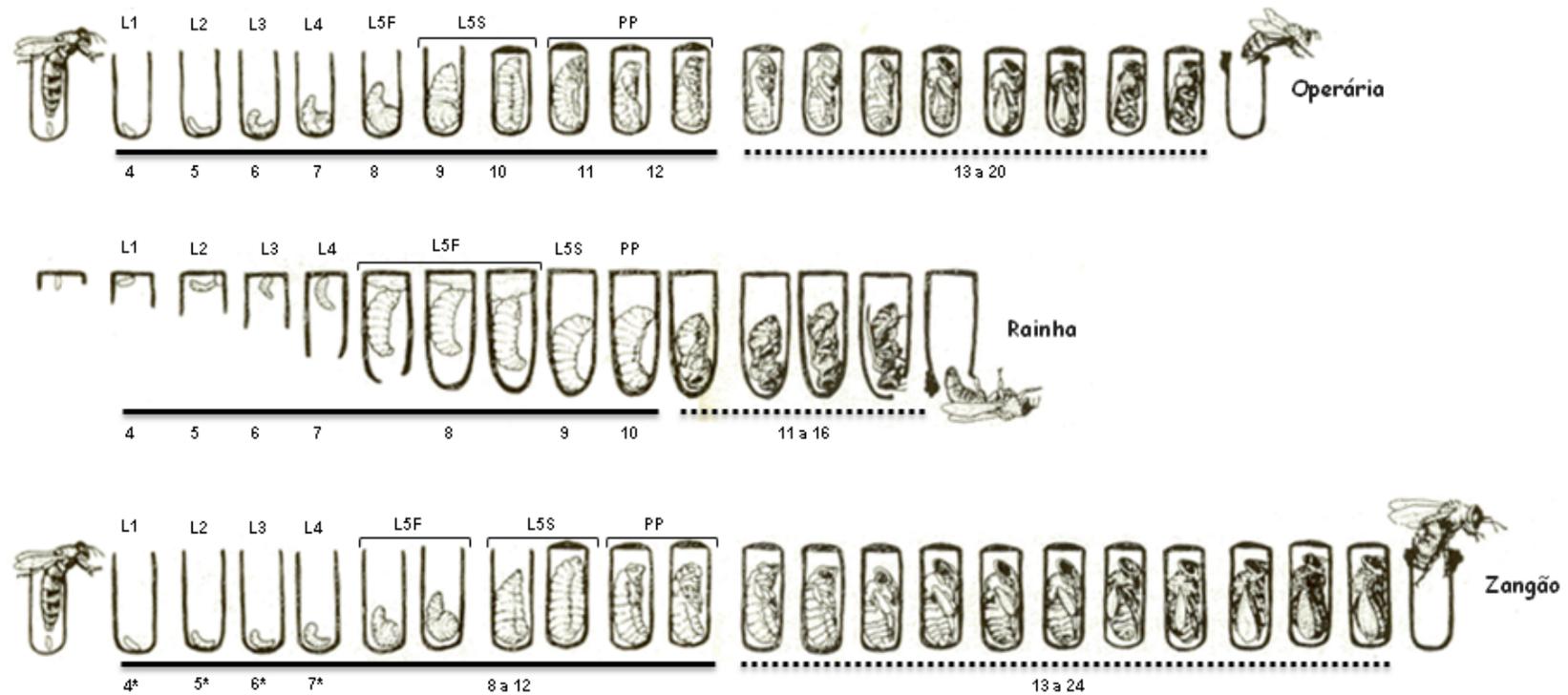
Até a fase L2 do desenvolvimento larval, os machos são alimentados exclusivamente com geléia real. A partir da fase L3, os machos recebem uma mistura de geléia real, mel e pólen (Snodgrass, 1984).

A ontogênese prossegue com uma muda metamórfica que marca a transição larva-pupa. A duração do desenvolvimento larval e pupal variam entre operária, rainha e zangão, conforme mostra a **Figura 4**.

Durante o desenvolvimento pupal ocorre substituição dos tecidos larvais por tecidos que formarão o indivíduo adulto como, por exemplo, a diferenciação de estruturas do adulto a partir dos discos imaginais: asas, pernas, antenas, entre outros. Após emergência, os adultos desempenham funções específicas dentro da colônia, esta uma sociedade altamente organizada, caracterizada por sobreposição de gerações,



**Figura 3** – Títulos de hormônio juvenil ao longo do desenvolvimento de operárias, rainhas e zangões de *Apis mellifera* (Rembold, 1987a, 1987b; Rembold et al., 1992; Rachinsky et al., 1990). Os dados apresentados na revisão de Hartfelder e Engels (1998) foram compilados a partir de metodologias diferentes para quantificação hormonal e se referem a valores relativos. Estágios do desenvolvimento: ovo, L1-4 (larvas de primeiro, segundo, terceiro e quarto estágios), L5 (larvas de quinto estágio) em fase de alimentação (F = *feeding phase*, subdivisões: F1, F2 e F3), seguida por fase de tecelagem do casulo (S = *spinning phase*, subdivisões: S1, S2 e S3) e PP (pré-pupa, subdivisões: PP1, PP2 e PP3).



**Figura 4** – Ciclo de vida de operária, rainha e zangão de *Apis mellifera*. Acima de cada gravura está a fase do desenvolvimento larval correspondente. Abaixo, está o número de dias após a postura do ovo. O período larval foi retratado com maior detalhe, pois consiste na fase estudada (Modificado de Winston, 1987, com base nas informações de Rembold *et al.*, 1980; Michelette e Soares, 1993; Tozetto, 1997).

divisão reprodutiva de trabalho e cuidado com a prole (revisado em Cruz-Landim, 2008).

O estudo da determinação do sexo em Hymenoptera, neste caso através da espécie *A. mellifera*, pode ser informativo por muitas razões: (1) As consequências genéticas e moleculares resultantes do mecanismo haplodiplóide de determinação do sexo nos Hymenoptera são pouco conhecidas; (2) O conhecimento produzido poderá ser comparado a outros organismos e utilizado na identificação de princípios genéticos gerais. (3) As informações geradas poderiam ajudar na compreensão de problemas evolutivos típicos entre os Hymenoptera, como a evolução da socialidade e do desequilíbrio da razão sexual que prevalece neste grupo (Beukeboom, 1995). Os perfis de transcrição dos genes da cascata de determinação do sexo contribuem para o entendimento desse processo em *A. mellifera*. Além disso, pouco se sabe sobre os mecanismos de determinação e diferenciação sexual nos himenópteros.

Objetivo

---

---



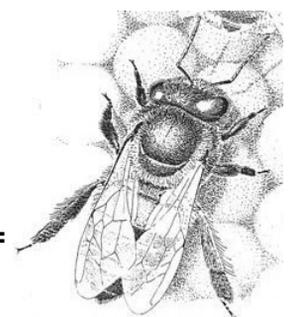
## 2. OBJETIVO

O presente projeto teve por objetivo caracterizar o perfil de transcrição das variantes de *dsx* e de outros genes da via de determinação do sexo em *Apis mellifera*. Os genes estudados foram: 1) *csd*, que é o sinal inicial da cascata de determinação do sexo nas abelhas melíferas. 2) As isoformas do *fem*, em que a função de *femF* foi provada na diferenciação sexual das fêmeas de abelhas. 3) Homólogo de *A. mellifera* para *ix* (*amix*), co-fator do produto gênico DsxF e importante na diferenciação sexual das fêmeas de *D. melanogaster*. 4) Homólogo de *A. mellifera* para *dac* (*amdac*), gene indiretamente regulado pelo *dsx* e que desempenha importante papel na diferenciação sexual do disco genital em *D. melanogaster*.

# Material e Métodos

---

---



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Análise computacional dos genes de determinação e diferenciação sexual em *Apis mellifera***

##### **3.1.1. Aquisição de dados das sequências gênicas analisadas**

As sequências preditas e validadas dos genes de *A. mellifera* analisadas neste estudo foram adquiridas a partir da literatura e da base pública de dados *GenBank* (National Center for Biotechnology Information - NCBI). O número de acesso e a referência dos genes estudados estão descritos na **Tabela I**.

##### **3.1.2. Anotação dos genes da cascata de determinação e diferenciação sexual em *Apis mellifera***

A anotação dos genes estudados foi realizada com auxílio dos programas BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*; Altschul *et al.*, 1990), **para** alinhamento da proteína de interesse contra o genoma, e ARTEMIS (Rutherford *et al.*, 2000), para montagem gráfica da estrutura gênica. A plataforma ARTEMIS permite o mapeamento manual dos genes em sequências genômicas bem como a localização de iniciadores e outras entidades definidas pela genética (ex: elementos regulatórios, domínios funcionais, regiões não-traduzidas etc.).

**Tabela I** – Relação dos genes da cascata de determinação e diferenciação sexual de *Apis mellifera* analisados neste estudo. Nomes e siglas dos genes, número de acesso, referência, nome e sequência dos iniciadores e condições de PCR.

Genes	No. de acesso <i>GenBank</i>	Referência	Nome dos iniciadores	Seqüência dos Iniciadores	Tamanho do fragmento (pb)	Nº de ciclos	Temp. de pareamento	
<b>ribosomal protein 49</b> ( <i>rp49</i> )	AF441189	<i>Ben-Shahar et al., 2003</i>	<i>rp49-F</i> <i>rp49-R</i>	5' CGTCATATGTTGCCAACTGGT 3' 5' TTGAGCACGTTCAACAATGG 3'	150	25	62°C	
<b>doublesex</b> ( <i>amdsx</i> )	<i>amdsxF1</i> , <i>amdsxM</i>	NR_024131, NM_001111255.1	<i>Cho et al., 2007</i>	<i>Amdsx-MA-F5</i> <i>Amdsx-R3Cho</i>	5' TCCAATATCCTTGGAAGCA 3' 5' CGATGTAATCATTCTCTTTGG 3'	1290 ( <i>amdsxF1</i> ) 435 ( <i>amdsxM</i> )	35	60°C
	<i>amdsxF1</i>	NR_024131	<i>Cho et al., 2007</i>	<i>amdsx-RT-FE-F1</i> <i>amdsx-MA-R6</i>	5' TTCTGTTCTGAAGAATTTTATTTGG 3' 5' GCACGACTAGTTGGGACAT 3'	908	35	60°C
	<i>amdsxF1</i>	NR_024131	<i>Cho et al., 2007</i>	<i>Amdsx-F1-F</i> <i>Amdsx-F1-R</i>	5' CAATGGTGCCTAAGTTTCTCG 3' 5' AAGGGTGACGAATACAACGAA 3'	127	35	60°C
	<i>amdsxM</i>	NM_001111255.1	<i>Cho et al., 2007</i>	<i>Amdsx-M-F</i> <i>Amdsx-M-R</i>	5' TTGATGCTAGCAACGAAATCC 3' 5' CCCTCGTATGTCGGAGGTC 3'	136	35	60,5°C
	<i>amdsxB</i>	NM_001134936.1	<i>Cho et al., 2007</i>	<i>Amdsx-B-F</i> <i>Amdsx-B-R</i>	5' CATAATGGTTTCTTGGCGAAA 3' 5' GAAAACATATACAGCGCAACA 3'	102	35	59°C
	<b>complementary sex determiner (csd)</b>	NM_001011569	<i>Beye et al., 2003</i>	<i>Amcsd-F</i> <i>Amcsd-R</i>	5' GAAGCRTGGTTGATACAACAAG 3' 5' YATTACTTCTATCACGACTATCTG 3'	157	40	60°C
<b>feminizer</b> ( <i>fem</i> )	<i>femF</i>	NM_001134828	<i>Hasselmann et al., 2008</i>	<i>Amfem-F</i> <i>Amfem-F-R</i>	5' CAACATCTGATGAACCTAACGG3' 5' CTATTTCTGTCTTCATGTCTTGAA3'	350	32	60°C
	<i>femM</i>	EU101389	<i>Hasselmann et al., 2008</i>	<i>Amfem-F</i> <i>Amfem-M-R</i>	5' CAACATCTGATGAACCTAACGG3' 5' GGATTCAAATCATCTGAAGTTAC 3'	400	32	59°C
<b>intersex (amix)</b>	XM_395989.1	<i>Cristino et al., 2006</i>	<i>Amix-F</i> <i>Amix-R</i>	5' GGTGGTATTGATCAGCCAGA 3' 5' TGGCATGACAGGTAAGTGGAA 3'	154	32	60°C	
<b>dachshund (amdac)</b>	XM_394237.3	-	<i>Amdac-F</i> <i>Amdac-R</i>	5' CGAGATCGTACAACAGCCCT 3' 5' ATGCCCGTTCTCGTAGTAAT 3'	490	36	60°C	

### 3.1.3. Desenho dos iniciadores

Os iniciadores específicos de cada gene estudado foram desenhados manualmente ou com auxílio do *software Primer3* (Rozen e Skaletsky, 2000). A especificidade dos mesmos foi avaliada por BLASTN contra o genoma da abelha e visualizadas na plataforma ARTEMIS, que permite avaliar o tamanho do transcrito gerado e potencial tamanho de fragmento genômico, em caso de contaminação do cDNA. As sequências utilizadas para desenhar os iniciadores específicos para o gene *amix*, *amdac* e para as variantes do gene *amdsx* (Cristino *et al.*, 2006a; Cho *et al.*, 2007) foram recuperadas da base pública de dados *GenBank* (os números de acesso de cada gene estão na **Tabela I**). Os iniciadores utilizados na amplificação dos genes *csd* e *fem* foram os mesmos descritos por Gempe *et al.* (2009). Para a normalização da expressão, optou-se pelo gene *rp49* (de expressão constitutiva em abelhas, segundo Lourenço, *et al.*, 2008) e iniciadores específicos foram desenhados com base na sequência também obtida do *GenBank* (Ben-Shahar *et al.*, 2003).

### 3.1.4. Busca por domínios conservados nos genes estudados

As sequências em aminoácidos dos genes *csd*, *fem*, *ix* e *dac* e das variantes do gene *amdsx* de *A. mellifera* foram submetidas a uma busca por domínios conservados através do programa *NCBI Conserved Domain Search* (Marchler-Bauer e Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>).

### 3.2. Análise dos níveis de transcritos dos genes da cascata de determinação e diferenciação sexual de *Apis mellifera*

#### **3.2.1. Coleta do material biológico**

Os insetos foram coletados em colônias mantidas no apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo.

Para obter embriões e larvas com idades controladas, uma rainha foi presa (com auxílio de uma tela excludora) por seis horas sobre favos distintos: ou com células de zangões ou com células de operárias. Embriões machos e fêmeas foram coletados 6, 12, 18, 24, 48 e 72 horas após a postura. Para produção de rainhas, larvas de segundo estágio larval (L2) foram instrumentalmente transferidas para cúpulas artificiais, que mimetizam células de cria naturais (realeiras), em barras contendo de 10-14 cúpulas e inseridas em caixas (colônias) do tipo recria. Assim, operárias e rainhas foram coletadas separadamente a partir do estágio larval 3 (L3). Os estágios larvais de rainhas e operárias foram classificados de acordo com os critérios estabelecidos por Rembold (1987) e Michelette e Soares (1993). Os critérios de classificação instituídos por Rembold (1987) e Michelette e Soares (1993) para a fase larval foram relacionados nas **Tabelas II e III**, respectivamente. Foram coletadas larvas de abelhas no estágio L1 até L5S3 (**Figura 3**). Zangões na fase larval foram coletados no momento da eclosão (estágio larval 1, ou L1) e a cada 24 horas por três dias (portanto: L2, L3 e L4). Deste modo, foi estabelecido um critério para classificar o estágio de desenvolvimento das larvas jovens de macho com base no tempo de desenvolvimento e massa corpórea que será discutido com mais detalhes no **item 4.1** (seção Resultados e Discussão). Machos no quinto estágio larval foram classificados de acordo com Tozetto (1997) e os critérios utilizados estão na **Tabela IV**. Cada estágio do desenvolvimento embrionário e larval de operária, rainha e zangão foi amostrado em triplicatas e todas as amostras descritas foram colocadas em

microtubos de 1,5 mL com 500 µL de TRIzol® (Invitrogen) e congeladas a -80°C até a extração de mRNA.

Operárias, rainhas e zangões na fase L5 e recém-nascidos foram dissecados sob estereomicroscópio para a retirada das gônadas (ovários e testículos). As amostras desses tecidos foram colocadas em microtubos de 1,5 mL com 500 µL de TRIzol® (Invitrogen) para posterior extração de mRNA.

**Tabela II** - Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) de operárias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas. A duração dos estágios larvais no desenvolvimento preimaginal refere-se às horas após eclosão (modificado de Michelette e Soares, 1993).

Fase		Caracterização
Ovo		Embriões de 0 a 72 horas
L1		0,1 a 0,3 mg
L2		0,3 a 1,0 mg
L3		1,5 a 4,0 mg
L4		4,0 a 24,8 mg
L5	Fase de alimentação (F)	1 29,0 a 60,0 mg
		2 60,0 a 110,0 mg
		3 110,0 a 160,0 mg
	Fase de tecelagem do casulo (S)	1 Célula operculada; larva com intestino cheio
		2 Célula operculada; larva com intestino semi-cheio
		3 Célula operculada; larva com intestino vazio

**Tabela III** – Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) de rainhas de *Apis mellifera carnica* (modificado de Rembold *et al.*, 1980).

Fase		Caracterização
Ovo		Embriões de 0 a 72 horas
L1		0,1 a 0,35 mg
L2		0,35 a 1,5 mg
L3		1,5 a 7,0 mg
L4		7,0 a 44,0 mg
L5	Fase de alimentação (F)	1 44,0 a 90,0 mg
		2 91,0 a 180,0 mg
		3 181,0 a 260,0 mg
	Fase de tecelagem do casulo (S)	1 Larva com intestino cheio
		2 Larva com intestino semi-cheio
		3 Larva com intestino vazio

**Tabela IV** – Características utilizadas para classificar o quinto estágio do desenvolvimento larval (L) de zangões de *Apis mellifera* (baseado em Tozetto, 1997).

Fase		Caracterização
L5	Fase de alimentação (F)	1 40 – 129 mg
		2 130 – 269 mg
		3 270 – 400 mg
	Fase de tecelagem do casulo (S)	1 Larva com intestino cheio
		2 Larva com intestino semi-cheio
		3 Larva com intestino vazio

### 3.2.2. Extração do RNA total

As amostras em TRIzol® foram retiradas do freezer e descongeladas a temperatura ambiente. A cada amostra foi adicionado 100 µL de clorofórmio (MERCK) e, em seguida, os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e levados a uma centrifugação a 12.000 x g, a 4°C por 15 minutos. Ao final da centrifugação, as amostras apresentaram duas fases: uma fase branca aquosa (onde estava o RNA) e outra vermelha (contendo proteínas e o restante do TRIzol®). A fase branca aquosa foi transferida para outro tubo onde foi

adicionado 250  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico (MERCK) e 1  $\mu\text{L}$  de glicogênio (concentração 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) para precipitação do RNA. As amostras foram então, armazenadas no freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  por no mínimo três dias para que o glicogênio potencializasse a precipitação do RNA (conforme descrito no protocolo do reagente TRIzol®). Após essa etapa de precipitação, as amostras foram retiradas do freezer e deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos.

Em seguida o material foi submetido a uma segunda centrifugação a 14.000 x g a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionado 500  $\mu\text{L}$  de etanol 75% (MERCK). Uma nova centrifugação foi realizada a 10.000 x g a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos para precipitação do RNA total. O sobrenadante foi descartado com cuidado e os tubos abertos foram colocados em um termobloco *Digital Dry Bath Incubator* (Boekel) a  $55^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos para evaporação do álcool remanescente. O RNA foi, então, ressuspendido em 15-30  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (purificada por osmose reversa, em seguida pelo sistema *Milli-Q Plus*) tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, 0,1% (v/v), Sigma) e autoclavada. Para completa dissolução do RNA precipitado, as amostras foram deixadas em um termobloco a  $55^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. As variações entre 15-30  $\mu\text{L}$  na quantidade de água DEPC 0,1% utilizada se devem ao volume necessário para dissolver todo o precipitado, que apresentam rendimentos diferentes nas fases estudadas. A pureza (estimada por meio da razão entre os valores da leitura a 260 e 280 nm) e concentração (dada em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) da solução final de cada amostra foram obtidas por absorvância óptica a 260/280 nm, em espectrofotômetro *NanoDrop*® *ND-1000* (NanoDrop Technologies). Posteriormente, as amostras foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem usada na síntese de cDNA.

### 3.2.3. Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Volumes de RNA total, correspondentes a 4,0 µg, foram completados com água DEPC 0,1% para 9 µL. Adicionou-se 0,2 unidade (U) da enzima *DNase I Amplification Grade* (1 U/µL; Invitrogen) para remoção de possível contaminação por resíduos de DNA, incubando-se em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) a 37°C, por 40 minutos e, posteriormente a 70°C, por 15 minutos, para inativação da enzima. A eficiência do tratamento com DNase foi testada utilizando-se o RNA total (tratado com a enzima) como molde para reação em cadeia da polimerase (sem ser submetido à reação de transcrição reversa, controle negativo). O RNA total tratado com DNase foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA de fita simples, em volume final de 20 µL, utilizando-se, por amostra, o seguinte protocolo: 1 µL de oligo(dT)<sub>12-18</sub> (500 ng/µL), 1 µL de uma mistura de dNTPs (10 mM), com incubação em termociclador a 65°C por 5 minutos; 4 µL de tampão *5x first strand* (Invitrogen), 2 µL de ditriotritol 0,1 M (DDT, Invitrogen), 1 µL de inibidor de RNase (*RNase OUT™*, 40 U/µL, Invitrogen), com incubação a 42°C por 2 minutos; 0,5 µL de água ultra-pura autoclavada e 0,5 µL da enzima *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (200 U/µL, Invitrogen), com incubação a 42°C por 50 minutos, com posterior ciclo de inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. Como controle negativo, foram preparadas reações sem a enzima *SuperScript™ II*.

A amplificação do cDNA pela técnica de PCR foi feita utilizando-se 10 µL de *Master Mix* (Promega), 8 µL de água ultra-pura autoclavada, 0,5 µL de cada iniciador específico (10 pmol/µL) e 1µL de cDNA. A temperatura de 94 °C por 30 segundos foi usada para separação das fitas de cDNA, seguido da temperatura ideal de pareamento específica de cada iniciador por 45 segundos e 72 °C por 40 ou 45 segundos, dependendo do tamanho do fragmento sintetizado na reação. A temperatura de pareamento utilizada nas amplificações por PCR variou conforme as características de cada par de iniciadores. A temperatura de

pareamento e a sequência dos iniciadores de cada gene estudado foram relacionados na **Tabela I**.

Os produtos da amplificação por PCR foram analisados em géis de agarose 1,0% (Amersham-Pharmacia Biotech), em tampão TBE 1x (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0) e contendo 0,5 µg de brometo de etídio por mL de gel. O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado com a migração do marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen). Os géis foram visualizados e fotografados com auxílio do aparelho *Kodak EDAS 290*. A densidade óptica das bandas geradas – resultantes da migração dos fragmentos de cDNA amplificados – foi medida com auxílio do programa *Kodak ID 3.3.2 Image Analysis Software*. Para que as quantificações permitissem uma comparação fiel entre os níveis dos transcritos dos genes estudados entre operária, rainha e zangão, os seguintes parâmetros foram cuidadosamente padronizados: volume do gel (300 mL), corrente elétrica para eletroforese (180 V), tempo de corrida (60 minutos), tamanho dos poços (49 mm<sup>3</sup> = 49 µL), volume das amostras aplicadas (20 µL) e tempo de abertura do diafragma da câmara para captação de imagem sob luz UV (1,5 segundo). Os valores correspondentes aos níveis transcricionais de cada amostra foram normalizados pela subtração com os respectivos valores de expressão do gene *rp49* e representados pela média das triplicatas para cada ponto do desenvolvimento analisado.

#### **3.2.4. Clonagem e Sequenciamento**

Fragmentos das variantes do gene *amdsx* amplificados por PCR usando cDNA de ovários e testículos de operárias, rainhas e zangões recém-nascidos como molde dois pares de iniciadores (par I: *Amdsx-MA-F5 X Amdsx-R3Cho*; par II: *amdsx-RT-FE-F1 X amdsx-MA-R6*

) foram recortados do gel com um bisturi e purificados com base no protocolo e reagentes do *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN).

O fragmento de cDNA purificado foi ligado ao vetor *pGEM-T easy vector* (Promega) em reação com a enzima T4 DNA ligase (Promega). Posteriormente, os plasmídeos foram internalizados por bactérias competentes através da reação de transformação por choque térmico.

Depois do choque térmico, as bactérias foram incubadas em estufa a 37°C a uma rotação de 180 rpm em 500 µL de meio LB líquido (sem antibióticos). Em seguida, as bactérias foram espalhadas em placas de LB sólido e incubadas em estufa por 20 horas a 37°C.

Após o período de crescimento, as colônias formadas por bactérias que receberam o inserto de interesse foram recolhidas por um palito de madeira autoclavado e colocadas em tubos de ensaio com 5 mL de LB líquido com Ampicilina. Em seguida, os tubos de ensaio foram levados à estufa por 16 horas a uma rotação de 170 rpm e a 37°C. Para extração e purificação dos plasmídeos utilizou-se o kit *Illustra™ PlasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare).

Para verificar se a reação de ligação foi efetiva, o plasmídeo purificado foi submetido à digestão com a enzima EcoRI e o produto da digestão foi verificado em gel de agarose 1,0%. Os plasmídeos que apresentaram o inserto foram submetidos à reação de sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi feita seguindo-se o protocolo do kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems) e utilizando-se o par de primers *M13-F* e *M13-R*. Os tubos contendo a reação de sequenciamento foram levados ao

termociclador (GeneAmp PCR System 9700) por 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C.

O produto da reação de sequenciamento foi purificado com isopropanol 75%. Após evaporar o álcool, as amostras foram tratadas com, *Template Suppression Reaction* (Applied Biosystems) e colocadas no sequenciador ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

Os eletroferogramas emitidos pelo sequenciador foram interpretados pelo programa *Sequencing Analysis v3 4.1* (Applied Biosystems) e analisados no programa *Sequencher™ version 4.7 for Windows* (Gene Codes Corporation). A sequência consenso resultante foi confrontada com o banco de dados *GenBank* (National Center for Biotechnology Information - NCBI) utilizando-se BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

### **3.2.5. Padronização dos iniciadores por PCR em tempo real**

A avaliação da eficiência dos iniciadores utilizados na PCR semi-quantitativa foi realizada pela técnica de PCR em tempo real (7500 Real Time PCR System; Applied Biosystem). Amostras de cDNA do desenvolvimento embrionário de macho foram usadas concentradas ou diluídas em água ultra-pura autoclavada. As reações foram realizadas em placas de 96 poços, em um volume de reação de 20 µL, contendo 10 µL de *SYBR® Green Master Mix 2x* (Applied Biosystems), 0,5 µL de cada iniciador específico (10 pmol/µL), 1 µL de cDNA (concentrado ou diluído) e 8 µL de água ultra-pura autoclavada. As análises foram realizadas em triplicatas e as condições de PCR foram de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Para o gene *dac* e a variante *amdsx* a temperatura utilizada no pareamento dos iniciadores foi de 62° C.

Cada par de iniciadores foi testado usando alíquotas de cDNA concentrado e quatro diluições (1:5; 1:10; 1:20; 1:50). A eficiência de amplificação (E) de cada combinação de iniciadores foi calculada pela equação (1),

$$E = 10^{[-1/\text{slope}]} \quad (1)$$

onde *slope* é a inclinação da reta resultante da regressão linear calculada a partir dos valores de concentração de moléculas de cDNA e Ciclo limite (Ct) (User Bulletin#2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System). Todas as reações apresentaram valores de eficiência próximos de 2 ( $E \sim 2$ ) o que nos permite comparações quantitativas entre todos os genes estudados.

Outro ponto importante verificado foi a especificidade dos iniciadores que foi avaliada pela curva de dissociação. A amplificação é considerada específica quando a curva de dissociação apresenta um único pico muito evidente e neste caso, todos os pares de iniciadores amplificam especificamente um único fragmento. Assim, todas as reações foram padronizadas, o que permitiu obter a eficiência e a especificidade necessárias nas amplificações, para os cálculos de quantificação relativa.

### **3.2.6. Análise estatística dos dados de expressão quantitativa**

O programa *Sigma Plot for Windows version 11.0* (2008) foi utilizado para analisar os níveis de transcritos dos genes estudados com a finalidade de verificar a existência de diferenças significativas entre os perfis de operária, rainha e zangão. A análise de variância empregada foi *Two Way ANOVA* (comparações múltiplas) seguido do teste Holm-Sidak, com  $p < 0,01$ .

O pacote de ferramentas estatísticas do programa *Office Excel 2007* (Microsoft) foi usado para os cálculos de correlação de Pearson entre os dados de expressão dos genes

estudados no desenvolvimento embrionário e larval de operária, rainha e zangão. Foram considerados significantes os coeficientes de correlação  $R > 0,53$  e  $R < -0,53$ , para  $p < 0,05$ . Os coeficientes de correlação serviram como dados de entrada para o programa *Cytoscape* v.2.6.3, que oferece uma plataforma de visualização de redes de interação molecular e vias biológicas (<http://cytoscape.org/>).

### 3.3. Tratamento com Hormônio Juvenil

Larvas de operárias no estágio larval L2 – resultantes de postura controlada de seis horas – foram submetidas a um tratamento com hormônio juvenil (HJ). O total de 107 larvas foi tratado com 0,5  $\mu\text{L}$  de uma solução 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de Hormônio Juvenil III (Sigma) diluído em acetona 99,5% (Merck). O mesmo volume de 0,5  $\mu\text{L}$  de acetona foi aplicado sobre a região dorsal de 90 larvas. O grupo controle foi formado por 90 larvas que não receberam qualquer intervenção. O tratamento com acetona foi feito para verificar possíveis efeitos do solvente no desenvolvimento das larvas. Após o tratamento, amostras de larvas dos três grupos, em triplicatas, foram coletadas a cada 24 horas. Assim, foram amostrados os estágios larvais L3, L4 e L5F1. As larvas coletadas foram colocadas em microtubos de 1,5 mL com 500  $\mu\text{L}$  de TRIzol® e procedeu-se a extração do mRNA conforme o protocolo descrito anteriormente (item 3.2.2).

#### **3.3.1. Análise estatística dos dados de expressão quantitativa**

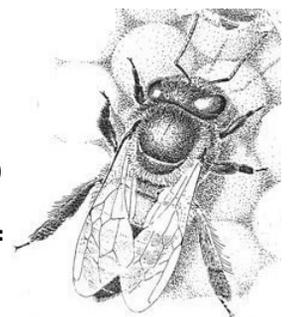
O programa *Sigma Plot for Windows version 11.0* (2008) foi utilizado para analisar os níveis de transcritos do gene *amix* com a finalidade de verificar a existência de diferenças significativas entre os diferentes tratamentos (HJ, acetona e controle) e fases larvais (L3, L4 e

L5F1). A análise de variância empregada foi *Two Way ANOVA* (comparações múltiplas) seguido do teste Holm-Sidak, com  $p < 0,01$ .

## Resultados e Discussão

---

---



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Critérios para classificação dos estágios iniciais do desenvolvimento larval de zangões

Rembold (1987) e Michelette e Soares (1993) apresentam critérios baseados no tempo de desenvolvimento, massa corpórea (larvas) e pigmentação (para pupas) dos indivíduos durante todo desenvolvimento das fêmeas de *A. mellifera* (**Tabelas III e IV**). As fases finais do desenvolvimento larval dos zangões foram determinadas usando critérios estabelecidos por Tozetto (1997) (**Tabela IV**), como o tamanho das larvas e a posição do alimento no intestino. No entanto, as fases iniciais do desenvolvimento larval de zangões não possuem critérios de classificação. Assim, usando uma postura controlada de ovos haplóides, que darão origem aos machos (seis horas de postura), o desenvolvimento desses ovos foi acompanhado a cada 24 horas a partir da eclosão. A relação entre o tempo de desenvolvimento, massa e estágio larval está na **Tabela V** e a **Figura 5** mostra os estágios iniciais do desenvolvimento do zangão. O estabelecimento de critérios para se determinar as fases do desenvolvimento mencionadas, completa a literatura e certamente auxiliará nos estudos com zangões, em diferentes áreas, nas quais a identificação e duração dessas fases são condições importantes.

**Tabela V** – Critérios estabelecidos para classificar o início do desenvolvimento larval (L) de zangões de *Apis mellifera*. Após a eclosão, as larvas tiveram sua massa medida (mg) a cada 24 horas. As fases (L1 a L4) foram estabelecidas com base nos dias após a eclosão e na massa das larvas.

Horas após a eclosão da larva	Média ± Desvio Padrão (n)	Mín-Máx (mg)	Estágio do Desenvolvimento
-	--	--	Embrião
Imediatamente após a eclosão	0,3 ± 0,1 mg (8)	0,1 - 0,35	L1
24 H	0,8 ± 0,2 mg (10)	0,4 - 1,2	L2
48 H	5,4 ± 1,4 mg (14)	3,0 - 7,0	L3
72 H	20,2 ± 5,2 mg (21)	16,0 - 32,1	L4



**Figura 5** – Estágios iniciais do desenvolvimento larval (L) de zangões de *Apis mellifera*. (A) Embrião macho, 48 H APO. (B) L1, 96H APO. (C) L2, 120H APO. (D) L3, 144H APO. (E) L4, 168H APO.

## 4.2. Análise computacional dos genes da cascata de determinação e diferenciação sexual em *Apis mellifera*

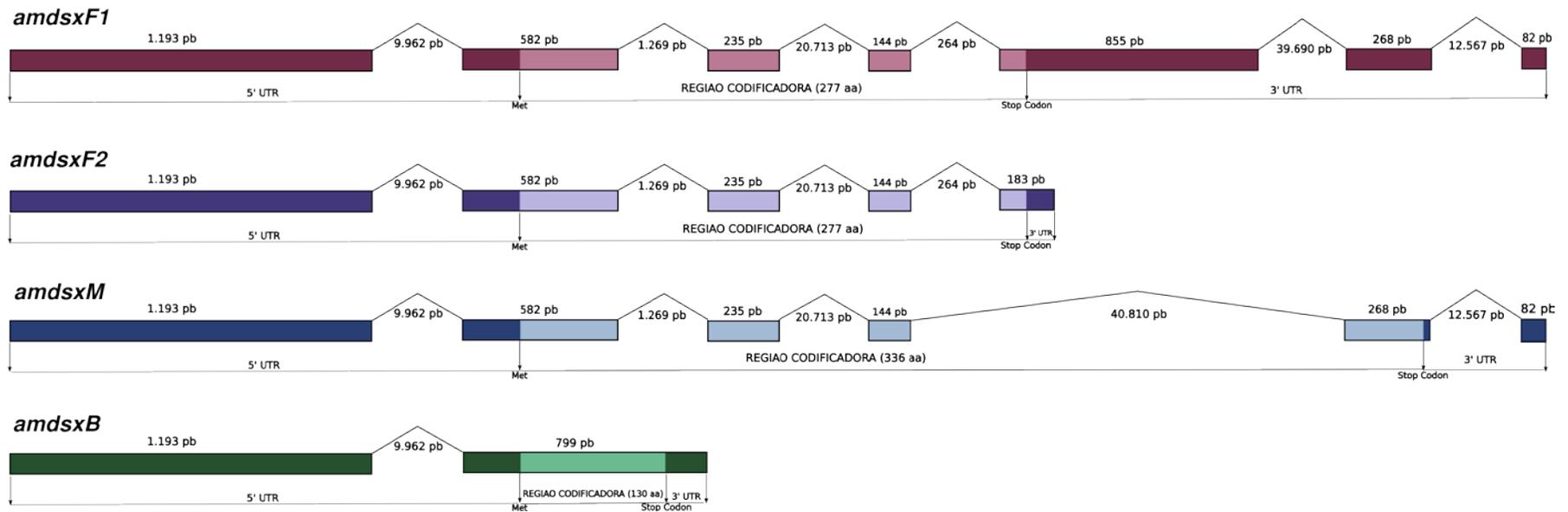
### 4.2.1. Anotação das variantes do gene *amdsx* de *Apis mellifera*

A estrutura dos transcritos variantes descritos para o gene *amdsx*, bem como região 5' e 3' UTR, códon de iniciação (metionina) e códon de terminação (*stop codon*) foram anotados e apresentados na **Figura 6**.

### 4.2.2. Domínios conservados nos genes estudados

As sequências dos genes *csd*, *fem*, *amix* e *amdac* e das variantes do gene *amdsx* e foram submetidas a uma busca por domínios conservados no programa *NCBI Conserved Domain Search* (Marchler-Bauer e Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Essa análise revelou que os genes *csd* e *fem* compartilham os domínios *sex determination protein N terminal* (SDP\_N; pfam12278) e *complementary sex determiner protein* (Apis\_Csd; pfam11671), sendo este último, incompleto no gene *csd* (**Figura 7**). O domínio SDP\_N é encontrado na porção N-terminal das proteínas de ligadas à determinação do sexo e apresenta importante função na determinação dos gêneros de aproximadamente 20% das espécies de metazoários (Beye *et al.*, 2003). O domínio Apis\_csd define as proteínas do tipo SR (*arginine/serine rich*) codificadas pelo gene *csd* (Beye *et al.*, 2003; Beye, 2004). Análises comparativas das sequências codificadoras dos genes *csd* e *fem* de cinco espécies de abelhas (*A. mellifera*, *Apis cerrana*, *Apis dorsata*, *Melipona compressipes* e *Bombus terrestris*) indicaram uma origem recente do *csd* nas abelhas melíferas a partir do precursor *fem* (Hasselman *et al.*, 2008).

As variantes *amdsxF1*, *amdsxF2* e *amdsxM* apresentam dois domínios conservados: domínio de dimerização (dsx dimer; pfam08828) e domínio DM de



Trecho sequenciado correspondente a *amdsxM*



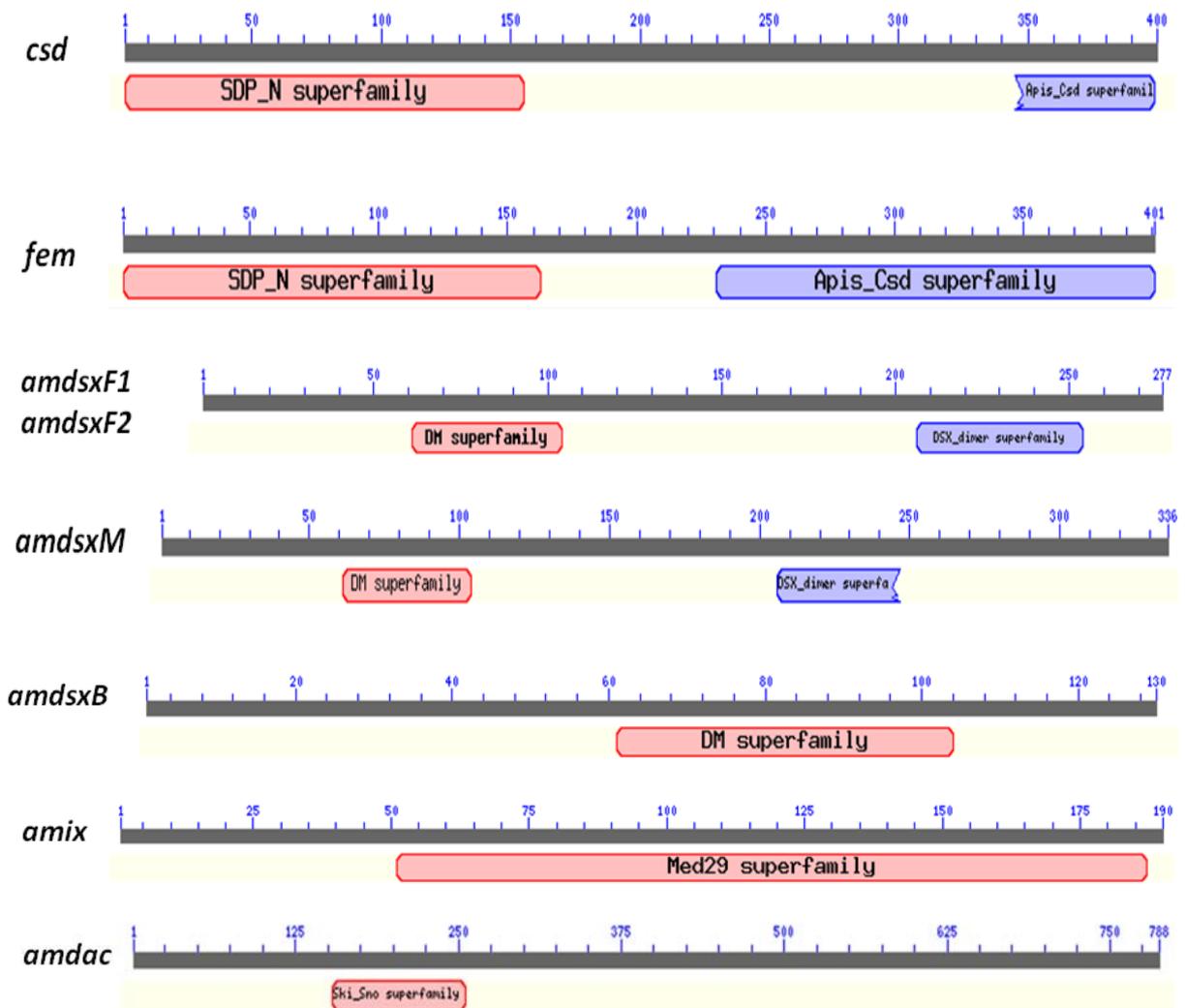
**Figura 6** – Estrutura das variantes de transcritos do gene *amdsx* em *Apis mellifera*. A estrutura em amarelo representa o trecho sequenciado a partir de amostras de operária e de rainha e corresponde a variante *amdsxM* (E-value 0.0), mostrando que a variante *amdsxM* se expressa também nas fêmeas.

ligação ao DNA (DM; pfam00751). A variante *amdsxB* apresenta apenas o domínio DM. O domínio DM define uma família de fatores de transcrição de metazoários que são conservados entre os vertebrados. Os genes da família DM estão envolvidos na regulação do desenvolvimento sexual nos metazoários, incluindo artrópodes, nematódeos e vertebrados (Raymond *et al.*, 1998; Narendra *et al.*, 2002). A ligação entre o domínio DM e a sequência de DNA é reforçada pelo domínio de dimerização na porção C-terminal da proteína codificada pelo gene *dsx* em *D. melanogaster* (Cho e Wensink, 1998). Mutações tanto no domínio DM quanto no domínio de dimerização estão associadas com fenótipos intersexuais (Erdman e Burtis, 1993; Burtis, 1993; Narendra, *et al.*, 2002). O domínio de dimerização está também relacionado com o recrutamento sexo-específico da proteína Ix, que atua em conjunto com DsxF nas fêmeas de *D. melanogaster* (Garret-Engele *et al.*, 2002).

A busca por domínios conservados no gene *ix* revelou a presença do domínio *mediator complex subunit 29* (Med29; pfam11568). Esse domínio pertence a um complexo de mais de 33 proteínas conservadas desde plantas, fungos até humanos e o número de subunidades que compõem esse domínio varia entre as espécies (Bourbon *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2004). O domínio *mediator* regula a atividade de transcrição da RNA polimerase II (Lariviere *et al.*, 2008) e em *D. melanogaster* funciona como um co-ativador de transcrição para o fator de transcrição DsxF (Conaway *et al.*, 2005).

O gene *dac* contém um domínio que define a família SKI/SNO/DAC (pfam02437). Entre os membros dessa família estão os proto-oncogenes *c-ski* e *Sno* que influenciam a proliferação celular, transformação morfológica e diferenciação miogênica, além de atuarem na resposta ao estímulo para proliferação celular (Ludolph *et al.*, 1995). Assim como esses membros da família SKI/SNO/DAC, o gene *dac* também participa de processos de diferenciação. Sabe-se que *dac* é importante na formação dos discos genitais e na diferenciação das pernas de *D. melanogaster* (Mardon *et al.*, 1994). As análises de domínios

conservados revelaram as funções conhecidas para os domínios presentes nos genes estudados. Essas funções atribuídas aos domínios são essenciais ao desenvolvimento das abelhas *A. mellifera*.



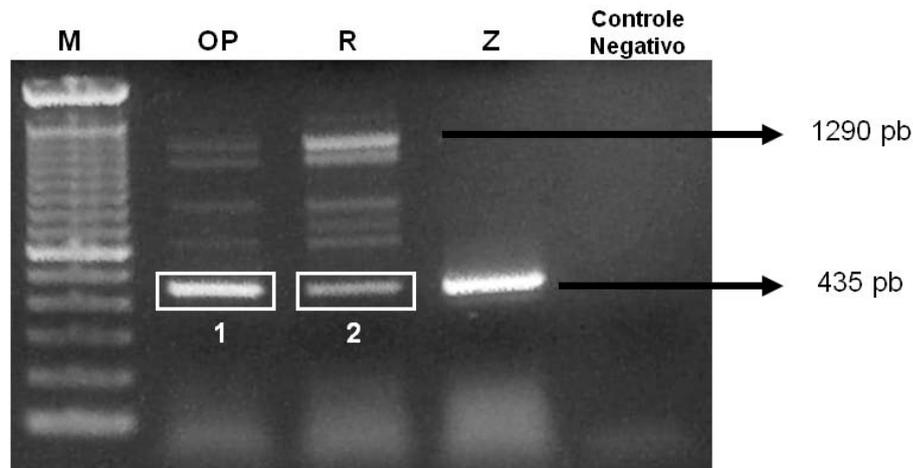
**Figura 7** – Posição dos domínios conservados nas proteínas preditas para os genes *csd*, *fem*, *amdsx*, *amix* e *amdac* de *Apis mellifera*. A busca por domínios conservados foi feita utilizando-se o programa *NCBI Conserved Domain Search* (Marchler-Bauer e Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009). Os retângulos azuis e rosas representam os domínios conservados. As extremidades arredondadas dos retângulos indicam que o domínio está completo.

#### 4.3. Expressão das variantes *amdsxM* e *amdsxF1* em fêmeas e machos de *Apis mellifera*

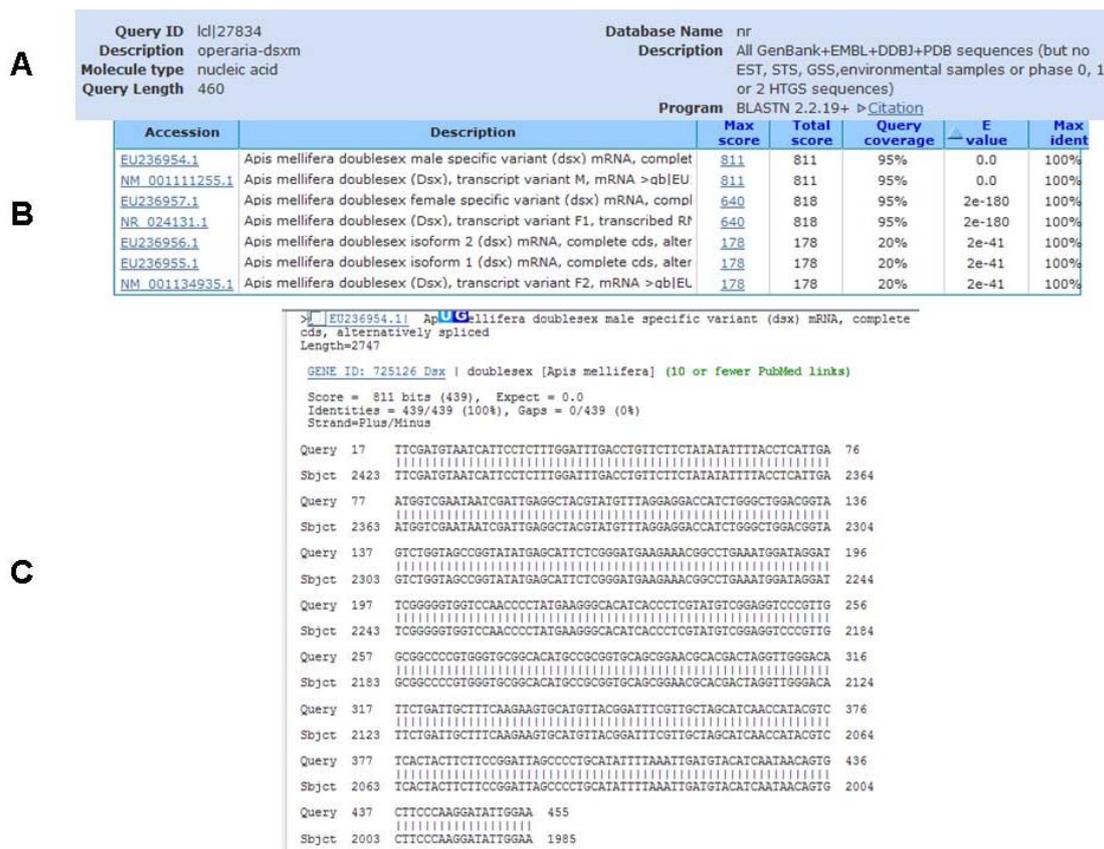
Observamos a presença de variantes do gene *amdsx* em ambos os sexos. A literatura descreve essas variantes como sendo sexo-específicas (Cristino *et al.*, 2006a; Cho *et al.*, 2007). Em reações de PCR usando iniciadores que flanqueiam uma região de 1290 pb da variante *amdsxF1* e 435 pb da variante *amdsxM*, observou-se que fragmentos de 435 pb ocorrem nas amostras de operárias e rainhas (**Figura 8**). Esses fragmentos não eram esperados em operária e rainha e foram, portanto, isolados e sequenciados. Os resultados do sequenciamento foram submetidos a um alinhamento BLASTN contra o banco de dados *GenBank*. Essa análise revelou que os fragmentos de 435 pb apresentaram 100% de similaridade com a variante *amdsxM* (**Figura 9 e Figura 10**), descrita como tendo expressão macho-específica (Cho *et al.*, 2007).

Além disso, usando uma combinação de iniciadores (*amdsx-RT-FE-F1* X *amdsx-MA-R6*) que pareiam em uma região exclusiva da variante *amdsxF1*, verificou-se a amplificação de um fragmento de 908 pb na amostra de zangão (**Figura 11**).

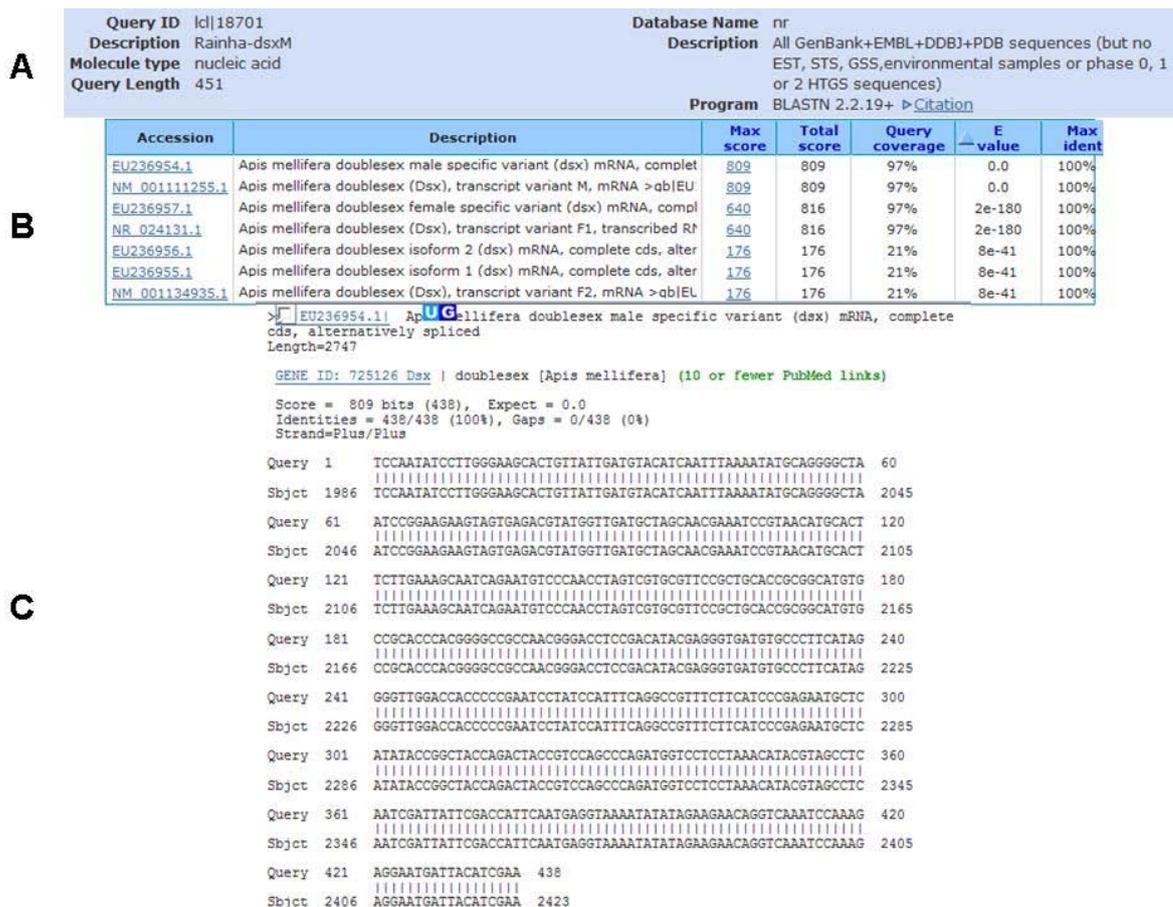
De acordo com trabalhos anteriores (Cristino *et al.*, 2006a; Cho *et al.*, 2007), esperávamos encontrar uma variante macho-específica, duas variantes fêmea-específicas e uma variante presente em ambos os sexos. A identificação da variante *amdsxM* em fêmeas e das variantes *amdsxF1* e *amdsxF2* nos machos revelam o quão complexos podem ser os mecanismos de regulação da transcrição gênica na diferenciação sexual em abelhas. Iniciadores específicos para as variantes *amdsxM*, *amdsxF1* e *amdsxB* foram empregados em reações de RT-PCR semi-quantitativa ao longo do desenvolvimento embrionário e larval de operária, rainha e zangão, a fim de verificar o perfil de expressão dessas variantes.



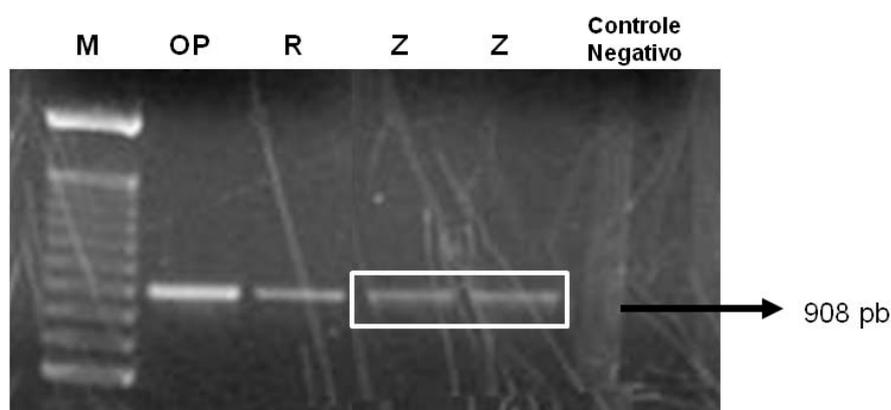
**Figura 8** – Gel de agarose (1%) com produtos de PCR obtidos pela combinação dos iniciadores *amdsx-MA-F5 X amdsx-R3Cho*. M: Marcador de peso molecular; OP: Operária; R: Rainha; Z: Zangão. Os retângulos definem as bandas clonadas e sequenciadas. O fragmento 1 corresponde a variante *amdsxM* nas operárias e o fragmento 2 corresponde a variante *amdsxM* nas rainhas.



**Figura 9** – Resultado do alinhamento do trecho seqüenciado a partir de amostra de operária. **(A)** BLASTN, em que a seqüência *query* é o resultado do seqüenciamento do fragmento de 435 pb da amostra de Operária (retângulo 1 da **Figura 7**); **(B)** Lista das seqüências de maior similaridade com a seqüência *query*; **(C)** Alinhamento entre o fragmento seqüenciado de operária e a variante *amdsxM*.



**Figura 10** – Resultado do alinhamento do trecho seqüenciado a partir de amostra de rainha. **(A)** BLASTN, em que a sequência *query* é o resultado do seqüenciamento do fragmento de 435 pb da amostra de rainha (retângulo 2 da **Figura 7**); **(B)** Lista das seqüências de maior similaridade com a sequência *query*; **(C)** Alinhamento entre o fragmento seqüenciado de rainha e a variante *amdsxM*.



**Figura 11** – Gel de agarose (1%) com produtos de PCR obtidos pela combinação dos iniciadores *amdsx-RT-FE-F1 X amdsx-MA-R6*. M: Marcador de peso molecular; OP: Operária; R: Rainha; Z: Zangão. O retângulo destaca a ocorrência de um fragmento da variante *amdsxF1*, em amostras de operária, rainha e zangão.

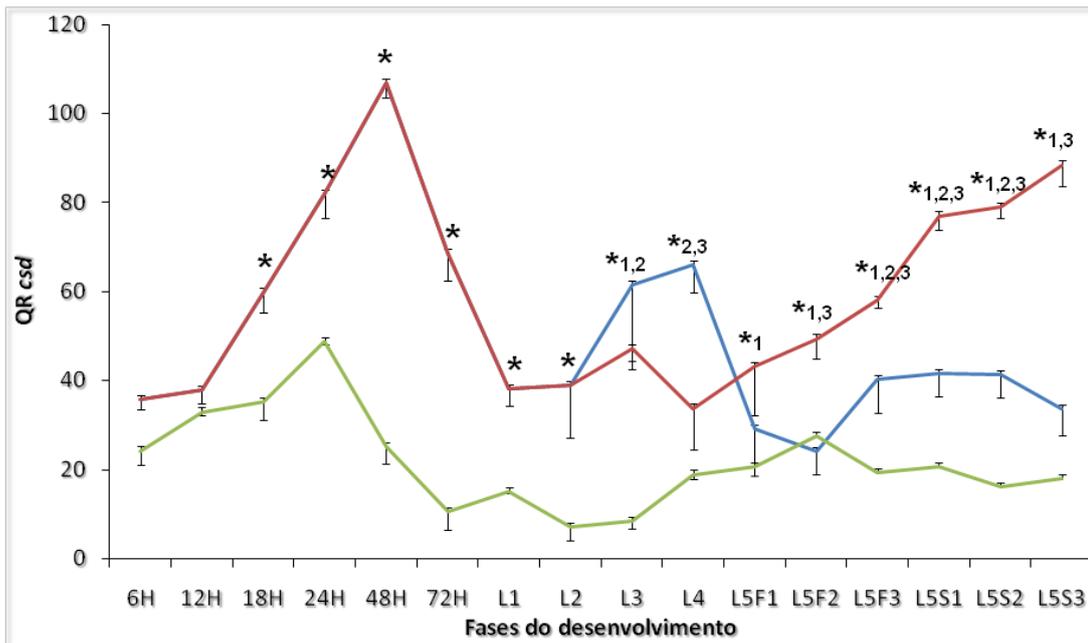
#### 4.4. Perfis de transcrição dos genes da cascata de determinação e diferenciação sexual de *Apis mellifera*.

A expressão dos genes *csd*, *fem*, *ix*, *dac* e dos transcritos variantes descritos do gene *amdsx* foi verificada por RT-PCR semi-quantitativa no desenvolvimento embrionário e larval de operária, rainha e zangão. Embora o papel de alguns desses genes na determinação do sexo de abelhas já tenha sido demonstrado, pouco se sabe sobre a expressão desses genes no desenvolvimento. O perfil de expressão de cada gene foi relacionado com eventos importantes da embriogênese e do desenvolvimento larval e, assim, pode-se sugerir o envolvimento dos mesmos em eventos importantes da ontogenia de *A. mellifera*.

##### 4.4.1. *Complementary sex determiner*

O gene *csd* se expressa por todo o desenvolvimento embrionário e larval e seu perfil de transcrição difere ( $\alpha = 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) entre os sexos e castas (**Figura 12**). As fêmeas apresentam níveis mais altos de transcritos do gene *csd*, em especial na fase embrionária, em que ocorre um pico 48 horas APO. Operárias e rainhas apresentam perfis antagônicos na fase larval. O desenvolvimento embrionário de macho é marcado por um pico de expressão de *csd* 24 horas APO. Durante toda a fase larval dos zangões, a quantidade de transcritos de *csd* é menor em relação às operárias e rainhas. O gene *csd* é o sinal inicial da cascata de determinação do sexo nas abelhas melíferas (Beye *et al.*, 2003) e durante o início do desenvolvimento embrionário, tem a propriedade de dirigir o processamento dos transcritos do gene *fem* (Hasselmann *et al.*, 2008; Gempe *et al.*, 2009). No entanto, acredita-se que sua expressão no desenvolvimento embrionário tardio e na fase larval esteja relacionada a um papel mantenedor do estado sexual (Drescher e Rothenbuhler, 1964; Gempe *et al.*, 2009).

Esses resultados corroboram e complementam os dados de expressão descritos por Beye *et al.*, 2003. Os resultados aqui apresentados são quantitativos e refletem uma seleção mais minuciosa das fases do desenvolvimento, além de permitir comparações entre rainhas e operárias. Os dados apresentados por Beye *et al.* (2003), no entanto, se restringem a informação qualitativa (presença ou ausência de expressão) para operárias e zangões.



**Figura 12** - Expressão relativa de mRNAs do gene *csd* durante o desenvolvimento embrionário e larval de operária, rainha e zangão de *Apis mellifera*, por PCR semi-quantitativa. A expressão do gene *rp49* foi utilizada para normalizar a expressão do gene *csd*. A linha vermelha corresponde aos níveis de transcritos de rainha, linha azul de operária e linha verde de zangão. No desenvolvimento embrionário e nas fases L1 e L2, as linhas vermelha e azul se sobrepõem, pois as amostras de operária e rainha são diferentes a partir de L3. F: fase de alimentação; S: fase de tecelagem do casulo; QR: quantificação relativa dos transcritos; \*: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de macho e fêmea na fase embrionária e L1 e L2 ( $P < 0,01$ ); \*1: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de rainha e zangão ( $P < 0,01$ ); \*2: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de operária e zangão ( $P < 0,01$ ); \*3: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de operária e rainha ( $P < 0,01$ ).

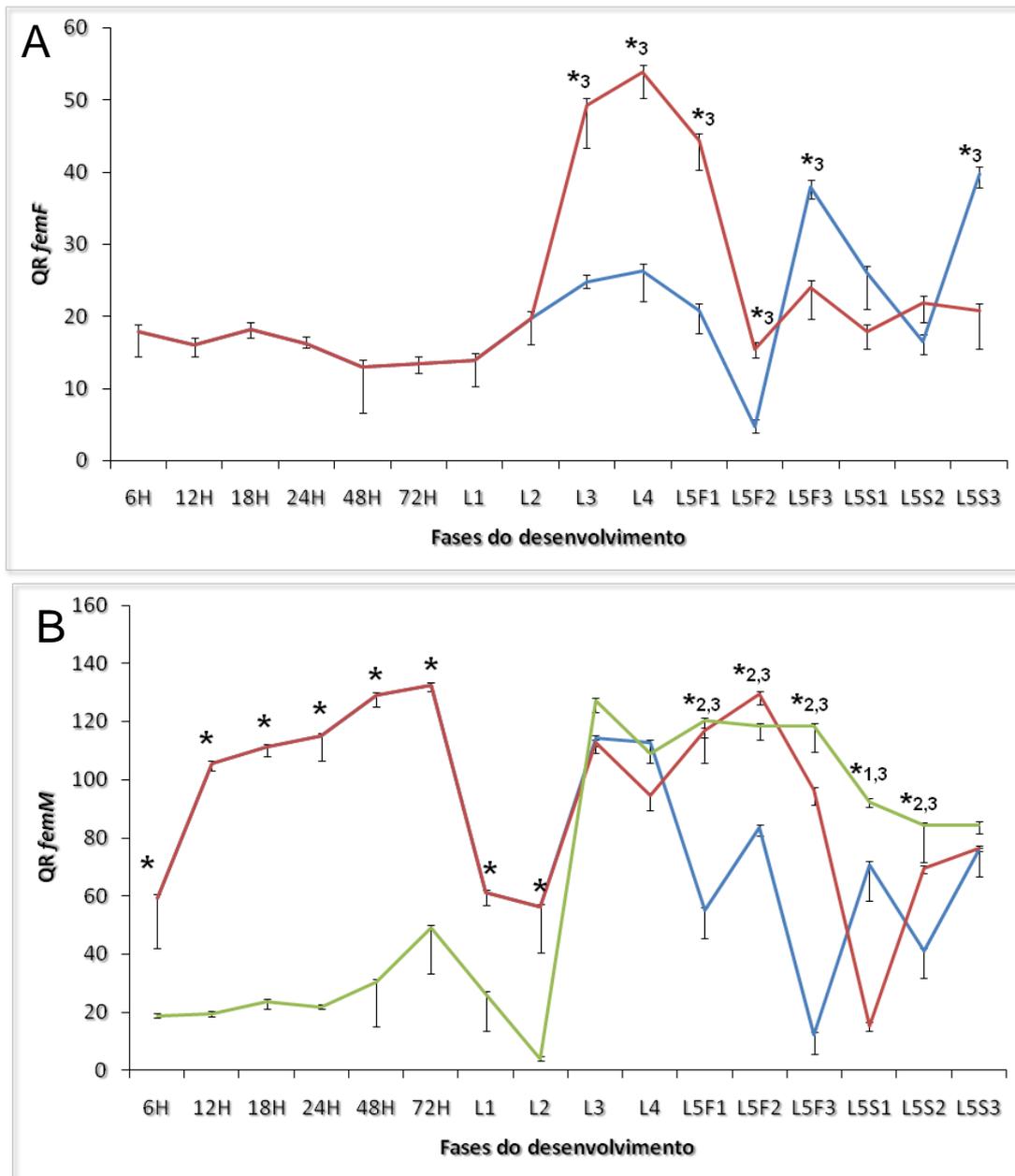
#### 4.4.2. *Feminizer*

Observou-se expressão da isoforma *femF* na fase embrionária e larval apenas nas fêmeas (**Figura 13 A**). Este resultado está de acordo com o que se encontra descrito na literatura (Gempe *et al.*, 2009).

Níveis mais altos de expressão da isoforma *femF* foram observados na primeira metade do desenvolvimento larval (L3 a L5F1) das fêmeas, sendo mais marcante sua presença nas rainhas. A expressão da isoforma *femF* difere nas castas ( $\alpha = 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) durante quase todo o desenvolvimento larval.

A isoforma *femM*, ao contrário do que seu nome indica, apresenta expressão maior nas fêmeas no desenvolvimento embrionário (**Figura 13 B**). O perfil de *femM* apresenta-se distinto entre os sexos e castas ( $\alpha = 0,05$ ;  $p < 0,01$ ). A partir da fase L3 do desenvolvimento larval dos zangões, os níveis dos transcritos de *femM* aumentam e se mantêm superiores aos das fêmeas até o final do desenvolvimento larval.

Nas fases larvais L3 e L4, disparam-se as principais diferenças morfo-fisiológicas (Huber, 1821; Rembold, 1965) e moleculares (Cristino *et al.*, 2006b; Barchuk *et al.*, 2007) relacionadas à diferenciação das castas. Os ovários das rainhas seguem em crescimento e os ovários das operárias iniciam um processo de degeneração no final do estágio L4 e início de L5. O momento da alta expressão de *femF* nas rainhas coincide com esse período de diferenciação dos ovários entre as castas. Os dados de Gempe *et al.* (2009) suportam que a isoforma *femF* esteja relacionada a diferenciação dos ovários. Por meio de ensaios funcionais usando a técnica *RNA interference* (RNAi), estes autores mostraram que a isoforma *femF* desempenha papel crucial na diferenciação somática das fêmeas, isto é, o silenciamento da isoforma *femF* resultou na formação de testículos nas fêmeas.



**Figura 13** - Expressão relativa de mRNAs das isoformas do gene *fem* durante o desenvolvimento embrionário e larval de operária, rainha e zangão de *Apis mellifera*, por PCR semi-quantitativa. (A) isoforma *femF*; (B) isoforma *femM*. A expressão do gene *rp49* foi utilizada para normalizar a expressão das isoformas do gene *fem*. A linha vermelha corresponde aos níveis de transcritos de rainha, linha azul de operária e linha verde de zangão. No desenvolvimento embrionário e nas fases L1 e L2, as linhas vermelha e azul se sobrepõem, pois as amostras de operária e rainha são diferentes a partir de L3. F: fase de alimentação; S: fase de tecelagem do casulo; QR: quantificação relativa dos transcritos; \*: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de macho e fêmea na fase embrionária e L1 e L2 ( $P < 0,01$ ); \*1: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de rainha e zangão ( $P < 0,01$ ); \*2: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de operária e zangão ( $P < 0,01$ ); \*3: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de operária e rainha ( $P < 0,01$ ).

#### 4.4.3. *Doublesex*

Os perfis de transcrição de três variantes de *amdsx* (*amdsxM*, *amdsxB* e *amdsxF1*) foram caracterizadas ao longo do desenvolvimento embrionário e larval de machos e fêmeas. O perfil de *amdsxF2* não foi verificado porque não é possível desenhar iniciadores que pareiam exclusivamente com essa variante, uma vez que toda a sua sequência está contida na sequência da variante *amdsxF1*

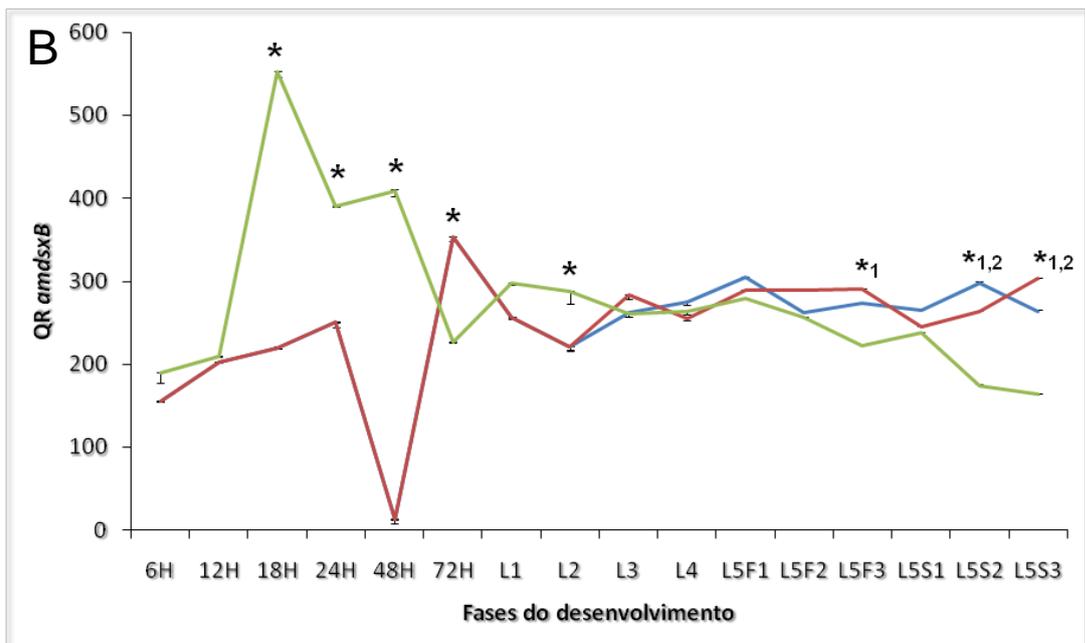
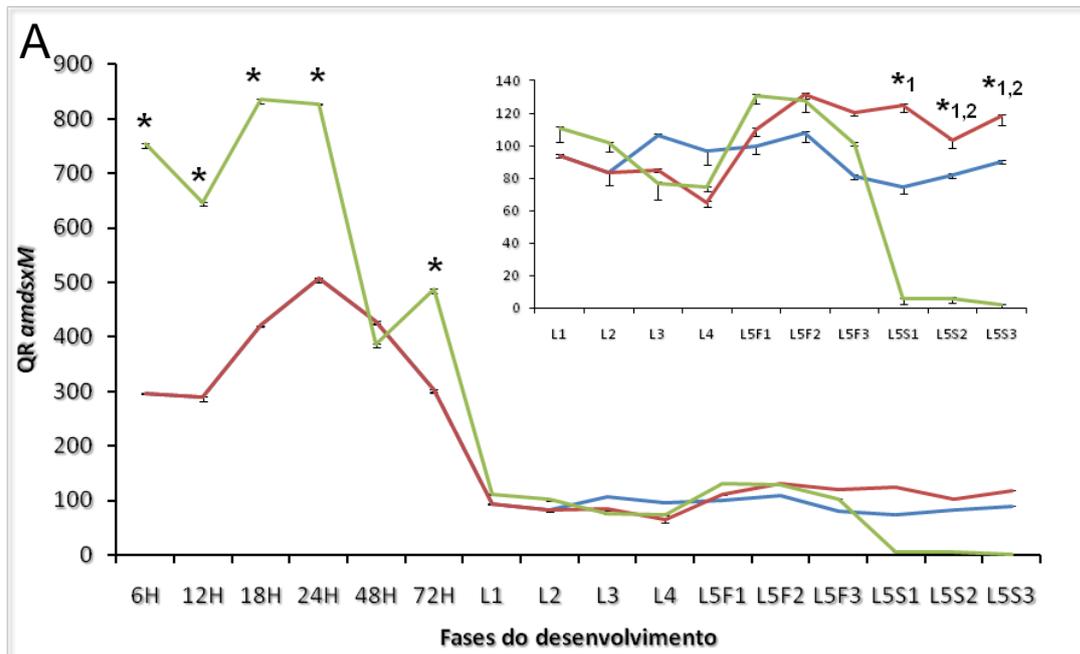
Os resultados revelaram que não há processamento sexo-específico do mRNA do gene *amdsx*, uma vez que as três variantes de *amdsx* foram observadas a partir das fases embrionárias iniciais até as fases finais do desenvolvimento larval em operária, rainha e zangão. Em uma visão geral, observou-se uma flutuação nos níveis de expressão das variantes. Essas variantes são mais expressas e oscilantes na fase embrionária do que durante o período larval, onde suas variações são menos pronunciadas. Em particular, no final da fase larval dos machos notou-se uma queda na expressão das variantes *amdsxM*, *amdsxB* e *amdsxF1* em comparação às larvas de operárias e rainhas. Nas primeiras 24 horas, a expressão da variante *amdsxM* é cerca de duas vezes maior nos machos, o que torna o perfil desta variante diferente quantitativamente entre os sexos ( $\alpha = 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) (**Figura 14 A**). Posteriormente, a abundância dos transcritos de *amdsxM* cai gradualmente até a transição embrião-larva.

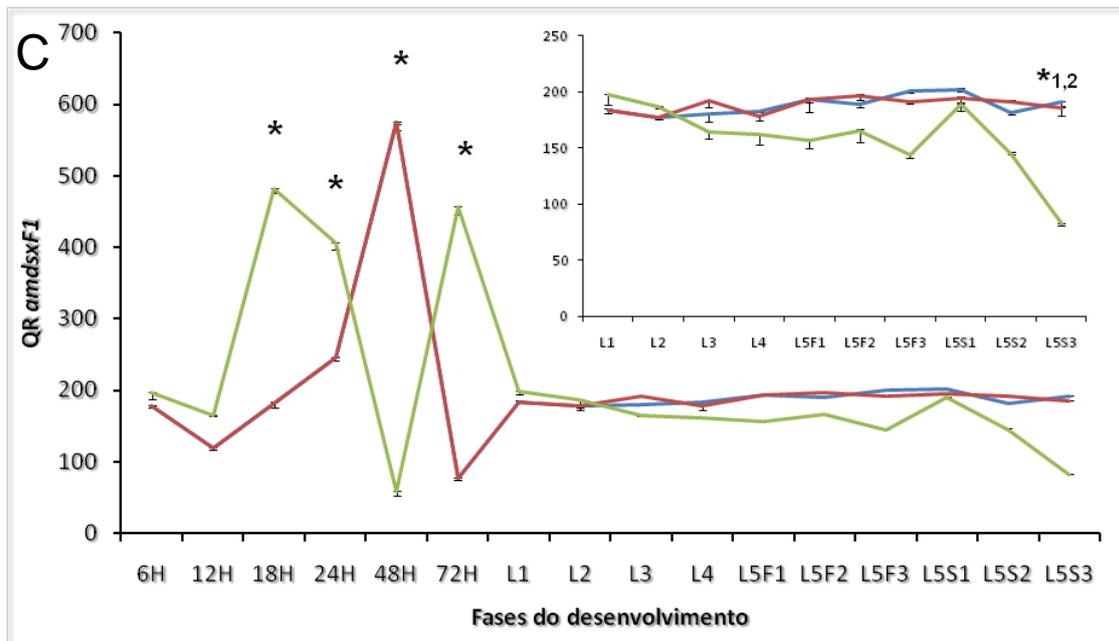
No que diz respeito à expressão de *amdsxB*, diferenças significativas ( $\alpha = 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) entre macho e fêmea foram observadas de 12 a 48 horas APO e a 72 horas APO do desenvolvimento embrionário, em que *amdsxB* apresentou níveis máximos no macho e na fêmea, respectivamente (**Figura 14 B**). No final do desenvolvimento larval (L5S2 e L5S3), a expressão de *amdsxB* também difere entre os sexos ( $\alpha = 0,05$ ;  $p < 0,01$ ). O perfil de expressão da variante *amdsxF1* apresentam diferenças marcantes entre os sexos no desenvolvimento embrionário ( $\alpha = 0,05$ ;  $p < 0,01$ ), tendo sido observados picos alternantes de *amdsxF1*. Em

machos, *amdsxF1* apresenta um pico 18 horas APO, cai 48 horas APO e volta a subir em 72 horas APO. Em fêmeas, *amdsxF1* apresenta um pico 48 horas APO (**Figura 14 C**).

Os resultados apontam expressão diferencial das variantes do gene *amdsx* ao longo do desenvolvimento embrionário e larval de machos e fêmeas. Esse cenário indica o envolvimento de cada variante em diferentes processos do desenvolvimento sexual. De um modo geral, todas as variantes apresentam perfil bastante diferente entre os sexos de 18 a 72 horas do desenvolvimento embrionário e no final do desenvolvimento larval. No início do desenvolvimento larval, a amplitude das variações não é marcante. O período do desenvolvimento embrionário mencionado (18 a 72 horas) compreende a fase da blastoderme, gastrulação, banda germinativa e final da embriogênese (Nelson, 1986). Inúmeros eventos acontecem nesse período, definindo o destino de cada célula e tecidos. Entre os processos ontogenéticos, merecem especial atenção aqueles regulados pelos genes da hierarquia da determinação do sexo e que promovem, portanto, a diferenciação entre machos e fêmeas. O trabalho pioneiro sobre o gene *dsx* em *D. melanogaster* constatou que esse gene é necessário para especificar todas as diferenças morfológicas entre os sexos (Hildreth, 1965). Também em *D. melanogaster*, foi descrito que o fator de transcrição Dsx, em conjunto com o produto do gene *fru*, regula a diferenciação sexual na formação do sistema nervoso e a manutenção dessas diferenças durante a vida adulta das moscas-da-fruta (Goldman e Arbeitman, 2007). Ao final da gastrulação, os folhetos germinativos já estão formados e inicia-se a diferenciação que dará origem aos órgãos e tecidos do futuro adulto. Em *D. melanogaster* os produtos dos genes *dsx* e *tra* controlam a diferenciação da mesoderme gonadal em ovários e testículos em fêmeas e machos, respectivamente (Le Bras *et al.*, 2006).

Com base na conservação do gene *dsx*, na literatura disponível sobre a função deste fator de transcrição em outras espécies de insetos, e ainda, nos resultados obtidos, é muito provável que *Amdsx* regule processos da diferenciação sexual também nas abelhas melíferas.





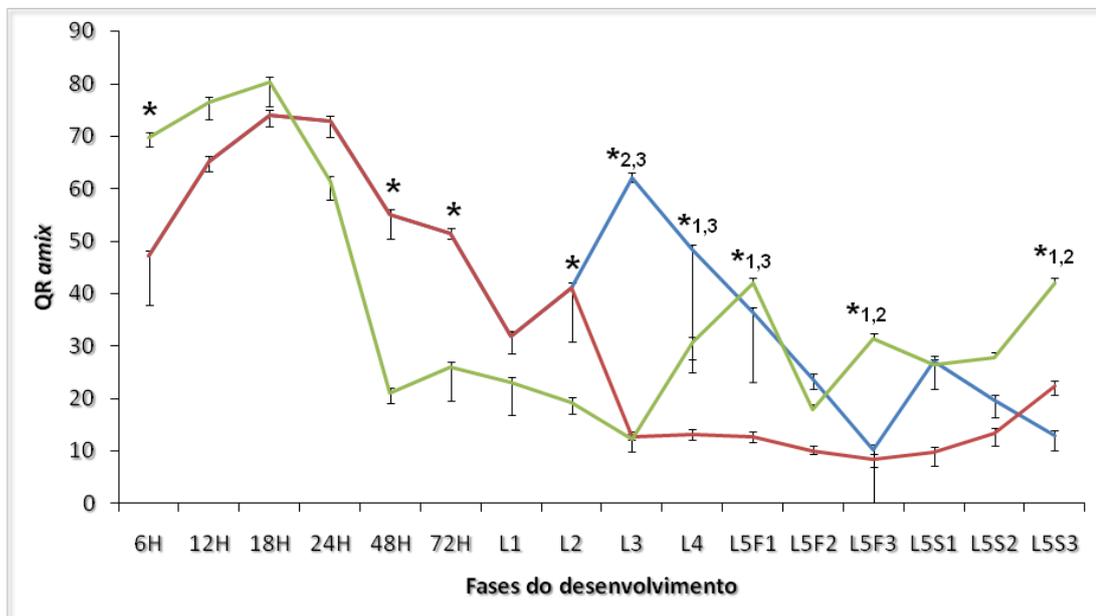
**Figura 14** - Expressão relativa de mRNAs das isoformas do gene *amdsx* durante o desenvolvimento embrionário e larval de operária, rainha e zangão de *Apis mellifera*, por PCR semi-quantitativa. (A) *amdsxM*, Inserto: os mesmos dados visualizados em menor escala (0-140) para melhor visualizar os perfis no desenvolvimento larval; (B) *amdsxB*; (C) *amdsxF1*, Inserto: os mesmos dados visualizados em menor escala (0-250) para melhor visualizar os perfis no desenvolvimento larval. A expressão do gene *rp49* foi utilizada para normalizar a expressão das isoformas do gene *amdsx*. A linha vermelha corresponde aos níveis de transcritos de rainha, linha azul de operária e linha verde de zangão. No desenvolvimento embrionário e nas fases L1 e L2, as linhas vermelha e azul se sobrepõem, pois as amostras de operária e rainha são diferentes a partir de L3. F: fase de alimentação; S: fase de tecelagem do casulo; QR: quantificação relativa dos transcritos; \*: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de macho e fêmea na fase embrionária e L1 e L2 ( $P < 0,01$ ); \*1: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de rainha e zangão ( $P < 0,01$ ); \*2: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de operária e zangão ( $P < 0,01$ ); \*3: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de operária e rainha ( $P < 0,01$ ).

#### 4.4.4. *Intersex*

O perfil de expressão do gene *amix* no desenvolvimento embrionário difere entre os sexos, marcadamente a partir de 48 horas APO (**Figura 15**). Durante o desenvolvimento embrionário e início do desenvolvimento larval (L1 e L2) a expressão do *ix* é maior nas fêmeas, e a partir da fase L5F1 até o final da fase larval, os machos apresentam níveis mais altos de transcritos de *amix* em relação às fêmeas. Perfis antagônicos do gene *amix* foram observados entre as castas, de L3 a L5F1, sendo que as operárias apresentaram maior expressão em relação às rainhas ( $\alpha = 0,05$ ;  $p < 0,01$ ).

As curvas de expressão do gene *amix* nas larvas das fêmeas sugeriram uma relação com os títulos de HJ. Nos pontos do desenvolvimento larval da rainha em que os títulos de hormônios são máximos (**Figura 3**), verifica-se a baixa expressão do gene *amix*. No entanto, nesse momento, as larvas de operárias apresentam baixos títulos de hormônio juvenil (revisado em Rachinsky & Hartfelder, 1998) e níveis de transcritos de *amix* mais altos. As diferenças encontradas nos títulos de hormônio juvenil refletem a alimentação diferencial oferecida às larvas fêmeas: larvas que se tornarão rainhas recebem uma maior proporção de geléia real enquanto as futuras operárias uma menor quantidade deste alimento (Huber, 1821; Rembold, 1965). A alimentação diferencial inicia-se na fase L2 e as consequências podem ser observadas já na fase seguinte. No final do desenvolvimento larval, os níveis de transcrição do gene *amix* tornam-se semelhantes entre as castas, momento em que as diferenças morfológicas entre operárias e rainhas já foram estabelecidas. Assim, foi realizado um ensaio em que uma dose de HJ foi aplicada em larvas L2 de futuras operárias (resultados não mostrados). No entanto, a análise da expressão de *amix* não mostrou diferenças significativas ( $\alpha = 0,05$ ;  $p > 0,01$ ) entre os grupos tratados com HJ, ou acetona e controle (sem tratamento). Esse resultado, portanto, refuta a hipótese de que os níveis de transcritos de *amix* possam estar relacionados com os títulos de HJ, pelo menos quando os níveis de HJ são modificados em

L2, que antecede a dicotomia rainha/operária. Em *D. melanogaster*, o gene *amix* codifica um co-fator de transcrição que atua em conjunto com a isoforma fêmea-específica do gene *dsx* (DsxF) regulando a transcrição de genes-alvo importantes na diferenciação sexual das fêmeas (Garrett-Engel *et al.* 2002; Siegal e Baker, 2005). Os altos níveis de transcritos encontrados no início do desenvolvimento das fêmeas de abelhas podem estar relacionados com essa função já descrita para o gene *ix* no desenvolvimento de fêmeas da mosca-das-fruta. Assim, como em *D. melanogaster*, o gene *amix* atuaria como um co-fator do produto gênico de *amdsx* também em *A. mellifera*. Considerando que a expressão de *amix* foi observada nos machos, ainda que em níveis mais baixos, durante o desenvolvimento embrionário e larval é possível que *amix* exerça alguma outra função, ainda desconhecida, nas abelhas melíferas.

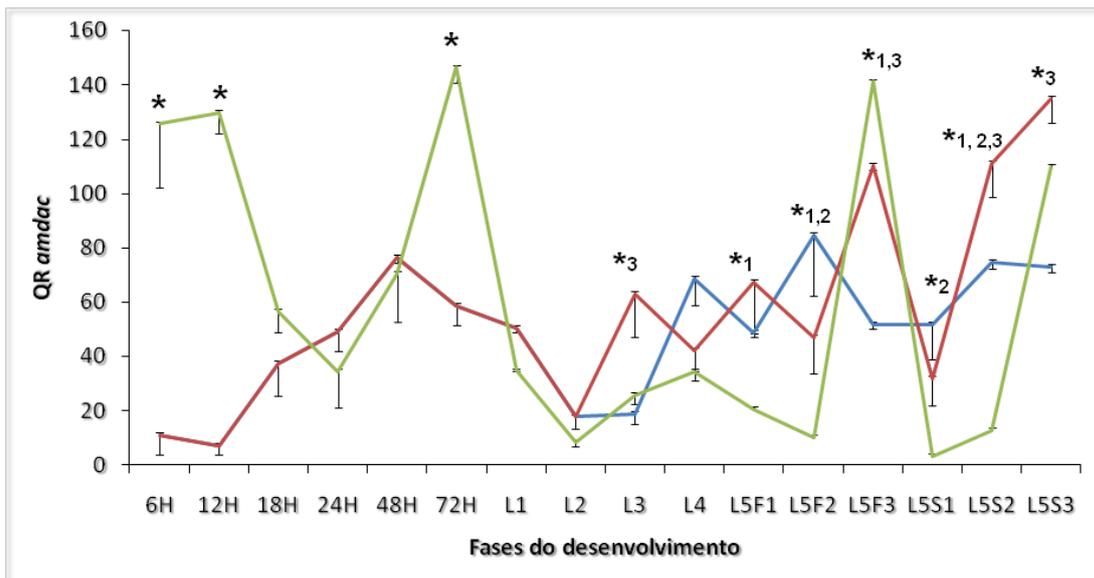


**Figura 15** - Expressão relativa de mRNAs do gene *amix* durante o desenvolvimento embrionário e larval de operária, rainha e zangão de *Apis mellifera*, por PCR semi-quantitativa. A expressão do gene *rp49* foi utilizada para normalizar a expressão do gene *amix*. A linha vermelha corresponde aos níveis de transcritos de rainha, linha azul de operária e linha verde de zangão. No desenvolvimento embrionário e nas fases L1 e L2, as linhas vermelha e azul se sobrepõem, pois as amostras de operária e rainha são diferentes a partir de L3. F: fase de alimentação; S: fase de tecelagem do casulo; QR: quantificação relativa dos transcritos; \*: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de macho e fêmea na fase embrionária e L1 e L2 ( $P < 0,01$ ); \*1: diferenças estatísticas entre

os níveis de transcritos de rainha e zangão ( $P < 0,01$ ); \*<sup>2</sup>: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de operária e zangão ( $P < 0,01$ ); \*<sup>3</sup>: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de operária e rainha ( $P < 0,01$ ).

#### 4.4.5. *Dachshund*

O gene *amdac* é mais expresso no desenvolvimento embrionário e no final do desenvolvimento larval de machos e fêmeas (**Figura 16**). O perfil de *amdac* é marcado por quatro picos de expressão em machos e três picos em fêmeas. Os momentos de maior expressão de *amdac* nos machos são em embriões 12 horas APO, 72 horas APO, em larvas L5F3 e L5S3 e nas fêmeas 48 horas APO, L5F3 e L5S3. Durante a primeira metade da fase larval o perfil apresenta variações de baixa amplitude. Em *D. melanogaster*, o gene *dac* é regulado indiretamente pelo fator de transcrição Dsx, através da via *wingless* e *decapentaplegic* e desempenha importante papel no desenvolvimento do disco genital (Keisman e Baker, 2001). Os discos imaginais, incluindo os discos genitais, iniciam sua formação no final da embriogênese da mosca-da-fruta (Campos-Ortega e Hartenstein, 1997). Pouco se sabe sobre o processo de formação dos discos imaginais nas abelhas durante a embriogênese. Durante a fase larval das abelhas, os discos genitais crescem e diferenciam-se e, no final dessa fase, inicia-se o processo de eversão dos discos imaginais (Cruz-Landim, 2008). Assim, os picos de expressão de *amdac* observados no final da embriogênese de fêmeas (48 horas) e machos (72 horas) apontam relação com a formação dos discos genitais nas abelhas melíferas. A alta expressão de *amdac* no final do desenvolvimento larval coincide com o momento da eversão desses discos que irão completar sua morfogênese durante a metamorfose (Cruz-Landim, 2008).



**Figura 16** - Expressão relativa de mRNAs do gene *amdac* durante o desenvolvimento embrionário e larval de operária, rainha e zangão de *Apis mellifera*, por PCR semi-quantitativa. A expressão do gene *rp49* foi utilizada para normalizar a expressão do gene *amdac*. A linha vermelha corresponde aos níveis de transcritos de rainha, linha azul de operária e linha verde de zangão. No desenvolvimento embrionário e nas fases L1 e L2, as linhas vermelha e azul se sobrepõem, pois as amostras de operária e rainha são diferentes a partir de L3. F: fase de alimentação; S: fase de tecelagem do casulo; QR: quantificação relativa dos transcritos; \*: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de macho e fêmea na fase embrionária e L1 e L2 ( $P < 0,01$ ); \*1: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de rainha e zangão ( $P < 0,01$ ); \*2: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de operária e zangão ( $P < 0,01$ ); \*3: diferenças estatísticas entre os níveis de transcritos de operária e rainha ( $P < 0,01$ ).

#### 4.4.6. Correlação entre os perfis de expressão

Coefficientes de correlação entre os perfis de expressão dos genes *csd*, *fem*, *amix*, *amdac* e das variantes de *amdsx* foram calculados para cada morfotipo (operária, rainha e zangão). Usando os valores de correlação, foram gerados grafos. Cada grafo representa o conjunto das relações significativas ( $p < 0,05$ ) entre os genes no desenvolvimento embrionário e larval de operária, rainha e zangão (**Figura 17**).

Comparações entre os grafos de operária, rainha e zangão evidenciaram interações compartilhadas e exclusivas de cada um.

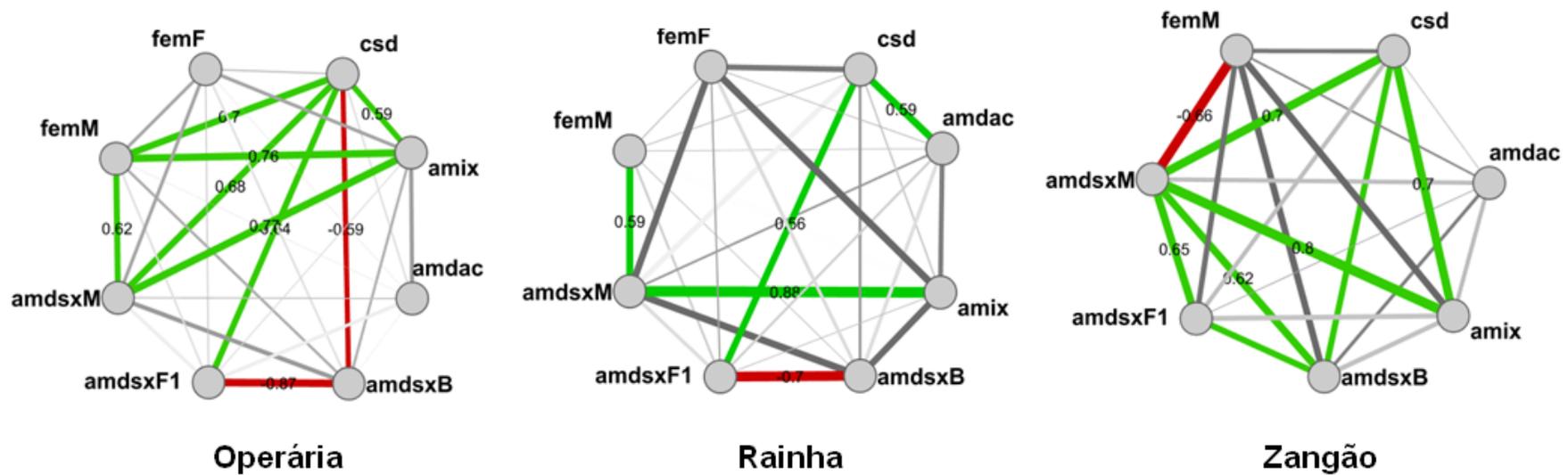
Comparações entre operária e rainha, revelaram três interações em comum nas castas: correlação positiva moderada entre o gene *csd* e a variante *amdsxF1* (R-operária = 0,64; R-rainha = 0,56) e entre *femM* e *amdsxM* (R-operária = 0,62; R-rainha = 0,59) e correlação forte e negativa entre *amdsxF1* e *amdsxB* (R-operária = -0,87; R-rainha = -0,7). Curiosamente, os dados de zangão revelaram coeficiente de correlação negativo entre *femM* e *amdsxM* (R = -0,66) e moderadamente positivo entre *amdsxF1* e *amdsxB* (R = 0,52).

Cada morfotipo apresentou pelo menos uma relação exclusiva entre os genes estudados. As relações entre o gene *csd* e a isoforma *femM* (R-operária = 0,7) e entre *femM* e *amix* (R-operária = 0,76) foram significativas exclusivamente nas operárias. Somente rainha apresentou coeficiente de correlação significativo entre *csd* e *amdac* (R-rainha = 0,59) e a relação entre as variantes *amdsxF1* e *amdsxM* (R-zangão = 0,65) foi notada apenas no zangão.

Operária e zangão apresentaram coeficientes de correlação positivos entre *csd* e *amix* (R-operária = 0,59; R-zangão = 0,70) e entre *csd* e *amdsxM* (R-operária = 0,68; R-zangão = 0,70). Ainda, comparando operária e zangão, foram observadas correlações opostas entre o gene *csd* e a variante *amdsxB* (R-operária = -0,59; R-zangão = 0,52).

Todos os morfotipos apresentaram correlação forte e positiva entre os genes *amdsxM* e *amix* (R\_operária = 0,77; R\_rainha = 0,88; R\_zangão = 0,8).

A relação entre *csd* e *amdsxF1* é exclusiva das fêmeas e está em plena concordância com o modelo atual de determinação do sexo em abelhas. Nesse modelo, a combinação entre duas proteínas Csd diferentes (codificadas a partir de alelos diferentes) culmina no processamento de *fem* e produz a isoforma FemF, que por sua vez dirige o processamento do pre-mRNA de *amdsx* em *amdsxF1* (Gempe *et al.*, 2009).



**Figura 17** – Grafos de correlação para os genes da cascata de determinação e diferenciação sexual de *Apis mellifera*. Os grafos foram gerados com base na correlação entre os perfis de expressão dos genes estudados para operária, rainha e zangão. A espessura das arestas é proporcional aos valores de correlação. As arestas verdes representam valores de correlação positivos e as arestas vermelhas valores negativos. As arestas cinzas correspondem a valores de correlação não-significativos. (nível de significância:  $p < 0,05$ ;  $R > 0,53$  ou  $R < - 0,53$ )

Para machos, o modelo atual de determinação do sexo em abelhas descreve uma relação entre o gene *csd* e as variantes *femM* e *amdsxM*. Nos machos, a proteína Csd não é ativa e assim o processamento do pré-mRNA do gene *fem* e, conseqüentemente, do gene *amdsx* resultariam em *femM* e *amdsxM* por *default* da via reguladora (Gempe *et al.*, 2009). No entanto, os dados de expressão analisados no presente trabalho evidenciaram relações entre *femM* e *amdsxM* e entre *csd* e *amdsxM* nas fêmeas. A presença dessas relações anteriormente associadas exclusivamente ao sexo masculino sugere que fêmeas de *A. mellifera* possam também ativar por *default* a via reguladora da cascata de determinação do sexo. A ativação da via reguladora por *default* se daria pela associação entre duas proteínas Csd que fossem iguais, i.e., codificadas a partir do mesmo alelo e, como conseqüência o pré-mRNA do *amdsx* seria processado resultando na formação de *amdsxM*.

Os coeficientes de correlação entre *amdsxF1* e *amdsxB* são fortemente negativos nas fêmeas e moderadamente positivo no macho. Essas informações reforçam o fato das variantes *amdsxF1* e *amdsxB* apresentarem perfis de expressão gênica antagônicos nas fêmeas e perfis similares nos machos (comparar **Figura 14 B** e **Figura 14 C**). Além disso, os machos apresentaram correlação positiva também entre as variantes *amdsxF1* e *amdsxM*, enquanto a correlação entre esses genes nas fêmeas revelou-se não-significativa. Os perfis de expressão das variantes do gene *amdsx* ao longo do desenvolvimento embrionário e larval são sexualmente dimórficos. Embora esses resultados não corroborem dados anteriores sobre a sexo-especificidade das variantes de *amdsx*, ficou claro que a quantidade de transcritos de cada variante de *amdsx* varia entre os sexos no desenvolvimento embrionário e larval. Os perfis do gene *csd* e da variante *amdsxB* são antagônicos na operária e similares no zangão, e por isso constituem outro exemplo de genes com expressão diferencial nos sexos no desenvolvimento embrionário e larval. Recentemente, Innocenti e Morrow (2010) mostraram uma tendência dos genes apresentarem expressão antagônica nos sexos de *Drosophila*

*melanogaster*. Acrescentaram ainda que a expressão gênica diferencial é esperada em machos e fêmeas, já que são organismos de fisiologia, morfologia e comportamento antagônicos.

Surpreendentemente, o gene *amix* mostrou-se fortemente correlacionado com a variante *amdsxM* em operária, rainha e zangão. O produto do gene *ix* em *D. melanogaster* atua como co-fator de DsxF e juntos regulam a diferenciação sexual nas fêmeas desta espécie (Garret-Engle *et al.*, 2002). A forte correlação entre *amix* e *amdsxM* sugere que *amix* exerça outra função no desenvolvimento das abelhas, além de participar na diferenciação sexual das fêmeas. Outra possível explicação seria que em abelhas a variante *amdsxM* codifique a proteína que atua em conjunto com Amix na diferenciação somática de fêmeas, uma vez que *amdsxM* se expressa nas operárias e rainhas. Poderia, inclusive, ser sugerido que as proteínas AmdsxM e Amix atuem em conjunto dirigindo a diferenciação sexual nos machos, dada a forte correlação entre os transcritos desses genes no desenvolvimento embrionário e larval de zangões.

A correlação entre *csd* e *amdac* é moderada e positiva e ocorre exclusivamente na rainha. A principal função conhecida de *dac* no desenvolvimento de *D. melanogaster* é a diferenciação sexual dos discos genitais, sob controle de *dsx*. Nas fêmeas de *D. melanogaster*, *dac* dirige a formação dos ductos da espermateca, sob regulação da proteína DsxF e o co-fator Ix (Christiansen *et al.*, 2002). Nas abelhas, apenas a rainha apresenta espermateca totalmente desenvolvida; esta estrutura armazena o esperma depositado pelo zangão durante a cópula. Nas operárias, a espermateca é vestigial (Snodgrass, 1984). Assim, sugere-se que *amdac* desempenhe importante papel na diferenciação sexual de abelhas, sobretudo na rainha o que é reforçado pela relação entre a cascata de determinação do sexo, através do gene *csd*, e o gene *amdac*.

Nossos resultados se contrapõem à ideia da expressão sexo-específica das variantes do gene *amdsx*. No entanto, é possível dizer que os genes aqui estudados, em especial no desenvolvimento embrionário, apresentam expressão sexualmente dimórfica. Os dados demonstram que a diferenciação sexual em abelhas ocorre pela expressão diferencial dos genes, uma vez que as variantes de mRNA de *amdsx* foram encontradas em proporções diferentes em machos e fêmeas no desenvolvimento embrionário e larval.

O fato dos trabalhos anteriores (Cristino *et al.*, 2006a; Cho *et al.*, 2007) não terem encontrado *amdsxM* nas fêmeas e *amdsxF1* nos machos provavelmente se deve às condições dos experimentos. Nesses trabalhos foram usadas amostras representativas das principais fases (embrionária, larval, pupal e adulto) sem, no entanto, caracterizar cada fase com detalhes. No presente estudo, as fases embrionária e larval foram subdivididas em dez pontos, resultando em perfis mais detalhados e maior clareza no entendimento dos perfis de cada gene estudado.

A presença das variantes ditas fêmeas-específicas (*amdsxF1* e *amdsxF2*) nos zangões já havia sido observada e foi discretamente descrita por Cho *et al.* (2007). Em *N. vitripennis*, outro himenóptero, transcritos predominantemente expressos nas fêmeas foram também encontrados nos machos e raramente, transcritos ditos macho-específicos foram encontrados nas fêmeas (Oliveira *et al.*, 2009).

Ensaio funcionais mostraram que o silenciamento do gene *csd* e da isoforma *femM* nos machos de *A. mellifera* não surtiu efeito sugerindo que *csd* e *femM* não sejam ativos nos machos (Hasselmann, *et al.*, 2008; Gempe *et al.*, 2009). Além disso, demonstraram que o processamento que resulta na variante *amdsxM* ocorre por *default* da via reguladora (Gempe *et al.*, 2009). A possibilidade da via reguladora ser ativada por *default* explicaria a presença de *femM* e *amdsxM* em operária e rainha e a forte correlação entre *csd*, *femM* e *amdsxM* presente, de modo geral, nas fêmeas. Quais mecanismos genéticos poderiam, no entanto,

explicar a expressão da variante *amdsxF1* no desenvolvimento embrionário e larval dos machos? O conhecimento disponível sobre os mecanismos genéticos que controlam o desenvolvimento sexual dos metazoários ainda não é o suficiente para se compreender que processos regulam a diferenciação dos sexos nas abelhas. Nossos dados contribuem com uma nova visão sobre expressão gênica ligada à determinação e diferenciação sexual em abelhas, fornecendo elementos que certamente contribuirão para elucidar tais mecanismos.

# Conclusões

---

---



## 5. CONCLUSÕES

Os resultados revelaram que não há processamento sexo-específico do mRNA do gene *amdsx*, uma vez que as três variantes de *amdsx* foram observadas a partir das fases embrionárias iniciais até as fases finais do desenvolvimento larval em operária, rainha e zangão.

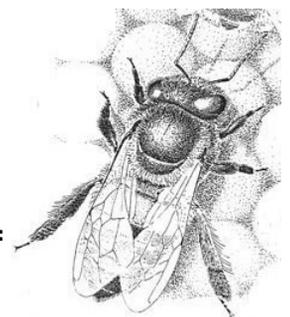
As relações entre *femM* e *amdsxM* e entre *csd* e *amdsxM* (anteriormente associadas exclusivamente ao sexo masculino) observadas nas fêmeas sugerem a ativação por *default* da via reguladora da cascata de determinação do sexo em operária e rainha.

Nossos dados sugerem que a diferenciação sexual em abelhas resulta da expressão sexualmente dimórfica dos genes da cascata de determinação e diferenciação sexual em abelhas.

# Perspectivas

---

---



## 6. PERSPECTIVAS

Para conhecer o papel do gene *amdsx* na diferenciação sexual das abelhas melíferas são necessários ensaios funcionais, por exemplo através do silenciamento deste gene via interferência por RNA. Além disso, vamos aprofundar os estudos sobre o desenvolvimento embrionário de *A. mellifera*, já que pouco se sabe sobre essa fase nessa espécie. Entre nossas perspectivas estão: (1) A padronização da técnica de silenciamento em embriões de *A. mellifera*. (2) Estudar as redes de transcrição que regem o desenvolvimento embrionário de *A. mellifera*. (3) Avaliar a expressão desses genes, sobre tudo das variantes do gene *amdsx* através da técnica de hibridação *in situ*, que permitiria obtermos um conhecimento da regulação temporal e espacial desses genes.

# Referências Bibliográficas

---

---



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3):403-410.

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.

Barrinuevo, F.; Bagheri-Fam, S.; Klattig, J.; Kist, R.; Taketo, R.; Englert, C.; Scherer, G. (2006) Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biology of Reproduction*. 74(1):195-201.

Ben-shahar, Y.; Leung, H. T.; Pak, W. L.; Sokolowski, M. B.; Robinson, G. E. (2003) cGMP-dependent changes in phototaxis: a possible role for the foraging gene in honey bee division of labor. *Journal of Experimental Biology*. 206: 2507-2515

Beukeboom, L. W.; Kamping, A.; van de Zande, L. (2007) Sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea): a critical consideration of models and evidence. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 18(3):371-8.

Beye, M.; Hasselmann, M.; Fondrk, M. K.; Page, R. E.; Omholt, S. W. (2003) The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114 (4): 419-429.

Beye, M. (2004) The dice of fate: the *csd* gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee, *Apis mellifera*. *BioEssays* 26: 1131-1139.

Bertossa, R. C.; van de Zande, L.; Beukeboom, L. W. (2009) The Fruitless Gene in *Nasonia* Displays Complex Sex-Specific Splicing and Contains New Zinc Finger Domains. *Mol Biol Evol* 26(7):1557–1569.

Beukeboom, L. W.; Kamping, A.; van de Zande, L. (2007) Sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea): A critical consideration of models and evidence. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 18: 371-378

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

Boleli, I.C.; Simões, Z.L.P.; Hartfelder, K. (1998). The stomatogastric nervous system of the honey bee (*Apis mellifera*) in a critical phase of caste development. *Journal of Morphology* 236 (2):139-149.

Bourbon, H. M.; Aguilera, A.; Ansari, A. Z.; Asturias, F. J.; Berk, A. J.; Bjorklund, S.; Blackwell, T. K.; Borggreffe, T.; Carey, M.; Carlson, M.; Conaway, J. W.; Conaway, R. C.; Emmons, S. W.; Fondell, J. D.; Freedman, L. P.; Fukasawa, T.; Gustafsson, C. M.; Han, M.; He, X.; Herman, P. K.; Hinnebusch, A. G.; Holmberg, S. (2004) A unified nomenclature for protein subunits of mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. *Molecular Cell*.14:553-557.

Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94.

Bridges, C. B. (1921). Triploid intersexes in *Drosophila melanogaster*. *Science* 54: 252–254.

Bridges, C. B. (1925) Sex in relation to chromosomes and genes. *The American Naturalist*. 59: 127–137.

Bull, J.B. (1983). Evolution of sex determining mechanisms. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc, Menlo Park, California, USA.

Burtis, K. C.; Coschigano, K. T.; Baker, B. S.; Wensink, P. C. (1991) The Doublesex proteins of *Drosophila melanogaster* bind directly to a sex-specific yolk protein gene enhancer. *The EMBO Journal* 10: 2577-2582.

Burtis, K. C. (1993). The regulation of sex determination and sexually dimorphic differentiation in *Drosophila*. *Current Opinion in Cell Biology*. 5: 1006-1014.

Campos-Ortega, J. A.; Hastenstein, V. (1997). The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Springer, 2<sup>nd</sup> Edition, Colônia, Alemanha.

Cho, S.; Wensink, P. C. (1998) Linkage between oligomerization and DNA binding in *Drosophila doublesex* proteins. *Biochemistry*. 37(32):11301-8.

Cho, S.; Huang, Z. Y.; Zhang, J. (2007) Sex-specific splicing of the honeybee doublesex gene reveals 300 million years of evolution at the bottom of the insect sex-determination pathway. *Genetics*. 177(3):1733-1741.

Christiansen, A. E.; Keisman, E. L.; Ahmad, S. M.; Baker, B. S. (2002) Sex comes in from the cold: the integration of sex and pattern. *TRENDS in Genetics* 18 (10): 510-516.

Cline, T. W.; Meyer, B. J. (1996) Vive la différence: males vs females in flies vs worms.

*Annual Review of Genetics*. 30: 637-702.

Conaway, R. C.; Sato, S.; Tomomori-Sato, C.; Yao, T.; Conaway, J. W. (2005) The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation *Trends in Biochemical Sciences*. 30:250-255.

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

Cristino, A. S.; Nascimento, A. M.; Costa, L. da F.; Simões, Z. L. (2006a) A comparative analysis of highly conserved sex-determining genes between *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Research*. 5(1): 154-168.

Cristino A. S.; Nunes, F. M. F.; Lobo, C. H.; Bitondi, M. M.G.; Simões, Z. L.P.; Costa L. F.; Lattorff, H. M. G.; Moritz, R. F.A.; Evans, J. D.; Hartfelder, K. (2006b) Caste development and reproduction - a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality. *Insect Molecular Biology*. 15 (5):703-14.

Cruz-Landim, C. (2008). *Abelhas; morfologia e função de sistemas*. Editora Unesp, São Paulo, Brasil.

Cvekl, A.; Tamm, E. R.(2004) Anterior eye development and ocular mesenchyme: New insights from mouse models and human diseases. *BioEssays* 26: 374-386.

Drescher, W.; Rothenbuhler, W. C. (1964) Sex determination in the honey bee. *Journal of Heredity*. 55: 90–96.

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

Erdman, S. E.; Burtis, K. C. (1993). The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain. *EMBO Journal*. 12: 527-535.

Estrada, B. e Sanchez-Herrero, E. (2001) The *Hox* gene *Abdominal-B* antagonizes appendage development in the genital disc of *Drosophila*. *Development*. 128: 331–339.

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

Fleig, R.; Sander, K. (1986) Embryogenesis of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): An sem study. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. 15 ( 5/6): 449-462.

Fujii, T. e Shimada, T. (2007) Sex determination in the silkworm, *Bombyx mori*: A female determinant on the W chromosome and the sex-determining gene cascade. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18: 379–388.

Garrett-Engle, C. M.; Siegal, M. L.; Manoli, D. S.; Williams, B. C.; Li, H.; Baker, B. S. (2002) *intersex*, a gene required for female sexual development in *Drosophila*, is expressed in both sexes and functions together with *doublesex* to regulate terminal differentiation. *Development*. 129: 4661–4675.

Gempe, T.; Hasselmann, M.; Schiøtt, M.; Hause, G.; Otte, M.; Beye, M. (2009) Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. *PLoS Biology*. 7 (10): 1-11.

Giese, K.;Cox, J.; Grosschedl, R.(1992) The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates the assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* 69: 185–195.

Goldman, T. D.; Arbeitman, M.N. (2007) Genomic and functional studies of *Drosophila* sex hierarchy regulated gene expression in adult head and nervous system tissues. *PloS Genetics*. 3:2278-2295.

Graham, P.; Penn, J. K. M.; Schedl, P. (2002) Masters change, slaves remain. *Bioessays* 25: 1-4.

Grainger, R. M. (1992) Embryonic lens induction: Shedding light on vertebrate tissue determination. *Trends in Genetics*. 8: 349–356.

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

Hasselmann, M.; Gempe, T.; Schiøtt, M.; Nunes-Silva, C. G.; Otte, M.; Beye, M. (2008) Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature* 454(7203): 519-522.

Hediger, M.; Burghardt, G.; Siegenthaler, C.; Buser, N.; Hilfiker-Kleiner, D.; Dübendorfer, A.; Bopp, D. (2004) Sex determination in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* converges at the level of the terminal regulator *doublesex*. *Development Genes and Evolution*. 214: 29-42.

Hedley, M. L.; Maniatis, T. (1991). Sex-specific splicing and polyadenylation of dsx pre-mRNA requires a sequence that binds specifically to tra-2 protein in vitro. *Cell* 65:579–586.

Heinrichs, V.; Ryner, L. C.; Baker, B. S. (1998). Regulation of sex-specific selection of fruitless 5' splice sites by transformer and transformer-2. *Mol Cell Biol*. 18:450–458.

Herrmann, M.; Trenzcek, T.; Fahrenhorst, H.; Engels, W. (2005) Characters that differ between diploid and haploid honey bee (*Apis mellifera*) drones. *Genetic Molecular Research*. 30;4(4):624-41.

Hildreth, P.E. (1965). Doublesex, a recessive gene that transforms both males and females of *Drosophila* into intersexes. *Genetics* 51, 659–678.

Huber, F. (1821). New observations on bees. W. & C. Tait and Longman, Hurst, Rees, Orme and Brown, Londres, Inglaterra.

Hummel, K. P.; Chapman, D. B. (1959) Visceral inversion and associated anomalies in the mouse. *Journal of Heredity* 50: 9–13.

Innocenti P, Morrow EH, 2010 The Sexually Antagonistic Genes of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* 8(3): e1000335. doi:10.1371/journal.pbio.1000335.

Jinwal, U. K.; Zakharkin, S. O.; Litvinova, O. V.; Jain, S.; Benes, H. (2006) Sex-, stage- and tissue-specific regulation by a mosquito hexamerin promoter. *Insect Molecular Biology* 15(3): 301-311.

Keisman, E. L.; Baker, B. S. (2001) The *Drosophila* sex determination hierarchy modulates *wingless* and its decapentaplegic signaling to deploy *dachshund* sex-specifically in the genital imaginal disc. *Development* 128: 1643-1656.

Kerr, W. E. (1967) The history of the introduction of Africanized bees to Brazil. *South African Bee Journal*. 39: 3-5.

Koop, A.; Duncan, I.; Carroll, S. B. (2000) Genetic control and evolution of sexually dimorphic characters in *Drosophila*. *Nature*. 408: 553-559.

Koopman, P.; Gubbay, J; Vivian,N.; Goodfellow, P.; Lovell-Badge, R. (1991) Male

development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351: 117–121.

Kuhn, S.; Sievert, V.; Traut, W. (2000) The sex-determining gene *doublesex* in the fly *Megaselia scalaris*: Conserved structure and sex-specific splicing. *Genome*. 43: 1011-1020.

Lariviere, L.; Seizl, M.; van Wageningen, S.; Rother, S.; van de Pasch, L.; Feldmann, H.; Strasser, K.; Hahn, S.; Holstege, F. C.; Cramer, P. (2008) Structure-system correlation identifies a gene regulatory Mediator submodule *Genes & Development*. 22:872-877.

Layton, W. M., Jr. (1976) Random determination of a developmental process. *Journal of Heredity* 67: 336–338.

Le Bras, S.; Van Doren M. (2006) Development of the male germline stem cell niche in *Drosophila*. *Development Biology*. (1):92-103.

Li, H.-S.; Yang, J.-M.; Jacobson, R. D.; Pasko, D.; Sundin, O. (1994) *Pax-6* is first expressed in a region of ectoderm anterior to the early neural plate: Implications for stepwise determination of the lens. *Developmental Biology*. 162: 181–194.

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

Ludolph, D. C.; Neff, A. W.; Parker, M. A.; Mescher, A. L.; Smith, R. C.; Malacinski, G. M. (1995) Cloning and expression of the axolotl proto-oncogene *ski*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1260:102-104.

Marchler-Bauer, A. e Bryant, S. H. (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research*. 32(W)327-331.

Marchler-Bauer, A.; Anderson, J. B.; Chitsaz, F.; Derbyshire, M. K.; DeWeese-Scott, C.; Fong, J. H.; Geer, L. Y.; Geer, R. C.; Gonzales, N. R.; Gwadz, M.; He, S.; Hurwitz, D. I.; Jackson, J. D.; Ke, Z.; Lanczycki, C. J.; Liebert, C. A.; Liu, C.; Lu, F.; Lu, S.; Marchler, G. H.; Mullokandov, M.; Song, J. S.; Tasneem, A.; Thanki, N.; Yamashita, R. A.; Zhang, D.; Zhang, N.; Bryant, S.H. (2009) CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research* 37 (D)205-10.

Mardon, G.; Solomon, N. M.; Rubin, G. M. (1994) *dachshund* encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development*. 120(12):3473-86.

Marín, I.; Baker, B. S. (1998) The Evolutionary Dynamics of Sex Determination. *Science*

281: 1990-1994.

Mason, D. A.; Rabinowitc, J. S.; Portman, D.S. (2008) *dmd-3*, a doublesex-related gene regulated by *tra-1*, governs sex-specific morphogenesis in *C. elegans*. *Development*. 14: 2373-82.

Meng, A.; Moore, B.; Tang, H.; Yuan, B.; Lin, S. (1999) A *Drosophila* doublesex-related gene, *terra*, is involved in somitogenesis in vertebrates. *Development* 126 (6): 1259-1268.

Michelette, E. R.; Soares, A. E. E. (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*. 24: 431-440.

Narendra, U.; Zhu, L.; Li, B.; Wilken, J.; Weiss, M.A. (2002) Sex-specific gene regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (45): 43463-43473.

Nelson, J. A. (1915) *The Embryology of the Honey bee*. Princeton Univ. Press, Princeton.

Oliveira, D. C.; Werren, J. H.; Verhulst, E. C.; Giebel, J. D.; Kamping, A.; Beukeboom, L. W.; van de Zande, L. (2009) Identification and characterization of the doublesex gene of *Nasonia*. *Insect Molecular Biology*. 18(3):315-24.

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

Peri, F.; Bökel, C.; Roth, S. (1999) Local Gurken signaling and dynamic MAPK activation during *Drosophila* oogenesis. *Mechanisms of Development*. 81: 75–88.

Pontiggia, A.; Rimini, R.; Goodfellow, P. N.; Lovell-Badge, R.; Bianchi, M. E. (1994). Sex-reversing mutations affect the architecture of Sry/DNA complexes. *EMBO Journal* 13: 6115–6124.

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

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

Ray, R. P.; Schüpbach, T. (1996). Intercellular signaling and the polarization of body axes during *Drosophila* oogenesis. *Genes & Development*. 10: 1711–1723.

Raymond, C. S.; Shamu, C. E.; Shen, M. M.; Seifert, K. J.; Hirsch, B.; Hodgkin, J.; Zarkower, D. (1998) Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391, 691-695

Rembold H, Kremer J-P, Ulrich G (1980) Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 11:29-38

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

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

Rozen, S.; Skaletsky, H. J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386

Ruiz, M. F.; Eirín-Lopez, J. M.; Stefani, R. N.; Perondini, A. L. P.; Selivon, D.; Sánchez, L. (2007) The gene *doublesex* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *Developmental Genes and Evolution*. 217: 725-731.

Rutherford, K.; Parkhill, J.; Crook, J.; Horsnell, T.; Rice, P.; Rajand-ream, M. A.; Barrell, B. (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16: 944-945.

Saha, M. S.; Spann, C. L.; Grainger, R. M. (1989) Embryonic lens induction: More than meets the optic vesicle. *Cell Differentiation and Development*. 28: 153–172.

Salz, H. K.; Maine, E. M.; Keyes, L. N.; Samuels, M. E.; Cline, T. W.; Schedl; P. (1989) The *Drosophila* female-specific sex-determination gene, *Sex-lethal*, has stage-, tissue-, and sex-specific RNAs suggesting multiple modes of regulation. *Genes & Development*. 3: 708–719.

Sanchez, L.; Guerrero, I. (2001) The development of the *Drosophila* genital disc. *BioEssays*. (23): 698-707.

Sanchez, L. (2008) Sex-determining mechanisms in insects. *The International Journal of Developmental Biology*. 52: 837-856 (2008).

Sato, S.; Tomomori-Sato, C.; Parmely, T. J.; Florens, L.; Zybaylov, B.; Swanson, S. K.; Banks, C. A.; Jin, J.; Cai, Y.; Washburn, M. P.; Conaway, J. W.; Conaway, R. C. (2004) A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Molecular Cell*. 14:685-691.

Shearman, D. C.; Frommer, M. (1998) The *Bactrocera tryoni* homologue of the *Drosophila melanogaster* sex-determination gene *doublesex*. *Insect Molecular Biology*. 7(4): 355-366.

Shen, M. M.; Hodgkin, J. (1988) *mab-3*, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. *Cell* 54(7):1019-31.

Severson, D.W.; Williamson, J.L.; Aiken, J.M. (1989) Caste-specific transcription in the female honey bee. *Insect Biochemistry* 19: 215-220.

Siegal, M. L.; Baker, B. S. (2005) Functional conservation and divergence of *intersex*, a gene required for female differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Development Genes and Evolution*. 215(1): 1-12.

Sinclair, A. H.; Berta, P.; Palmer, M. S.; Hawkins, J. R.; Griffiths, B.L.; Smith, M.J.; Foster, J.W.; Frischauf, A.M.; Lovell-Badge, R.; Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240–244.

Snodgrass, R.E. (1984) *Anatomy of the honey bee*. Cornell University, London.

Stephanson, E. C.; Chao, Y.-C.; Frackenthal, J. D. (1988) Molecular analysis of the swallow gene of *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development*. 2: 1655–1665.

Suzuki, M. G.; Ohbayashi, F.; Mita, K.; Shimada, T. (2001) The mechanism of sex-specific splicing at the *doublesex* gene is different between *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31: 1201-1211.

Suzuki, M. G.; Funaguma, S.; Kanda, T.; Tamura, T.; Shimada, T. (2003) Analysis of the biological functions of a *doublesex* homologue in *Bombyx mori*. *Development Genes and Evolution*. 213(7): 345-354.

Suzuki, M. G.; Funaguma, S.; Kanda, T.; Tamura, T.; Shimada, T. (2005) Role of the male BmDSX protein in the sexual differentiation of *Bombyx mori*. *Evolution & Development* 07: 58-68.

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

Tozetto, S. O. (1997) Hormonelle Steuerung in der Entwicklung von Drohnen (*Apis mellifera carnica*). Tese de doutorado. Dissertação de mestrado. Universidade de Tübingen. pp. 122.

Waterbury, J. A.; Jackson, L.L.; Schedl, P. (1999) Analysis of the Doublesex Female Protein in *Drosophila melanogaster*: Role in Sexual Differentiation and Behavior and Dependence on Intersex. *Genetics*. 152: 1653-1667.

Werner, M. H.;Huth, J. R.; Groneborn,A. M.; Clore, G. M. (1995) Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY–DNA complex. *Cell* 81: 705–714.

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

Yokoyama, T.; Copeland, N . G.; Jenkins,N. A.; Montgomery, C. A; Elder,F. F. B.; Overbeek, P. A. (1993) Reversal of left-right symmetry: A *situs inversus* mutation. *Science* 260: 679–682.

# 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](#)