Estrutura do gene da Esterase do Hormônio Juvenil de *Apis mellifera* e seu papel durante o desenvolvimento pós-embrionário e a diferenciação de castas.

Aline Mackert dos Santos

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

**Estrutura do gene da Esterase do Hormônio Juvenil
de *Apis mellifera* e seu papel durante o
desenvolvimento pós-embrionário e a diferenciação
de castas.**

Aline Mackert dos Santos

Ribeirão Preto

-2004-

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

**Estrutura do gene da Esterase do Hormônio Juvenil
de *Apis mellifera* e seu papel durante o
desenvolvimento pós-embrionário e a diferenciação
de castas.**

Aline Mackert dos Santos

Dissertação de Mestrado 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: Prof^ª Dr^ª Zilá Luz Paulino Simões

Ribeirão Preto
-2004-

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

SANTOS, ALINE MACKERT

Estrutura do gene da Esterase do Hormônio Juvenil de *Apis mellifera* e seu papel durante o desenvolvimento pós-embriônico e a diferenciação de castas./ Aline Mackert dos Santos; orientadora: Simões, Zilá Luz Paulino. – São Paulo, 2004.

93p.:20 il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Genética.

1. *Apis mellifera*. 2. Esterase do Hormônio Juvenil. 3. Desenvolvimento.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Mackert dos Santos

Estrutura do gene da Esterase do Hormônio
Juvenil de *Apis mellifera* e seu papel durante o
desenvolvimento pós-embriônico e a
diferenciação de castas.

Dissertação de Mestrado 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

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Profº (a) Drº (a).-----

Instituição----- Assinatura-----

Profº (a) Drº (a).-----

Instituição----- Assinatura-----

Profº (a) Drº (a).-----

Instituição----- Assinatura-----

**“Não existe nada de completamente errado
no mundo, mesmo um relógio parado
consegue estar certo duas vezes por dia”.**

Paulo Coelho

A todos os meus professores, que sem dúvida nenhuma me ensinaram o prazer de estudar. Em especial, á **Nadir**, minha professora de ciências durante o ginásio, a **Yara**, professora de biologia durante o 2º grau, à **Ana Lúcia e Rogério**, meus professores de genética e evolução na graduação. E também as minhas queridas orientadoras: **Silvia Helena Sofia**, minha orientadora durante a iniciação científica que me ensinou a amar as abelhas e **Zilá Luz Paulino Simões**, que me abriu as portas do mundo da pesquisa, me dando um voto de confiança, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

- Zilá L. P. Simões pela orientação durante este trabalho e pela ótima companhia;
- À FAPESP pela concessão da bolsa que foi essencial na realização deste trabalho;
- Ao meu amigo e técnico do laboratório, Luís Aguiar pelo auxílio na obtenção do material biológico;
- Aos professores Márcia Bitondi, Klaus Hartfelder, Ademilson Espencer, Lionel Gonçalves e David de Jong pela amizade;
- Aos amigos de laboratório: Adriana Mendes, Anete Lourenço, Karina Guidugli, Angel Roberto Barchuk, José Ezequiel, Vera Figueiredo, sem os quais o mestrado teria se tornado muito mais difícil;
- A todos os amigos do bloco A da genética que me receberam de braços abertos;
- Aos meus adorados amigos Viviane Favaretto e Rodrigo Dallacqua pela amizade, é muito bom ter amigos como vocês;
- Ao meu amigo André Laforga Vanzela que me apoiou exaustivamente para que eu chegasse até aqui;
- Aos meus irmãos de coração: Leandra, Daniela, Juliana, Alejandro e Daniel, que junto comigo organizaram o IX Curso de Verão em Genética;
- A minha amiga Ana Carolina que foi companheira em muitos eventos não oficiais;

- Aos colegas de quarto na moradia da pós-graduação: Simone e Gláucio que me agüentaram sem reclamar;
- Às queridas secretárias do departamento: Maria Aparecida, Susi e Cleusa;
- Em especial, quero agradecer à minha família que eu amo loucamente: meu pai Marcos, minha mãe Amélia, meu irmão Alan e minha irmã Amanda, se eu não fosse tão apaixonada pelo meu trabalho seria impossível viver longe de vocês.
- Ao meu namorado Fabrício por estar sempre ao meu lado. E a minha nova família: Ticiane, Juliana, Elcio, Joana, Ariel, Thaís e meu sogro querido José Antônio;
- Muitas pessoas foram essenciais para que eu me tornasse o que sou, não poderia citar todas aqui, mas guardo todas em meu coração.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

Lista de figuras.....x

Lista de tabelasxi

Lista de abreviaçõesxii

Lista de símbolosxiii

Resumoxv

Abstractxviii

1. Introdução01

- 1.1. Diferenciação de castas em *Apis mellifera*02
- 1.2. Títulos de hormônio juvenil e ecdisteróides em *Apis mellifera*07
- 1.3. O metabolismo do HJ: síntese e degradação11
- 1.4. Esterases gerais e específicas do Hormônio Juvenil15

2. Objetivos19

3. Material e Métodos21

- 3.1. Material biológico24
- 3.2. Dissecção do material biológico25
- 3.3. Extração do RNA total e síntese do cDNA26
- 3.4. Obtenção de DNA genômico26
- 3.5. Isolamento do gene da esterase do hormônio juvenil de *Apis mellifera* por ORESTES (Projeto Piloto Electrapis)26
- 3.6. Análise da sequência da EHJ de *Apis mellifera*28
- 3.7. Obtenção da sequência gênica completa da EHJ30
- 3.8. Reação em cadeia da polimerase e eletroforese31
- 3.9. Preparo das células quimiocompetentes32
- 3.10. Clonagem e sequenciamento33
- 3.11. Análise da expressão do AmEHJ por RT-PCR 34
- 3.12. Análise por Northern e Southern Blot36
- 3.13. Tratamento de larvas e pupas de operárias com PPN e 20E38

4. Resultados40

- 4.1. Identificação do AmEHJ41
- 4.2. Detecção do transcrito do AmEHJ45
- 4.3. Análise da sequência da EHJ46
- 4.4. Expressão do AmEHJ ao longo do desenvolvimento de operárias52
- 4.5. Expressão do AmEHJ nas castas e sexos55
- 4.6. Expressão do AmEHJ em ovários de larvas de rainhas e operárias57
- 4.7. Expressão do AmEHJ em diferentes tecidos e órgãos57
- 4.8. Tratamento de pupas de olho marrom com PPN e 20E59
- 4.9. Tratamento de larvas de operárias com PPN e 20E60

5. Discussão61

- 5.1. Análise comparativa com EHJs de outros insetos63
- 5.2. O AmEHJ tem expressão diferencial ao longo do desenvolvimento pós-embrionário de operárias64
- 5.3. Existem diferenças de expressão do AmEHJ nas castas e sexos.67
- 5.4. O desenvolvimento diferencial de ovários de rainhas e operárias está relacionado a diferentes níveis de expressão do AmEHJ68
- 5.5. O AmEHJ se expressa em diferentes tecidos.71
- 5.6. Regulação da expressão do AmEHJ: inibição por ecdisteróides.72
- 5.7. Perspectivas74

6. Conclusões77

Referências bibliográficas80

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Títulos de hormônio juvenil em *Apis mellifera*09
Figura 2 – Títulos de ecdisteróides em *Apis mellifera*10
Figura 3 – Atividade das isoformas de carboxiesterases em *Apis mellifera*17
Figura 4 – Esquema da estrutura do gene da EHJ42
Figura 5 – Seqüência do gene da EHJ43
Figura 6 – Northern Blot para localização do mRNA da EHJ45
Figura 7 – Alinhamento entre as seqüências de EHJ de insetos48
Figura 8 – Dendograma de similaridade entre as EHJ de insetos50
Figura 9 – Esquema da estrutura da EHJ de insetos51
Figura 10 – Curva de saturação 52
Figura 11 – Expressão do gene da EHJ ao longo do desenvolvimento54
Figura 12 – Expressão do gene da EHJ em operárias adultas55
Figura 13 – Expressão do gene da EHJ entre castas e sexos56
Figura 14 – Expressão do gene da EHJ em ovários de rainhas e operárias58
Figura 15 – Expressão do gene da EHJ em diferentes tecidos e órgãos58
Figura 16 – Efeito do tratamento com hormônios em pupas59
Figura 17 – Efeito do tratamento com análogo do HJ em larvas de 3º estágio60
Figura 18 – Efeito do tratamento com hormônios em larvas de 5º estágio60
Figura 19 – Esquema da expressão do gene da EHJ e carboxiesterases66
Figura 20 – Foto ilustrativa do desenvolvimento de ovários de rainhas e operárias70

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Características da EHJ de insetos18

Tabela II – Classificação dos estágios do desenvolvimento de operárias23

Tabela III – Identificação das EHJs de insetos usadas para análise29

LISTAS DE ABREVIACÕES

AF.....	Ácido Farnesóico
AmEHJ.....	Gene da Esterase do Hormônio Juvenil
CA.....	<i>Corpora allata</i>
cDNA.....	DNA complementar ao RNA mensageiro
EHHJ.....	Epoxide Hidrolase do Hormônio Juvenil
EHJ.....	Esterase do Hormônio Juvenil
EtBr.....	brometo de etídeo
FA.....	fosfatase ácida
FAMET.....	Metil-transferase do Ácido Farnesóico
HJ.....	Hormônio Juvenil
JHBP.....	proteínas de ligação ao Hormônio Juvenil
MF.....	Metil Farnesoato
MFE.....	Metil Farnesoato Epoxidase
mRNA.....	RNA mensageiro
PCR.....	Reação em cadeia da polimerase
PPN.....	Pyriproxyfen
PTTH.....	Hormônio Protoracicotrópico
RT.....	Transcrição reversa
TA.....	temperatura ambiente
20E.....	20-hidroxiecdisona

LISTA DE SÍMBOLOS

°C.....	graus Celsius
μl.....	microlitro
μg.....	micrograma
ml.....	mililitro
M.....	molar
nm.....	nanômetro

RESUMO

RESUMO

SANTOS, A. M. Estrutura do gene da Esterase do Hormônio Juvenil de *Apis mellifera* e seu papel durante o desenvolvimento pós-embrionário e a diferenciação de castas. 93p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Os hormônios juvenis (HJ) são uma classe de sesquiterpenóides que executam um papel crucial no desenvolvimento dos insetos. O HJ modula a ação de ecdisona, prevenindo a metamorfose nos estágios larvais. Os títulos deste hormônio são determinados pela sua síntese nos *Corpora Allata* e pela atividade hidrolítica de uma esterase específica (EHJ – Esterase do Hormônio Juvenil), um membro da família das carboxiesterases (3.1.1.1), que transforma o HJ em um metabólito considerado inativo (HJ-ácido). O HJ está intimamente envolvido no desenvolvimento e diferenciação de castas em *A. mellifera*; os títulos de hormônio diferem consideravelmente durante o desenvolvimento das castas. A metodologia ORESTES (Open-Reading-Frame-Expressed-Sequence-Tags) foi usada para a obtenção da sequência do gene da EHJ. Vinte e seis clones que mostraram homologia com a sequência da EHJ de outros insetos foram usados para a construção de primers para a análise da expressão do gene em experimentos de RT-PCR. O fragmento obtido pela amplificação utilizando estes primers mostrou alta identidade com as EHJ de *Drosophila melanogaster* e *Tenebrio molitor* em nível de aminoácidos. A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando RNA total e usada como molde para PCR. A normalização foi feita utilizando-se a expressão do gene da actina de *A. mellifera*. O gene da EHJ é mais expresso em corpo gorduroso e epitélio do intestino. O pico de expressão do gene em operárias foi observado nos estágios

que antecedem a metamorfose (L5F e L5S), após este período ocorre diminuição de expressão do gene em pré-pupas e pupas jovens e um aumento de expressão no final do período pupal e adultos de até 15 dias. A atividade do gene da EHJ está relacionada aos títulos de HJ durante o desenvolvimento, o que sugere a importância da EHJ para que a metamorfose ocorra normalmente. Os níveis de mRNA da EHJ foram quantificados nas castas e sexos. Operárias mostraram a maior expressão do gene durante os estágios de L3, L4, L5F1 e L5S1. Em rainhas, a expressão aumenta em pré-pupa, ao contrário do que ocorre em operárias. Os menores níveis de expressão ocorrem em zangões. A expressão do gene da EHJ é menor quando o HJ é essencial para o desenvolvimento das características de rainhas, o que ocorre nos estágios larvais mais jovens, podendo ser estabelecida relação direta entre o HJ e os níveis de mRNA da EHJ durante o desenvolvimento e manutenção de características de cada casta. O gene mostrou menor expressão em ovários de rainhas nos estágios larvais, isto pode ter importância na manutenção dos níveis de HJ para que este órgão seja protegido de degeneração, garantindo seu desenvolvimento normal. Já que os níveis de HJ são diferentes nas castas e sexos, a atividade diferencial do gene da EHJ aparentemente é um elemento chave na manutenção dos tipos morfológicos nesta complexa sociedade. O gene foi inibido pela aplicação de 20E em pupas, assim, sugerimos que o gene é induzido pela presença de HJ, como ocorre nas fases larvais jovens e após a emergência, e inibido na presença de ecdisteróides, já que os resultados obtidos neste trabalho mostram que o gene da EHJ está reprimido quando os títulos de ecdisteróides estão elevados nas fases pupais.

Palavras chave: *Apis mellifera*; Esterase do Hormônio Juvenil; Desenvolvimento

ABSTRACT

ABSTRACT

SANTOS, A. M. Honey bee (*Apis mellifera*) juvenile hormone esterase gene structure and its role during post-embryonic development and caste differentiation. 93p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

The juvenile hormones (JH) are a class of sesquiterpenoids that play a crucial role in insect development. JH modulate the activity of ecdysone, preparing for metamorphosis at the end of the larval phase. The titers of this hormone are mainly determined by synthesis in the corpora allata and by the hydrolytic activity of a specific esterase (JHE - Juvenile Hormone Esterase), a carboxylesterase family member (3.1.1.1), which transforms JH into a metabolite considered inactive (JH-acid). JH is intimately involved in *Apis mellifera* development and caste differentiation; the hormone titers differ considerably in developing queens and workers. The ORESTES (Open-Reading-Frame-Expressed-Sequence-Tags) methodology was used to obtain the JHE gene sequence. Twenty six clone sequences that showed homology with JHEs of other insects were used to construct specific primers to perform RT-PCR, in order to analyze JHE gene expression. The fragment amplified using these primers showed high identity with the JHE of *Drosophila melanogaster* and *Tenebrio molitor* at amino acid level. First strand cDNA was synthesized using total RNA and used as template for PCR. *A. mellifera* actin gene expression levels were used for normalization. The JHE gene is highly expressed in fat body and gut epithelium. The highest peak of JHE gene expression in workers was observed in the stages before metamorphosis, i.e. L5F and L5S, after which

there is a decrease in the gene expression of pre-pupae and young pupae, with a increase at the end of pupal stages, and in the adult stages (until 15 days). The JHE gene activity is extremely related with the JH titers during the development, what suggests the importance of JHE enzyme activity to the normal metamorphosis. We quantified JHE mRNA levels in the castes and sexes of *A. mellifera*. Workers have the highest JHE gene expression levels during L3, L4, L5F1 and L5S1. In queens, there is an increase of JHE gene expression in pre-pupae, otherwise in works this stage shows a decrease in JHE expression. The lowest expression levels occur in drones. JHE expression is lower when JH is essential for the development of queen characteristics, what occurs during the early phases. Therefore it is possible to establish a direct relationship between JH and JHE mRNA levels during development and maintenance of the characteristics in each caste. The gene shows low expression levels in queens' ovaries during larval stages where it may be important to the maintenance of JH levels, in order to protect this organ from degeneration, and to warrant a normal development. Since the levels of JH are different in the castes and sexes, the differential activity of the JHE gene apparently plays a key role in the maintenance of the morphotypes of this complex insect society. The gene was inhibited by 20E application in pupae, so we can suggest that the gene is induced by JH presence like we detected during larval stages and after emergence, and inhibited by ecdysteroids, since the data obtained in this work suggest that the JHE gene is repressed when the ecdysteroids titers are elevated.

Key-words: *Apis mellifera*; Juvenile Hormone Esterase; Development.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diferenciação de castas em *Apis mellifera*

A divisão do trabalho tem um significado profundo na sociedade dos insetos (Hartfelder & Steinbrück, 1997). Naquelas onde se observa uma clara diferença entre os fenótipos, a divisão de trabalho constitui um caráter marcante (Michener, 1974). Em uma colônia *Apis mellifera* são encontrados três tipos de indivíduos: zangões, rainhas e operárias. Cada um destes organismos possui funções específicas que levam à manutenção da colônia.

Os zangões são machos gerados a partir de ovos não fecundados, portanto haplóides, cuja função é a cópula com a rainha. A rainha, fêmea diplóide (oriunda de ovos fecundados), retém a atividade reprodutiva, efetuando a cópula, a postura de ovos e produzindo feromônios que controlam e organizam diversas funções na colônia. As operárias, fêmeas funcionalmente estéreis, também desenvolvidas de ovos fecundados, desempenham a partir da emergência uma série de tarefas que obedecem a uma ordem cronológica: limpeza e remoção de cera do ninho, alimentação e cuidado com a prole (abelhas mais jovens), construção, limpeza e aprovisionamento das células das crias, produção de cera, processamento de pólen e néctar para a produção do mel e proteção da colméia (abelhas com idade média) e forrageamento (operárias mais velhas) (Michener, 1969, 1974; Laidlaw, 1992; Jassim *et al.*, 2000; Page & Peng, 2001; Page & Erber, 2002).

Dentro de uma colônia a divisão de trabalho ocorre de duas formas, (1) a divisão do trabalho reprodutivo entre operárias e rainhas e (2) a divisão cronológica do trabalho entre as operárias, que é conhecida como polietismo etário (Laidlaw, 1992), que está associado com mudanças comportamentais e fisiológicas (Fluri *et al.*, 1982). O polietismo etário observado em *Apis mellifera* é um sistema flexível que

varia de acordo com as necessidades da colônia (Huang & Robinson, 1992; Hartfelder, 2000). Dessa forma, operárias mais velhas podem reassumir funções internas se necessário, alterando sua fisiologia (Lindauer, 1961; Laidlaw, 1992).

O hormônio juvenil (HJ) está envolvido no controle do polietismo etário em operárias adultas de *A. mellifera* (Huang, *et al.*, 1991). Os títulos de HJ aumentam conforme aumenta a idade das abelhas (Fluri *et al.*, 1982; Robinson *et al.*, 1987). Baixos títulos de HJ estão associados com tarefas executadas no ninho, enquanto altos níveis estão associados ao forrageamento (Huang, *et al.*, 1991). O tratamento com hormônio juvenil (Jaycox *et al.*, 1976), aplicação de substâncias que mimetizam o HJ (Jaycox *et al.*, 1974), ou com análogo do hormônio juvenil (Robinson, 1985, 1987; Sasagawa *et al.*, 1985) induzem o forrageamento precoce.

Operárias e rainhas de *Apis mellifera* são morfologicamente distintas, da mesma maneira que o comportamento e a fisiologia. Operárias não apresentam comportamento de acasalamento, apesar de possuírem ovários funcionais e poderem efetuar postura de ovos não fecundados, em condições especiais (Michener, 1974; Robinson *et al.*, 1992; Ratnieks, 1993; Barron *et al.*, 2001). As rainhas não desenvolvem estruturas especializadas para coleta e processamento do pólen, papel exercido com alta eficiência pelas operárias (Hartfelder, 2000; Michener, 1969).

O estímulo primário para o processo de diferenciação de castas é a alimentação diferenciada (Rembold *et al.*, 1974; Free, 1980; Hartfelder, 2000; Page & Peng, 2001; Reginato & Cruz-Landim, 2001,2002). A rainha recebe geléia real durante todo o estágio larval; enquanto as operárias, após o segundo dia larval, passam a receber ao invés de geléia real, uma mistura de mel, pólen e secreções das glândulas hipofaríngeas das operárias nutrizas (Michener, 1969; Free, 1980; Rembold, 1987; Hartfelder & Engels, 1998).

Secundariamente, o processo de diferenciação “casta-específico” está relacionado com a modulação do sistema endócrino. Desta forma, os hormônios morfogenéticos (hormônio juvenil e ecdisteróides) também participam da formação de castas morfológicamente distintas (Nijhout & Wheeler, 1982; de Wilde & Beetsma, 1982; Rembold, 1987; Rachinsky *et al.*, 1990; Schmidt Capella & Hartfelder, 1998; Hartfelder, 2000; Barchuk *et al.*, 2002). Os eventos ligados ao desenvolvimento das castas são harmoniosamente controlados ao longo do desenvolvimento pelos hormônios citados acima, neste processo está também incluído o hormônio protoracicotrópico (PTTH), secretado por neurônios situados no sistema nervoso central e que tem como alvo as glândulas protorácicas, localizadas no complexo retrocerebral (Rachinsky, 1994; Paulino-Simões *et al.*, 1997).

A alimentação com geléia real oferecida às rainhas é responsável por uma resposta neuroendócrina que estimula o aumento da atividade dos *Corpora Allata* (CA), e conseqüentemente a produção de HJ (Nijhout & Wheeler, 1982; Wheeler, 1986; Winston, 1987; Rachinsky & Hartfelder, 1990; Hartfelder & Engels, 1998). No começo do último estágio larval (5º estágio), ainda durante a fase de alimentação, os CA de operárias sintetizam uma quantidade consideravelmente menor de HJ do que os CA de rainhas (Rachinsky & Hartfelder, 1990).

Ainda não está claro como esta informação trófica é processada e transformada em resposta neuroendócrina. Um dos caminhos possíveis para este estímulo seria o nervo conectivo que liga o gânglio frontal a *pars intercerebralis* do cérebro da abelha. Os estímulos chegariam a esta parte do cérebro onde se localizam um par de neurônios positivos para PTTH (Paulino-Simões, *et al.*, 1997), este hormônio é capaz de modificar o funcionamento das glândulas endócrinas

localizadas no complexo retrocerebral. Assim, um estímulo específico (geléia real) seria capaz de induzir o desenvolvimento “casta-específico” (Boleli *et al.*, 1998).

Entre as castas, as diferenças morfológicas do sistema reprodutor podem ser observadas no ovário e espermateca. A espermateca é mais desenvolvida em rainhas e atrofiada ou reduzida em operárias (Snodgrass, 1956), diferença que já pode ser observada na fase de pupa de olho rosa (Silva, E. B. – comunicação pessoal). O número de ovariolos dos ovários de rainhas adultas é muito superior ao de operárias (Snodgrass, 1956; para revisão veja Engels & Hartfelder, 1999). A diferenciação casta-específica dos ovários ocorre durante o estágio larval e é controlada através da ação conjunta do HJ e ecdisteróides (Goewie & Beetsma, 1976; Cnaani *et al.*, 1997; Dedej *et al.*, 1998). O HJ influencia os processos de proliferação celular (Schmidt-Capella & Hartfelder, 1998, 2002) e de morte celular programada (Rembold, 1987; Kimura & Trumam, 1990; Rembold *et al.*, 1992; Schwartz *et al.*, 1993; Hartfelder & Engels, 1998; Hartfelder *et al.*, 2002; Reginato & Cruz-Landim, 2002), sendo os ecdisteróides responsáveis por um padrão casta-específico de síntese de algumas proteínas de baixo peso molecular e pelo desenvolvimento diferencial dos ovariolos (Hartfelder *et al.*, 1995). Nas rainhas, o elevado título de HJ, previne o processo de morte celular nos ovariolos e estimula a glândula protorácica, promovendo um aumento nos títulos de ecdisteróides (Rembold, 1987; Rachinsky *et al.*, 1990; Rembold *et al.*, 1992; Rachinsky & Engels, 1995). A decisão crítica para a diferenciação dos ovários ocorre rapidamente após a última muda larval, quando os ovários de operárias exibem sinais de morte celular, ao contrário do que ocorre com os ovários de rainha (Hartfelder & Steinbrück, 1997).

O processo de diferenciação dos ovários em *A. mellifera* culmina em rainhas adultas com ovários possuindo 150-180 ovariolos, enquanto operárias adultas possuem apenas 4-7 ovariolos por ovário (Snodgrass 1956).

1.2. Títulos de hormônio juvenil e ecdisteróides em *Apis mellifera*

Os ecdisteróides e sequeiterpenóides, os hormônios juvenis, são produzidos pela glândula protorácica e pelos CA, respectivamente (Hartfelder *et al.*, 1993; Rachinsky & Hartfelder, 1990). O HJ III é o único hormônio juvenil presente em *Apis mellifera* (Trautmann *et al.*, 1974; Huang *et al.*, 1991) e a makisterona A é o principal ecdisteróide presente na hemolinfa (Feldlaufer *et al.*, 1985; Rachinsky *et al.*, 1990), embora, 20-hidroxicdisona (20E) seja o principal ecdisteróide presente na maioria dos insetos (Robinson *et al.*, 1991).

Durante o desenvolvimento o HJ modula a ação da ecdisona, prevenindo a metamorfose no estágio larval (Riddiford, 1996; 1980). Em momentos críticos do desenvolvimento, sobretudo durante o processo de metamorfose, o HJ tem uma concentração próxima à basal, ou mesmo, algumas vezes não detectada na hemolinfa.

Dois picos de HJ são observados durante o estágio larval de *Apis mellifera*, sendo que existe uma diferença acentuada em ambos entre rainhas e operárias (FIGURA 1). O primeiro pico ocorre entre o segundo e o terceiro estágio, como observado por Beetsma (1979) e Rembold *et al.* (1992). O segundo pico de HJ ocorre no quinto estágio larval, no qual a diferença nos títulos deste hormônio é considerada casta específica (Rachinsky & Hartfelder, 1990; Rachinsky *et al.*, 1990; Hartfelder *et al.*, 1995; Rachinsky & Engels, 1995; Hartfelder & Engels, 1998), pois é nesta fase em que são estabelecidas as principais diferenças entre rainhas e operárias. Após a operculação das células de cria pelas operárias, os títulos de HJ em rainhas e operárias apresentam o mesmo perfil, sendo mais baixos nas operárias (Rachinsky & Hartfelder, 1990). Na fase adulta, os níveis de HJ na hemolinfa aumentam com a

idade das abelhas (Fluri *et al.*, 1982; Robinson, 1987; Robinson *et al.*, 1987, 1989; Huang *et al.*, 1991).

Os ecdisteróides apresentam dois picos, sendo que o primeiro pico ocorre no final do quinto estágio larval e o segundo, no estágio pupal, neste último o pico em rainhas é adiantado em relação ao das operárias (FIGURA 2). Durante o final do desenvolvimento pupal e os primeiros dias de vida após a emergência, os títulos de ecdisteróides diminuem e permanecem relativamente baixos nas duas castas (Feldlaufer *et al.*, 1985; Hartfelder *et al.*, 2002).

Figura 1- Título do hormônio juvenil ao longo do desenvolvimento de operárias, rainhas e zangões de *Apis mellifera* (modificado de Rembold, 1987; Rachinsky *et al.*, 1990). Estes dados foram organizados através de trabalhos empregando diferentes metodologias, assim, os valores devem ser considerados relativos.

Figura 2 - Título de ecdisteróides ao longo do desenvolvimento de operárias, rainhas e zangões de *Apis mellifera* (modificado de Rachinsky *et al.*, 1990, Feldlaufer *et al.*, 1985 e Pinto *et al.*, 2002). Estes dados foram organizados através de trabalhos empregando diferentes metodologias, assim, os valores devem ser considerados relativos.

1.3. O metabolismo do HJ: síntese e degradação

O hormônio juvenil funciona como importante fator regulador na embriogênese, no desenvolvimento larval e adulto, na metamorfose, reprodução, diapausa, migração, polimorfismo e metabolismo (Nijhout, 1994; Roe & Venkatesh, 1990; de Kort & Granger, 1996; Hammock, 1985).

A modulação dos níveis de hormônio juvenil é controlada precisamente por vários processos fisiológicos e bioquímicos, sendo eles: síntese, degradação, ligação a proteínas específicas na hemolinfa e secreção. Destes, a regulação da síntese tem sido considerada de extrema importância. Evidências têm apontado o controle estimulatório (alatotrópico) e inibitório (alatoestático) exercido pelo sistema nervoso sobre os CA (Gilbert *et al.*, 2000) como decisivos neste processo. A quantidade de HJ na hemolinfa está diretamente relacionada à sua produção pelos CA, uma vez que não são conhecidas informações sobre estocagem neste órgão. Existem evidências de que o número de células dos CA, em alguns insetos, aumenta em períodos de grande produção de HJ, inclusive em *Apis mellifera* (Snodgrass, 1984).

As diferenças na quantidade de HJ observadas entre operárias e rainhas podem ser devido a uma quantidade limitada do precursor do HJ, o metil farnesoato (MF) (Rachinsky & Hartfelder, 1990). Além disso, a regulação dos passos finais da produção do HJ, nas castas e estágios específicos, pode também contribuir para diferenças observadas nos títulos de HJ (Rachinsky *et al.*, 2000). Os dois passos finais na produção de HJ III, geralmente são: (1) a metilação do ácido farnesóico (AF) para MF catalisado pela enzima *o*-metil transferase do ácido farnesóico (FAMET) e (2) uma reação de epoxidação do MF para HJ III pela enzima metil farnesoato epoxidase (MFE) (Tobe & Stay, 1985).

A aplicação de ácido farnesóico (AF), precursor do HJ, em larvas de 4º estágio até L5S1 (larva de 5º estágio em fase inicial de tecelagem de casulo) de *Apis mellifera* causou um acúmulo de metil farnesoato (MF) nos CA, porém quando o AF é aplicado em L5S3 e PP1 ocorre acúmulo de HJ. Estes experimentos sugerem diferenças estágio-específicas na sensibilidade dos CA para a utilização de precursores do HJ. Isto pode envolver mudanças na atividade das enzimas que catalisam os dois passos finais da produção do HJ durante o desenvolvimento (Rachinsky *et al.*, 2000). Neste mesmo trabalho, os autores propõem que a atividade da FAMET deve ser consideravelmente maior na primeira metade do 5º estágio larval e menor no fim da fase de tecelagem do casulo. Enquanto que a MFE tem atividade limitada até o começo da fase de tecelagem do casulo e um aumento considerável no começo desta fase.

Os dados citados acima sugerem uma regulação na expressão das enzimas FAMET e MFE e que este controle deve ser essencial para a manutenção dos níveis de HJ. Rachinsky (1994) estimulou *in vitro* a produção de HJ pelos CA de larvas de *Apis mellifera* utilizando uma amina biogênica, a octopamina. Isto mostra que existe um controle da produção de HJ nos CA, exercido pelo sistema nervoso central.

Além da diminuição da síntese de hormônio juvenil, uma intensa atividade hidrolítica retira o hormônio juvenil de circulação em momentos críticos do desenvolvimento (Hinton & Hammock, 2001). Duas enzimas foram identificadas desempenhando o papel de degradação, a esterase do HJ (EHJ), membro da família das carboxiesterases (EC 3.1.1.1) e a epoxide hidrolase do HJ (EHHJ), membro da família das hidrolases (EC 3.3.2.3).

A EHJ está presente na hemolinfa e nos tecidos; a EHHJ está ligada a tecidos específicos e primariamente associada à fração microssomal (de Kort &

Granger, 1996). O catabolismo destas duas enzimas produz três metabólitos: HJ-ácido – pela EHJ; HJ-diol – pela EHHJ e HJ-ácido-diol, por ambas; formas que foram consideradas inativas por Hammock (1985), entretanto este cenário está sendo modificado atualmente, mostrando que o HJ-ácido possui atividade metabólica (Ismail *et al.*, 1998).

A maioria do conhecimento gerado sobre a degradação do HJ tem se concentrado nos mecanismos de ação da EHJ. Pouco se conhece sobre a EHHJ, contudo, esta segunda enzima parece desempenhar algum papel durante o desenvolvimento (Debernard *et al.*, 1998). Lassiter *et al.* (1995) descreveram um papel importante da EHHJ em detrimento a EHJ em *Culex quinquefasciatus*. Enquanto, em *Drosophila melanogaster*, ambas parecem ser importantes (Campbell *et al.*, 1992). Em muitos estágios larvais de *Manduca sexta*, a formação de HJ-diol é a maior rota do metabolismo do HJ (Halarnkar, *et al.*, 1993).

A ação das enzimas EHJ e EHHJ é influenciada por proteínas que se ligam ao hormônio juvenil que estão associadas, teoricamente, a todo o HJ *in vivo* (Touhara & Prestwich, 1994). Em insetos foram descritos três tipos de proteínas de ligação ao hormônio juvenil. A primeira identificada em *M. sexta* foi denominada JHBP (*Juvenile hormone binding protein*) por Kramer *et al.* (1976). A segunda, uma lipoforina, encontrada na hemolinfa de *Leptinotarsa decemlineata*, *Periplaneta americana* e *Locusta migratória* foi identificada posteriormente (de Kort & Koopmanschap, 1986, 1987, 1989). A alta concentração desta proteína na hemolinfa, disponibiliza muitos sítios de ligação para o HJ (Gilbert *et al.*, 2000). A terceira classe dentre as proteínas de ligação ao HJ é uma proteína hexamérica encontrada em *L. migratoria* identificada por Koopmanschap & de Kort (1988). A presença de proteínas específicas que se ligam ao HJ oferece vantagens, sugere que estas possam

prevenir uma ação inespecífica do HJ ao mesmo tempo em que permitem uma circulação uniforme do hormônio pelo corpo do inseto (Gilbert *et al.*, 2000).

1.4. Esterases gerais e específicas do Hormônio Juvenil

Sanburg *et al.* (1975 a, b) classificaram as carboxilesterases de *Trichoplusia ni*, através de inibidores, em dois grupos: esterases gerais e esterases específicas do hormônio juvenil. As esterases gerais são rapidamente inativadas por diisopropil fosfofluoridato (DFP), estão presentes durante todo o desenvolvimento dos insetos e são capazes de hidrolisar o hormônio juvenil livre. As esterases específicas do hormônio juvenil são fracamente inativadas por DFP e têm sido detectadas na hemolinfa especialmente durante o último instar larval.

Em *Apis mellifera* foram detectadas sete isoformas de carboxiesterases, que são expressas em fases específicas do desenvolvimento (Figueiredo *et al.*, 1996a). O aparecimento e persistência da atividade destas esterases durante o desenvolvimento pode indicar a participação em processos fisiológicos específicos. Entre elas merecem atenção especial as esterases 2A, 5 e 6. A Esterase 2A é detectada a partir da fase de L5F1, quando há uma queda abrupta nos níveis de HJ. A esterase 5 é detectada a partir da fase de L5S3 e permanece ativa durante toda a fase pupal, quando o HJ é mantido em concentrações basais. A esterase 6 possui expressão durante os estágios de L1 a L5S2 e retornando no estágio de pupa de olho rosa escuro. Além disso, quando foram usados inibidores específicos para esterases, as larvas e pupas retomaram o desenvolvimento apenas quando as esterases 2A e 5 recuperaram a atividade, 4 horas após tratamento (Figueiredo *et al.*, 1996b). Estas esterases são candidatas a serem a esterase específica de degradação do HJ em *Apis mellifera*. A FIGURA 3 mostra um esquema da atividade das sete isoformas de esterases em *Apis mellifera*.

Na maioria dos lepidópteros estudados, a EHJ é sintetizada pelo corpo gorduroso e liberada para a hemolinfa, onde hidrolisa o HJ (Weirich *et al.*, 1973). Os altos níveis de HJ durante estágios específicos do desenvolvimento parecem ativar a expressão de EHJ no corpo gorduroso. No entanto, a EHJ mesmo em pequena quantidade é suficiente para hidrolisar o HJ presente na hemolinfa, devido a sua alta especificidade, ao contrário do que ocorre com os substratos artificiais (Ward *et al.*, 1992; Touhara *et al.*, 1995).

Uma forma de controle da expressão de EHJ foi recentemente acrescentada à acima descrita, Hirai *et al.* (2002) comprovaram experimentalmente que os altos níveis de 20E são capazes de ativar a síntese do mRNA para EHJ no corpo gorduroso. Entretanto, vários autores descreveram a inibição do gene da EHJ pelo tratamento com 20E e o aumento da expressão do gene pela presença de HJ exógeno (Wroblewski *et al.*, 1990; Feng *et al.*, 1999; Shiotsuki *et al.*, 1999; Kithidi, *et al.*, 2004).

Devido a sua grande importância na regulação dos níveis de HJ, a EHJ tem sido estudada em muitos insetos. A proteína foi isolada e estudada, seu peso molecular, ponto isoelétrico e estrutura quaternária variam entre as espécies (Tabela I). Existem sete seqüências de cDNA descritas para a EHJ em insetos, são elas: *Drosophila melanogaster* (Campbell *et al.*, 2001), *Heliothis virescens* (Hanzlik *et al.*, 1989), *Trichoplusia ni* (Jones, *et al.*, 1994), *Tenebrio molitor* (Thomas *et al.*, 2000), *Bombyx mori* (Shiotsuki *et al.*, 2000), *Chironomus fumiferana* (Feng *et al.*, 1999) e *Manduca sexta* (Hinton & Hammock, 2001) (TABELA III).

FASES	ISOFORMAS						
	1	2	2A	3	4	5	6
<i>L1</i>							
<i>L2</i>							
<i>L3</i>							
<i>L4</i>							
<i>L5F1</i>							
<i>L5F2</i>							
<i>L5F3</i>							
<i>L5S1</i>							
<i>L5S2</i>							
<i>L5S3</i>							
<i>PP1</i>							
<i>PP2</i>							
<i>PP3</i>							
<i>Pw</i>							
<i>Pp</i>							
<i>Pdp</i>							
<i>Pb</i>							
<i>Pbl</i>							
<i>Pbm</i>							
<i>Pbd</i>							
<i>RE</i>							

Figura 3 – Esquema ilustrativo mostrando a atividade das sete isoformas de carboxiesterases detectadas em operárias de *Apis mellifera* durante o desenvolvimento ontogenético (modificado de Figueiredo, 1996a). Fases: L1-L4 (larva do primeiro ao quarto estágio), L5F (larva no quinto estágio, em fase de alimentação), L5S (larva de quinto estágio, em fase de tecelagem de casulo), PP (pré-pupa), Pw (pupa de olho branco), Pp (pupa de olho rosa), Pdp (pupa de olho rosa escuro), Pb (pupa de olho marrom), Pbl (pupa de olho marrom, com o corpo pigmentado levemente), Pbm (pupa de olho marrom, com o corpo medianamente pigmentado), Pbd (pupa de olho marrom com corpo fortemente pigmentado), RE (operária recém emergida). As subdivisões dos estágios L5F, L5S e PP estão classificadas segundo Michelette & Soares (1993) (TABELA I).

Tabela I – Comparação entre a estrutura molecular das EHJs descritas em insetos. Abreviações: PM, peso molecular em KDa; pI, ponto isoelétrico.

Espécie	PM nativo	Estrutura quaternária	pI	Referência
Orthoptera				
<i>Gryllus assimilis</i>	98	dímero	4.7-4.	Zera <i>et al.</i> (2002)
<i>Gryllus rubens</i>	188	-	5.1, 4.2	Zera <i>et al.</i> (1992)
Coleoptera				
<i>decemlineata</i>	120	dímero	5.5-5.	Vermunt <i>et al.</i> (1997)
<i>Tenebrio molitor</i>	71/150 ^a	dímero/mono	4.9-6. 6 7	Thomas <i>et al.</i> (2000)
Diptera				
<i>Drosophila melanogaster</i>	54	monômero	5.4	Campbell <i>et al.</i> (1998)
Lepidoptera				
<i>Heliothis virescens</i>	61	monômero	4.8	Hanzlik <i>et al.</i> (1989)
<i>Tricoplusia ni</i>	64	monômero	5.3, 5.5	Hanzlik & Hammock (1987)
<i>Manduca sexta</i>	62-68	monômero	5.5, 6.1	Coudron <i>et al.</i> (1981) Venkatesh <i>et al.</i> (1990) Abdel-Aal & Hammock (1995)
<i>Lymantria dispar</i> Putativa EHJ	62 ^b	monômero	-	Valaitis (1991; 1992)
<i>Lymantria dispar</i> Putativa EHJ	50 ^b	-	5.1-5. 3	Nussbaumer <i>et al.</i> (2000)
<i>Galleria mellonella</i>	60	-	5.0, 4.8	Rudnicka & Kochman (1984) McCaleb <i>et al.</i> (1980)
Blattaria				
<i>Leucophaea maderae</i>	47	-	-	Gunawan & Engelmann (1984)

(a) Ainda não é certo se a enzima de 150 KDa é um dímero ou monômero (Thomas *et al.*, 2000).

(b) A massa molecular e a sequência de aminoácidos indicam que as duas enzimas são distintas (Nussbaumer *et al.*, 2000).

2. OBJETIVOS

Estudos recentes demonstraram a importância da esterase do hormônio juvenil para o entendimento do desenvolvimento dos insetos, principalmente devido à sua ação sobre o hormônio juvenil, cuja modulação é dependente de processos que incluem síntese e degradação. Em abelhas, o hormônio juvenil desempenha inúmeras funções e é considerado de fundamental importância para o desenvolvimento das castas.

Assim pretendeu-se:

1. Clonar e seqüenciar o cDNA da EHJ de *Apis mellifera*;
2. Caracterizar o gene da EHJ;
3. Identificar o RNA mensageiro da EHJ;
4. Determinar a expressão do gene da EHJ durante o desenvolvimento pós-embrionário de operárias;
5. Estudar a expressão do gene da EHJ em larvas das castas e sexos;
6. Analisar a expressão deste gene durante o desenvolvimento no estágio larval dos ovários de operárias e rainhas;
7. Analisar a expressão do gene em diferentes tecidos e órgãos;
8. Estudar a regulação da expressão do gene da EHJ através do tratamento com PPN (análogo do HJ) e 20E (20-hidroxiecdisona) em diferentes fases do desenvolvimento pós-embrionário de operárias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

O estudo foi realizado utilizando-se abelhas africanizadas *Apis mellifera* do apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. As fases do desenvolvimento de operárias e rainhas foram identificadas segundo Michelette & Soares (1993) e Rembold *et al.* (1980) respectivamente. As características usadas para identificar operárias estão resumidas na TABELA II. As fases larvais de zangões foram identificadas segundo Tozetto (1997).

As rainhas utilizadas neste trabalho foram obtidas através de produção artificial. Este procedimento é feito transferindo-se larvas de operárias de primeiro estágio larval para “realeiras” artificiais aprovisionadas com geléia real e colocadas em suportes especiais dentro de colônias do tipo recria, para seu desenvolvimento até o estágio desejado.

TABELA II – Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval e pupal de operárias de abelhas africanizadas *Apis mellifera*. A duração dos estágios larvais durante o desenvolvimento preimaginal refere-se às horas após eclosão (modificado de Michelette & Soares, 1993).

FASE	CARACTERIZAÇÃO	DURAÇÃO (horas)
L1	peso – 0,0001 a 0,0003 g	0-20
L2	peso – 0,0003 a 0,001 g	20-35
L3	peso – 0,0015 a 0,004 g	35-55
L4	peso – 0,004 a 0,0248 g	55-80
L5F1	peso – 0,029 a 0,06 g	80-95
L5F2	peso – 0,06 a 0,11 g	95-105
L5F3	peso – 0,11 a 0,16 g	105-115
L5S1	célula operculada, larva com intestino cheio	115-130
L5S2	célula operculada, larva com intestino semi cheio	
L5S3	célula operculada, larva com intestino vazio	130-145
PP1	comprimento tibia-tarso = 1,4 a 1,99 mm	145-160
PP2	comprimento tibia-tarso = 2,0 a 2,6 mm	160-180
PP3	comprimento tibia-tarso > 2,6 mm	180-190
Pw	pupa de olho branco (white)	190-230
Pp	pupa de olho rosa (pink)	230-250
Pdp	pupa de olho rosa-escuro	250-265
Pb	pupa de olho marrom (brown)	265-305
Pbl	pupa de olho marrom, com pigmentação leve no tórax	305-330
Pbm	pupa de olho marrom, com pigmentação torácica intermediária	330-370
Pbd	pupa de olho marrom com pigmentação torácica forte	370-390
Pha	semelhante ao adulto, mas com as asas ainda brancas e com pouco movimento (adulto farato)	

3.2. Dissecção do material biológico

Para a coleta dos ovários foram usadas rainhas e operárias com idades controladas, para isto, a rainha fica retida por 6 horas, dentro de uma tela de exclusão, em um quadro adequado para postura. Este procedimento possibilita a obtenção de indivíduos da mesma idade aproximadamente.

Para obtenção dos ovários, larvas de rainhas e operárias em diferentes estágios (L4, L5F1, L5S2 e PP3) foram dissecadas em solução salina 0,9% estéril. Estas foram presas com alfinetes a uma placa de vidro contendo parafina, com o dorso para cima e mergulhadas em solução salina. As larvas foram abertas em toda a extensão antero-posterior e os ovários foram coletados, lavados exaustivamente em salina, colocados em reagente TRIzol® (Invitrogen) e congelados em freezer (-80°C) até o momento da extração de RNA. Para cada amostra foram coletados de 20 a 40 ovários, dependendo da fase e casta.

Para as coletas de RNA do epitélio do intestino, túbulos de Malpighi, cabeça, ovário e corpo gorduroso foram utilizadas larvas de estágio L5S3, portanto, no fim do processo de defecação. Foi adotado o mesmo procedimento de dissecção feito para a extração dos ovários. A cabeça e o corpo gorduroso foram coletados e colocados diretamente em reagente TRIzol®. Os demais órgãos foram identificados, coletados e lavados exaustivamente em salina para evitar contaminação com corpo gorduroso e com o conteúdo intestinal residual.

3.3. Extração do RNA total e síntese do cDNA

A obtenção do RNA total foi feita através do uso de 1 ml do reagente TRIzol® (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento de RNA total, Invitrogen), para cada amostra. O protocolo de extração utilizado foi o recomendado pelo fabricante. Para tecidos contendo excesso de gordura (larvas de 5º estágio, pré-pupas e corpo gorduroso) foi feita uma lavagem extra com clorofórmio, segundo sugestão do fabricante. O RNA obtido foi ressuspenso em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% para evitar degradação. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro (Cecil 300) em comprimento de onda igual a 260 nm. Cada unidade de absorbância foi considerada como 40 µg/ml de RNA. As amostras foram estocadas em freezer – 80°C.

Anteriormente à síntese do cDNA (DNA complementar ao RNA mensageiro), o RNA foi tratado com DNase (*RQ1 Rnase-Free Dnase*, Promega) por 1 hora a 37°C e em seguida a 65°C por 15 minutos, para a inativação da enzima. A síntese de cDNA foi feita a partir de 1µg (para as amostras de ovários, túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, epitélio do intestino e cabeça) e 5µg (para as amostras de corpo inteiro) de RNA total. Para este procedimento foi utilizado o sistema de síntese que utiliza Superscript II (Invitrogen) e *Oligo (dT)₁₂₋₁₈* (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. Por este método, apenas a primeira fita do cDNA é sintetizada através de transcrição reversa. A segunda fita é gerada por PCR com o uso de *primers* específicos.

3.4. Obtenção de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico foram utilizadas pupas de operárias sem pigmentação (Pw), as quais eram maceradas com auxílio de almofariz e pistilo, após congelamento em nitrogênio líquido. A suspensão foi transferida rapidamente para tubos estéreis e incubada sob agitação branda, em presença de 10ml de tampão de extração autoclavado (Tris-HCl 200mM, NaCl 250mM, EDTA 25mM, SDS 0,5% em água destilada, pH 8,5). A extração do DNA foi feita adicionando-se 1 volume de fenol/clorofórmio e centrifugando-se o macerado por 10 min a 12.000 rpm. O DNA foi recuperado do sobrenadante mediante precipitação com acetato de sódio 0,3M (pH 5,2) e 2,5 volumes de etanol absoluto. O DNA obtido foi ressuspendido em água estéril e estocado a 4°C. Sua concentração final foi estimada por absorvância óptica em espectrofotômetro, a 260 nm.

3.5. Isolamento do gene da EHJ de *Apis mellifera* (*AmEHJ*) por *ORESTES* (*Projeto Piloto Electrapis*)

A sequência da EHJ foi localizada nos clones do Projeto Piloto: Electrapis¹. Neste projeto foram seqüenciados mais de 5.000 clones, dos quais 26 correspondiam a fragmentos homólogos ao gene da EHJ de outros insetos. Os resultados deste projeto foram submetidos à publicação e as seqüências já foram depositadas em banco de dados (GenBank).

As seqüências obtidas naquele projeto correspondem ao cDNA de larvas, pupas e adultos de *A. mellifera*, segundo metodologia *ORESTES* (Open-Reading-

Frame-Expressed-Sequence-Tags). Nesta metodologia são usados primers aleatórios em experimentos de RT-PCR, que amplificam preferencialmente a região central dos genes (Dias Neto *et al.*, 2000). Após clonagem e seqüenciamento, as seqüências foram analisadas usando programa de busca NCBI-BLAST (Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine), para identificação de seqüências de interesse.

As 26 seqüências localizadas que apresentavam homologia com a EHJ de insetos foram alinhadas pelo programa ClustalW. A região consenso entre estas seqüências foi utilizada como molde para que fossem construídos *primers* específicos para a amplificação de um fragmento de 502 nucleotídeos, referente ao cDNA da EHJ de *A. mellifera*, afim de realizar experimentos de RT-PCR semiquantitativa. As seqüências dos *primers* desenhados são: EHJP1 (5'-GCTTTTCAATTAGGTAGTGG-3' - *sense*) e EHJP2 (5'-GAATGGATTATAATAGAATCG-3' - *antisense*). Os *primers* foram usados em PCR com cDNA e DNA genômico, respectivamente, para verificar a presença e a posição de íntrons. Os fragmentos obtidos foram clonados em plasmídeo e seqüenciados para confirmação do gene amplificado.

3.6. Análise da sequência da EHJ de *Apis mellifera*

Através do programa de busca NCBI-BLAST (Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine) foi encontrada a sequência completa de cDNA de uma esterase de *Apis mellifera* depositada no GenBank que possui 100% de homologia com a sequência obtida neste trabalho descrita por Kamikouchi *et al.* (2004) (número de acesso: proteína BAC 541301 e cDNA – AB 083009).

Para as análises comparativas entre as EHJ de outros insetos em relação à sequência de *Apis mellifera* foi utilizada a sequência protéica descrita por Kamikouchi *et al.* (2004). A sequência deduzida de aminoácidos foi alinhada com as sequências das EHJ de outros insetos (Tabela III), usando-se os programas ClustalW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>), para análise de homologia e MEME/MAST (<http://meme.sdsc.edu/meme/website/intro.html>), para busca de domínios conservados. As análises de filogenia molecular foram conduzidas usando-se o programa Mega versão 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) e metodologia Neighbor Joining, a significância foi avaliada por 1.000 repetições e a proteína acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (número de acesso: NM 172009) foi usada como grupo externo.

Tabela III – Identificação das seqüências proteicas das EHJs de insetos já descritas e utilizadas neste trabalho para comparação com a EHJ de *Apis mellifera*. Nº- número de acesso em banco de dados (GenBank). mRNA (RNA mensageiro), peso molecular em Kb.

Espécie	Nº proteína	Grupo Taxonômico	mRNA (Kb)	Referência
<i>Manduca sexta</i>	AAG 42021	Lepidoptera	2,2	Hinton & Hammock, 2001
<i>Bombyx mori</i>	AAL 55240	Lepidoptera	3,3	Shiotsuki <i>et al.</i> , 2000
<i>Drosophila</i>	AAK 07833	Diptera	1,8	Campbell <i>et al.</i> , 2001
<i>Heliothis virescens</i>	AAC 38822	Lepidoptera	2,9	Hanzlik <i>et al.</i> , 1989
<i>Tenebrio molitor</i>	AF 448479	Coleoptera	1,8	Thomas <i>et al.</i> , 2000
<i>Christoneura</i>	AAD 34172	Lepidoptera	2,7	Feng <i>et al.</i> , 1999
<i>Trichoplusia ni</i>	S 55233	Lepidoptera	2,0	Jones <i>et al.</i> , 1994
EHJ - related protein				

Observação: A seqüência putativa da EHJ de *Leptinotarsa decemlineata*, Coleoptera (número de acesso: AF 039135), descrita por Vermunt *et al.* (1997), não foi utilizada nas análises, pois, esta não foi identificada como uma esterase pelo programa de busca NCBI-BLAST (Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine).

3.7. Obtenção da sequência gênica completa da EHJ

Para a obtenção da sequência completa do gene da EHJ de *Apis mellifera*, o cDNA obtido por Kamikouchi *et al.* (2004), foi submetido à comparação com os *contigs* disponibilizados pelo sequenciamento do genoma de *Apis mellifera* (Human Genome Sequencing Center at Baylor College of Medicine - <http://hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee>) pelo programa de busca NCBI-BLAST. Como resultado, foram localizados dois *contigs*: (gi|41612941|gb|AADG02001718.1| *Apis mellifera* strain DH4 Amel_1.1_Contig1718) e (gi|41612942|gb|AADG02001717.1| *Apis mellifera* strain DH4 Amel_1.1_Contig1717). A sequência do primeiro *contig* alinhou com um trecho da região 5' do cDNA, e o segundo com um trecho da região 3'. O alinhamento entre o cDNA e os *contigs* resultou em um *gap* na região central do gene.

Para o sequenciamento desta região (*gap*) foram desenhados dois *primers*: EHJP3 (5'-CAAGTGACGTTGTAAAGATAAG-3' - *sense*) e EHJP4 (5'-ATGTTGAAGTTGCTAGACTC-3' - *antisense*). O trecho foi amplificado por PCR nas seguintes condições:

94 °C - 2 minutos

94°C – 45 segundos

54°C – 45 segundos

72°C – 1 minuto

72°C – 7 minutos.

40 ciclos

Após sequenciamento, o trecho do *gap* obtido foi alinhado com os dois *contigs* pelo programa ClustalW para a identificação da sequência completa do gene. A sequência do AmEHJ foi alinhada com a sequência de cDNA descrita por Kamikouchi *et al.* (2004) para determinação dos íntrons e exons, pelo mesmo programa. A sequência de nucleotídeos do AmEHJ foi submetida ao programa de análise GenScan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN>) para a predição das sequências de cDNA e de aminoácidos. Os exons foram traduzidos pelo programa JustBio (<http://www.justbio.com/cgi-bin/translator>). As sequências fornecidas pelos programas foram comparadas às obtidas por Kamikouchi *et al.* (2004).

3.8. Reação em cadeia da polimerase e eletroforese

As amplificações por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram feitas utilizando-se a solução Eppendorf MasterMix (2,5X) (Eppendorf), em termociclador PTC-100 (*Programmable Thermal Controller Peltier-Effect Cycling*, MJ Research). As condições de PCR foram específicas para cada par de *primers*, como descrito em itens posteriores. No entanto, em todos os casos foi utilizada a mesma mistura de reação:

12µl água destilada estéril
10µl de *Master Mix* (2,5X; Eppendorf)
1µl de *forward primer* (10µM)
1µl de *reverse primer* (10µM)
1µl de cDNA ou DNA genômico

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão 1x TBE (89mM Tris base, 89mM ácido bórico, 2mM EDTA, pH 8,0) e corado com uma solução de EtBR (0,5µg/ml de gel).

3.9. Preparo das células quimiocompetentes

Escherichia coli da linhagem DH5α foi utilizada como hospedeira para os plasmídeos nos experimentos de subclonagem. Para o preparo das células de *E. coli*, 5 ml de meio LB foram inoculados com células de um estoque (-80°C) e incubados por 12 horas a 37°C e agitação de 250 rpm. A seguir, 50 µl deste cultivo foram utilizados para inocular 50 ml de LB e incubados a 37°C e 210 rpm, sendo realizadas leituras periódicas em espectrofotômetro a 550 nm até que fosse obtida uma densidade óptica de 0,5. O cultivo foi transferido para tubos Corex e centrifugado a 6.000 rpm por 5 minutos (4°C), o *pellet* foi ressuscitado com o auxílio de uma pipeta Pasteur em 5 ml de solução CaCl₂ 0,1M e incubado em gelo por 25 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada a 6.000 rpm por 5 minutos (4°C) e em seguida o *pellet* foi ressuscitado em 5 ml de CaCl₂ 0,1M com 15% de glicerol. Esta solução contendo as células foi aliquoteada em tubos de crioproteção, congelada rapidamente em nitrogênio líquido e estocada em freezer -80°C até o momento da transformação.

3.10. Clonagem e sequenciamento

Os fragmentos amplificados, com peso molecular esperado, foram recortados do gel, purificados com o uso de colunas de extração (QIAquick Spin - QIAGEN) e ligados em plasmídeos (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen). Os plasmídeos foram usados para transformar quimicamente células competentes de *Escherichia coli* DH5α. Após transformação, as células foram plaqueadas em meio LB-ágar (1,5%), contendo Ampicilina (USB; 100 µg/ml), X-Gal (5-Bromo-chloro-3 indolyl-B-D-Galactoside – USB; 4 µg/ml) e IPTG (isopropylthio-B-D-galactoside – Invitrogen; 4 µg/ml) e em seguida, incubadas em estufa a 37°C por 12-16 horas. As colônias de bactérias, contendo os clones positivos, foram inoculadas em meio LB líquido com ampicilina (40 mg/ml) em tubos *Falcon* e incubadas em estufa a 37°C e 150 rpm por 12 horas. Os plasmídeos destas células foram extraídos (QIAprep Miniprep – QIAGEN); e em seguida digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* por 2 horas a 37°C em banho-maria. O produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, para verificação do tamanho do inserto. Após verificação, os plasmídeos foram utilizados para sequenciamento pelo método de Sanger, usando-se um seqüenciador ABI PRISM 310, após reação com DNA Sequencing Kit, BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction – ABI PRISM (Applied Biosystems) e *primers* universais: M13F (5'-CGACGTTGTAAAACGGCCAGT-3' - *sense*) e M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' - *antisense*).

3.11. Análise da expressão do AmEHJ por RT-PCR

A realização dos experimentos de RT-PCR semiquantitativa requer a determinação do número de ciclos de amplificação que corresponda a um aumento linear na quantidade de produto. A fim de determinar o ponto de saturação da PCR para os primers EHJP1 e EHJP2, estes foram testados em número crescente de ciclos (15, 20, 25, 28, 31, 34, 37, 40 e 43) para a escolha da melhor condição a ser utilizada neste experimento.

Com base no ponto de saturação da PCR, a análise de expressão do AmEHJ foi feita utilizando-se dois protocolos de amplificação. No primeiro, foram usados 25 ciclos, sendo necessário o uso subsequente da técnica de Southern Blot para visualização dos fragmentos amplificados em cada amostra. E no segundo, foram usados 35 ciclos, sendo que os resultados puderam ser observados diretamente no gel de agarose, corado com EtBr.

Para a análise de expressão do AmEHJ foram utilizados perfis de cDNA em experimentos de RT-PCR semiquantitativo, utilizando-se os *primers* específicos EHJP1 e EHJP2, nas seguintes condições da PCR:

94 °C - 2 minutos	
94°C – 30 segundos	25 ciclos (Southern Blot) ou 35 (visualização no gel)
52°C – 45 segundos	
72°C – 1 minuto	
72°C – 7 minutos.	

Para a normalização foi utilizado o gene da actina, cuja expressão é constitutiva (número de acesso: AB023025). Para isto, foram desenhados *primers* que flanqueiam um trecho de aproximadamente 150 nucleotídeos: ACTF (5'-TGCCAACACTGTCCTTTCTG-3' - *sense*) e ACTR (5'-AGAATTGACCCACCAATCCA-3' - *antisense*). A padronização do número de ciclos foi determinada previamente em nosso laboratório. As condições de PCR foram as seguintes:

94 °C - 2 minutos	
94°C – 30 segundos	25 ciclos
62°C – 45 segundos	
72°C – 1 minuto	
72°C – 7 minutos	

3.12. Análise por Northern e Southern Blot

Para a realização dos experimentos de Northern e Southern Blot, foi utilizado como sonda o trecho de 502 nucleotídeos, amplificado pelos *primers* EHJP1 e EHJP2 de *A. mellifera*. Após a digestão do clone com enzima *EcoRI* e eletroforese, o fragmento foi extraído do gel e marcado com o uso do reagente *Gene Images random prime labelling module* (Amersham-pharmacia), seguindo instruções do fabricante. Este sistema utiliza uma mistura de nucleotídeos (incluindo fluoresceína-11-dUTP), uma solução de *primers*, a enzima Klenow (5 unidades/ μ l) para uma reação de 1 hora a 37 °C. Após a marcação foram adicionados 2 μ l de EDTA 0,5 M em 50 μ l de solução. Aliquotas protegidas da luz foram armazenadas a -20 °C. Para construção desta sonda fluorescente foram usados de 500 a 1.000 η g de DNA, o que resultou em uma sonda com concentração final entre 20-32 η g/ μ l.

Para detecção do mRNA da EHJ foram utilizados 60 μ g de RNA total de operárias (L4 e Pw) e rainhas (L5S1, L5S3 e PP1). O RNA total foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2 %, em condições desnaturantes [1,2% agarose, 0,8 ml de formaldeído 37%, 4 ml de tampão 10x MOPS (10,46g MOPS; 1,025g citrato de sódio; 5 ml EDTA 0,5M; H₂O-DEPC para 500 ml; pH 7,0.) e H₂O tratada com DEPC (0,1%) para um volume final de 40 ml]. Após eletroforese, o gel foi corado em solução contendo EtBr por 10 minutos, visualizado em luz ultravioleta e fotografado para verificação da integridade do RNA. Em seguida o gel foi lavado em água deionizada (15 minutos) e em solução SSC 20% (2 lavagens de 15 minutos) para retirar o excesso de EtBr. O conteúdo do gel foi transferido por capilaridade

para membrana de nylon (durante 12 – 16 horas). Após a transferência o RNA foi fixado sob luz ultravioleta por 4 minutos.

Para a transferência do gel para Southern Blot, após eletroforese, o gel foi lavado em duas etapas: uma desnaturação por 30 minutos (87,66g NaCl; 20g NaOH; água para 1000 ml) e uma neutralização por 25 minutos (87,66g NaCl; 60,5g Tris; água para 1000 ml; pH 7,5). O procedimento de transferência e fixação da membrana foi o mesmo feito para RNA.

A membrana foi pré-hibridada a 60°C para Northern e 65°C para Southern Blot, em garrafas contendo solução (5x SSC; 0,1% dextran sulfato e líquido bloqueador 20 vezes diluído, fornecido pelo fabricante), por 2-4 horas. Em seguida, a sonda luminescente foi desnaturada por 5 minutos, adicionada a solução que foi incubada na mesma temperatura, por aproximadamente, 16 horas. Após este processo, a membrana foi lavada em solução (1x SSC; 0,1% SDS) a 60 ou 65°C por 15 minutos, e mais 15 minutos a 60 ou 65°C em solução (0,1% SSC; 0,1% SDS).

Subseqüentemente, a membrana foi incubada em temperatura ambiente (TA) durante 1h em solução bloqueadora (*Gene Images CDP-Star detection module*, Amersham-Pharmacia) que continha 45ml de “tampão A” estéril (6,05g de Tris e 8,76g de NaCl em 500ml de água destilada - pH 9,5) e 5ml de solução bloqueadora. A membrana era incubada em TA e agitação branda durante 1h em solução de anticorpo (0,125g de albumina bovina, 25ml de “tampão A” e 5µl de anti-fluoresceína conjugada com fosfatase alcalina, FA). Logo após, a membrana era lavada 3x10min em excesso de “tampão A” com 0,3% de Tween 20 (para eliminar ligações inespecíficas).

Para detecção do sinal, a membrana sem excesso de reagente, era submetida durante 3 minutos a uma solução de detecção (com dioxetano como substrato da FA,

que ao ser decomposto emite luz visível) e em seguida era colocada em contato com um filme (*BioMax*, *X-Omat AR*, Sigma) por 4 horas (Northern) ou 10 minutos (Southern) em TA até o momento da revelação.

3.13. Tratamento de larvas e pupas de operárias com PPN e 20E

Larvas de terceiro estágio (L3), larvas de quinto estágio em fase de tecelagem do casulo (L5S2) e pupas de olho marrom (Pb) de operárias foram tratadas topicamente com Pyriproxyfen (PPN) - análogo do hormônio juvenil (Sumitomo, Japão; 1mg/ml em acetona) ou injetadas com 20-hidroxiecdisona (20E) (Sigma), diluído para 1mg/ml em etanol).

As larvas L3 foram divididas em três grupos: (1) grupo não tratado; (2) grupo tratado com 1 µl acetona e (3) grupo tratado com 1 µl da solução de PPN. Após a aplicação de PPN, as células de cria foram mantidas a 34°C por 1 hora para a evaporação do solvente e em seguida foram devolvidas às próprias colônias para que se desenvolvessem até o momento da coleta das amostras. As amostras foram coletadas 48 e 72 horas após o tratamento.

As larvas L5S2 foram divididas em 4 grupos diferentes: (1) larvas tratadas topicamente com 1µl de acetona, (2) larvas tratadas topicamente com 1µl da solução de PPN, (3) larvas injetadas com 1µl de etanol e (4) larvas injetadas com 1µl da solução de 20E. Após tratamento, as larvas foram mantidas em estufa a 34 °C e 80% de umidade e observadas para verificação de vazamento de hemolinfa em larvas injetadas, neste caso as mesmas eram descartadas. O estágio larval de L5S2 foi escolhido devido ao fato de que estas larvas já terminaram o período de alimentação

e, portanto, podem permanecer na estufa. Este procedimento assegura que as larvas desenvolvam até a idade estabelecida para coleta das amostras, livres do policiamento das operárias da colônia. As larvas L5S2 foram coletadas 24 e 48 horas após o tratamento.

As pupas foram divididas em 5 grupos diferentes: (1) grupo controle, sem tratamento; (2) grupo controle, tratado topicamente com acetona; (3) grupo tratado topicamente com 1µl da solução de PPN; (4) controle injetado com 1µl de etanol e (5) injetado com 1µl da solução de 20E. As pupas foram mantidas em estufa e coletadas 24, 48 e 72 horas após tratamento.

As larvas e pupas coletadas foram colocadas diretamente em reagente TRIzol®, maceradas e congeladas em freezer (-80°C). Após a extração de RNA total, estas amostras foram utilizadas para a síntese de cDNA, que foi utilizado para estudos de expressão por RT-PCR semiquantitativa. Apenas para o experimento de tratamento com hormônios em pupas, após RT-PCR, foi feito Southern Blot.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação do AmEHJ

Os *primers* EHJP1 e EHJP2 amplificaram um trecho de 502 pares de bases do cDNA da EHJ de *Apis mellifera*, este trecho foi depositado no GenBank (número de acesso: cDNA, AY 526235; proteína, [AAS 20468](#)).

Para identificação da sequência gênica completa da EHJ de *Apis mellifera* foram usados os primers EHJP3 e EHJP4, que em experimentos de PCR amplificaram um trecho de DNA de 1,3Kb, este foi subclonado e sequenciado. O alinhamento desta sequência com os dois *contigs*, disponibilizados pelo Baylor College of Medicine, como parte dos resultados do Projeto HBGS, geraram uma sequência de 2805 nucleotídeos, que analisada indicou homologia com EHJ de outros insetos, e está sendo depositada em banco de dados.

Esta sequência foi submetida ao programa GenScan, que forneceu as sequências possíveis de aminoácidos e cDNA que foram comparadas com as sequências depositadas por Kamikouchi *et al.* (2004).

O AmEHJ possui 2666 nucleotídeos, desde o início da transcrição até a cauda poli-A⁺, mais um trecho de 139 nucleotídeos acima do início de transcrição, com indicações de conter regiões promotoras, sendo localizada uma região a 25 nucleotídeos acima do início de transcrição com característica de uma região Tata Box (FIGURA 5).

O gene é composto por sete éxons e seis íntrons (FIGURA 4). Os íntrons do gene são curtos, entre 154 e 70 nucleotídeos, maior e menor íntron, respectivamente. Todos os íntrons sequenciados apresentaram as sequências sinais de *splicing*: GT (5') e AG (3').

O RNA mensageiro da EHJ possui 1704 nucleotídeos, sendo que existe uma sequência 5' não traduzida de 183 nucleotídeos; este mensageiro sintetiza uma proteína de 567 aminoácidos (FIGURA 5).

Figura 4 – Representação esquemática da arquitetura genômica do AmEHJ. Os éxons estão indicados pelos retângulos, assim como a indicação da posição inicial e final dos seus nucleotídeos. (I) códon iniciador e (F) códon terminador. A direção da transcrição está indicada pela seta.

```

1 - AGCAACCAACTGTATCAACATCCATATATACTACCTAATCATATTATGATTCTTCATCTT - 60
61 - CAATTCTTTAGTAGATTATTTATATATAAATATAATTTTCTTATACATTTATATATATAC - 120
121 - ATATATATACATAATATATCTATTTTGGATTCTTAATTTTTTCTTAATTTGTTAAAAAA - 180
      *
181 - TTTATATTAAAGAAAATAATTATAGTTATATATATAGAAACATCAAAAATCTTATATAGA - 240
241 - CATTTATCTTTTTTACAAGTGACGTTGTAAAGATAAGTAACAAATAAAACGAGAATAATCA - 300
301 - AAATAGTGTTATTGCATTAAAGATGAAGCTACTATTCCTAGTACTTCTTCTCTCTTGT - 360
      M K L L F L V L L S S L V
361 - GACTTTTGGTTGGACTTTGGAAGATGCGCCAGAGTAAAACTCCTTTAGGTGCAATTAA - 420
      T F G W T L E D A P R V K T P L G A I K
421 - GGGATATTATAAGATATCTGGCAATGGAAAACAATATGAAGCTTACGAAGGAATTCCTTA - 480
      G Y Y K I S G N G K Q Y E A Y E G I P Y
481 - TGC GTTACCTCCAGTTGGGAAATTTGATTCAAGGTAAAAAGTGTTTGATTAGATTTAAT - 540
      A L P P V G K F R F K
541 - TTTTGAAATTGGAAAAATTATTTAATATTATGAATCTTTAAGCATCATATAATTGTTTGT - 600
      -
601 - AATATTAATAATATTTCAAATTTCTTTGTTGAACCTTAATGATAATAAATGATTATTATTT - 660
      -
661 - TCTTCAGGCGCCTCAAAAAATTCAGCATGGATAGGCGAGCTTTCCGCAACAAAATTCGG - 720
      A P Q K I P A W I G E L S A T K F G
721 - CTTTCCTTGTCTACAGTATACCCAATTGCCTGTAAATCCACGTGACAAAATTGAAGGTGC - 780
      F P C L Q Y T Q L P V N P R D K I E G A
781 - CGAAGATTGTCTGTATTGAATGTTTACGTGCCGCGCAGATAGAACACCTTCTCAATCATT - 840
      E D C L Y L N V Y V P A D R T P S Q S L
841 - ACCAGTAATCTTTTGGATCCACGGTGGTGCTTTTCAATTTGGTAGTGAATACCAATGGG - 900
      P V I F W I H G G A F Q F G S G I P M G
901 - TGCCAAATATCTCATGGATAGCGATGTTATATTTGTTACAATTAATTATCGTTTtaggaat - 960
      A K Y L M D S D V I F V T I N Y R L G I
961 - ATTAGTATTTATTTAGGAATAATTATTTGTCAATTTGTATAATAATCATAGATAATTGT - 1020
      -
      L G
1021 - AAGAAAAGTTATAATAGATAATATTGTTTAAGGTTTTCTCAGTACAGAAGATGAAGTAGT - 1080
      -
      F L S T E D E V V
1081 - TCCCGGTAATATGGGATTGAAGGATCAAAGTATGGCGTTGCGATGGGTTTCAGAAAATAT - 1140
      -
      P G N M G L K D Q S M A L R W V S E N I
1141 - TGAATGGTTCGGTGGTAATCCAAAGAGGATAACTTTAATAGGTTTAAGTGCCGGTGGTGC - 1200
      -
      E W F G G N P K R I T L I G L S A G G A
1201 - TAGCGTTCATTATCATTTATTTATCACCTTTGAGCGCCGGTCTTTTCCAAGGTCTTTTGCA - 1260
      -
      S V H Y H Y L S P L S A G L F Q G
1261 - AAATCTTATTTCTTTTATTAAAATATTCTGATTTTTTGATTTATATTCGGTGTACTTTT - 1320
      -
1321 - GTCTATTTATTTCTTATTTTTTTTTTAAATTTTATGTAATACAGGTGGTATTTTCGATCAG - 1380
      -
      G I S I S
1381 - TGGTACAGCTTTAAATTGTTGGACTCAAACAGAAAATTTCTTTGGAGAAAGCCAAACAAGT - 1440
      -
      G T A L N C W T Q T E N S L E K A K Q V

```

Figura 5 – Sequência do AmEHJ. Os éxons foram traduzidos pelo programa JustBio.

Os trechos de nucleotídeos não traduzidos (sombreados) correspondem aos seis introns. A possível região Tata Box, o sinal de poliadenilação e a cauda poli-A+,

nesta ordem, estão sublinhados. O início da transcrição está destacado com um asterisco, e o códon de terminação está representado por um hífen.

```

1441 - AGGAGCTTTTATGGGTTGCCCTACACGTAATGTCAAGGAAATGATACGTTGTCTCAGGTA - 1500
      - G A F M G C P T R N V K E M I R C L R Y
1501 - TCGTCCAGCTCGAGCTATAGTTGAAACTCTCGCTAATTTTATGCGATTCTATTATAATCC - 1560
      - R P A R A I V E T L A N F M R F Y Y N P
1561 - ATTCACACCGTTCGGACCCGTTACGGAGAAAGTTAATAATGATTGCAATTCACCTCCATT - 1620
      - F T P F G P V T E K V N N D S N S L P F
1621 - TATCGATCGTACTCCTATTGAAATTATAAATAGCGGTGATGTTCAAGATGTTCCATGGGT - 1680
      - I D R T P I E I I N S G D V Q D V P W V
1681 - TACAGGAGTTACCAAGTGAAGAAGGATTATATCCAGTCGCTGTAAGAAATGGGCGAAATG - 1740
      - T G V T S E E G L Y P V A E
1741 - ATCGAAAAATATTTGTATCATTTTGAATTGTGATTTAAAATCATAAATTTTACAGAATTT - 1800
      -
      F
1801 - ATTGCTAAACCAGAAGCTTTGAAATTATTGGATGAAAACGGGATCTTATTGCCCTTAT - 1860
      - I A K P E A L K L L D E N W D L I A P Y
1861 - TTTCTTGATTACAATTATACCATTCCCAAAGAAAAACATGTTGAAGTTGCTAGACTCATT - 1920
      - F L D Y N Y T I P K E K H V E V A R L I
1921 - AGGAATTATTATTTTGAATCAAATAAAATTGATGAAACAACCTCTAAACATTTAATTGAT - 1980
      - R N Y Y F E S N K I D E T T L K H L I D
1981 - GTAGCCAGTGATCGATTCTTTATTACTGACGGTGAAAAAGCAGCTAGAATGCAAGCTAAA - 2040
      - V A S D R F F I T D G E K A A R M Q A K
2041 - GTTAATCGACAACCTGTCTGGTTTTATTATTATACTTATAAAGGTGCACACAGTATTAGT - 2100
      - V N R Q P V W F Y Y Y T Y K G A H S I S
2101 - GAAATTATGAGTGGAACTTCTAATAAATATGGTATAAAATTCAGATTCAAACTTCATT - 2160
      - E I M S G T S N K Y G
2161 - TTAATATAAGAAAAAATGATAATTGTATCTTATTAAATATAATTTTATACAGGTGTGTG - 2220
      -
      V C
2221 - TCATGCAGATGATGCATACATGGTTGTAGATACTCCTTTTCTCGCTTCCACAACCACAAC - 2280
      - H A D D A Y M V V D T P F L A S T T T T
2281 - AAATGATATTAAATGCAAAAAGTTTGTATTGATTTTGGGTATCATTGTAAATAATGG - 2340
      - N D I K M Q K V L I D F W V S F V N N G
2341 - GTAAGTAGATATTTTAACTGATATATATTTAAATAGAAATCAATTTATATTTATTTTAA - 2400
      -
2401 - ATTATTTTAGAGTACCAAACGTTAATAGTGTTCAATGGCCAAGATTAAATCCAAATGAAA - 2460
      -
      V P N V N S V Q W P R L N P N E K
2461 - AATCACTTCATTATTACACATTGCTGGACCAGGAAAGATTCAAATGGATAGCAGTACAA - 2520
      - S L H Y L H I A G P G K I Q M D S S T N
2521 - ATTTTGGTCGCGAAGATTTCTGGAATTCTATTAACCTTAATGAAAACAAATTACATACAT - 2580
      - F G R E D F W N S I N F N E N K L H T S

```

2581 - CTGACACATTGAAAGAAGAATTATAAATTTTATTAAATATTTTCATACAAATTTTGTAAT - 2640
- D T L K E E L -
2641 - AATTGTAAAATTATATATTTCAAATTTCAATAAATGTAAAATTATACATTTTATGTTTTC - 2700
2701 - ATAGCAATTTTATATAATAAAGTGTTATAATTATGAATAATTATATTATTTAATTTAAAT - 2760
2761 - TTATGCTTATTTTACTTATGTATTAATAAAAAAAAAAAAAA - 2805

Figura 5 - (continuação)

4.2. Detecção do transcrito do AmEHJ

A análise por Northern Blot revelou apenas um transcrito de 2 Kb para o AmEHJ (FIGURA 6), tanto em operárias quanto em rainhas. O mRNA foi detectado nas fases do desenvolvimento onde a expressão do gene é alta, assim, não foi detectado o transcrito nas fases de PP (rainha) e Pw (operária), que também foram analisadas.

Figura 6 – Análise por Northern Blot para localização do mRNA da EHJ de rainhas, das fases L5S1 e L5S2 (larvas de quinto estágio em fase de tecelagem do casulo) e PP1 (pré-pupa) e operárias, das fases de L4 (larva de quarto estágio) e Pw (pupa de olho branco), com a detecção de um único transcrito.

4.3. Análise da sequência da EHJ

O alinhamento entre o trecho da EHJ de *A. mellifera* e o trecho correspondente de outros insetos foi feito pelo programa ClustalW. Quarenta e dois aminoácidos têm posições conservadas em todas as sequências de EHJ analisadas. Podem ser destacadas, também, quatro regiões que se repetem em todas as proteínas: **IHxGxF**, **GLxD**, **FGG** e **GxSxG** (FIGURA 7). A região protéica que compreende o maior número de aminoácidos conservados está entre os aminoácidos na posição 40 e 280.

As sequências das EHJ de *D. melanogaster* e *T. molitor* foram as que mostraram maior identidade com a EHJ de *A. mellifera*, sendo respectivamente, 52 e 53% de identidade, segundo o programa NCBI-BLAST. Porém quando foi analisado o trecho de 502 nucleotídeos amplificado pelos *primers* EHJP1 e EHJP2, que contém a região GxSxG, a identidade entre estas sequências foi superior, 61% para *T. molitor* e 57% para *D. melanogaster*.

Foi construído um dendograma para determinar a relação entre as EHJ já descritas em insetos. As sequências agruparam-se em dois ramos, em um deles se localizam as EHJs de lepidópteros: *Bombyx mori*, *Manduca sexta*, *Trichoplusia ni*, *Heliothis virescens* e *Choristoneura fumiferana*; um segundo grupo foi formado pelas EHJ de *Apis mellifera*, *Tenebrio molitor* e *Drosophila melanogaster*. A sequência da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* utilizada como grupo externo agrupou-se separadamente das EHJs (FIGURA 8).

A análise das EHJs em programa MEME/MAST mostrou que existem três regiões de maior similaridade para esta proteína, chamadas de domínios 1, 2 e 3, estas regiões estão localizadas entre os aminoácidos 40 e 280 dos peptídeos (FIGURA 9), conforme previsto pela análise dos aminoácidos.

```

Bm -----MCTKFAVLLYYVIVGVS VRAYSSPAASPSSCNVVAQTESGWVCGRTRRAEAST
Ms -----MDARRQVCYYVLALLCVSELSARIPSTEEVVVRTESGWIRGLKRRRAEGNK
Hv -----MTSHVLALAFLLHACTALAWQETNSRSVVAHLDSGIIRGVPRADG-I
Cf -----MVSSVKSVAVALLVAVCGAASERLRGARCARRRAGCAARARAGG
Tn MVKHLNCVWLLAIHFFCVNCLWPNIDQRYHANQRPCQDVRAQLDSGWVCGSIRSAEEGV
Tm -----MKLNVFVLISLHICFTLESVSTYAPKSPIVYTKYGPAIGLTEVSRSKR
Dm -----MLQLLLLQQLLAGPGPFCAALATVDQLTVCPPSVGCLKGTNLQGYQSE
Am -----MKLLFLVLLSSLVTFGWLTLEDAPRVKTPGLAIKGYKISGNGK

Bm LYASFRGVPYAKQPVGELRFKELQPAEPWTDYLDATTEEGPVCYQTDVLYGSLMKPHGMD
Ms SYASFRGVPYAKQPLGELRFKELQPLEPWQDELDATQEGPVCQQTADVLYGRIMPRGMSE
Hv KFASFLGVPYAKQPVGELRFKELQPLEPWQDNILNATNEGPICFQTDVLYGRMAASEMSE
Cf DYASFLAVPYAKQPLAALRFQELQPAEPWKGCRDATKPGPICPQDRLFYGPMTMRASEMSE
Tn QYASFRGIPYAKQPLGQLRFKELQPLKPWNGVLEETIEEGPICPQYDEIYGRMGQPTAMSE
Tm EFMSFRGIPYAKPPVGELRFAAPEPEPWNFAINATQNGPICIQKNYFFSDPKVEG--TE
Dm RFEAFMGIPYALPPIGDLRFSNPKVMKLLGMYDASAPKMDCIQKNYLLPTPVVYG--DE
Am QYEAYEGIPYALPPVGKFRFKAPQKIPAWIGELSATKFGFPCLQYTQLPVNPRDKIEGAE
      * * * * *

Bm ACIYANIHVPLNALP-AAGETP--TKPGLPILVFIHGGGFAGSGDADLYGPEYLVTRN-
Ms ACIHANIHVPPYALPRDAADKN--RFAGLPVLVFIHGGGFAGSGSDSLHGPEYLVSKD-
Hv ACIYANIHVWQSLPRVRGTTTP--LRP---ILVFIHGGGFAGSGHEDLHGPEYLVTKN-
Cf ECIHANVYMPLOQLPAASEGAAPRNRLLPVLVYIHGGGFAGSGDPDLHGPEYLMGDN-
Tn ACIYANVHVFPNEYTSYNQTAN-----YLPILVFIHGGGFQIGSSGSDIHGPEYLMKSG-
Tm DCLYLNYYVPKVKGT-----ALLPVMVFIHWGGFLAGRTSDYFGPEYIMDKD-
Dm DCLYLNYYRPEIRKS-----ALPVMVYIHGGGFAGSGAGPGVTGPEYFMDSGE
Am DCLYLNYYVPADRTF-----SQSLPVIFWIHGGAFQFGSGIP--MGAKYLMDS-
      * * * * *

Bm VVVITFNYRLNFFGGFSLDTPKVPGNGLRDMVTLRLRWVKNARAFGGNPDNVTLAGQSA
Ms VVITFNYRLNVYGFSLNSTSVPGNAGLRDMVTLKQVQNAHFFGGRPDDVTLMGQSA
Hv VVITFNYRLNVYGFSLMNTNIPGNAGLRDQVTLRLRWVQNAHFFGGDPDSITLAGQSA
Cf VVVITFNYRLGPFGLSLNSSVPGNAGLRDMVTLRLRWVCRNARAFGGDPGDVTLAGQSA
Tn VVITFNHRLNVYGFSLNSTKIPGNGLRDAITLLKQVQNAHFFGGDPDNVTLAGQSC
Tm VILVTFNYRLGVGFFTTLDLDFAPGNGLKQVMAKLFVQETIECFGGDKNRVTIFGQSA
Dm VILVTMAYRLGPFGLSTQDAVMSGNFGGLKQNLALRWVQRNIRFFGGDPQRVITIFGQSA
Am VIFVTINRYRLGILGFLSTEDDEVVPGNMGLKDQSMALRWVSENIEWFGGNPKRITLIGLSA
      * * * * *

Bm GAAAAHLLTSLKATEGLVSRAILMSGAGTSTFFTSPIFSQSINKILFSILG-----VNS
Ms GAAATHILSLSKAADGLFRRAILMSGTSSSAFFTTNPVFAQYINKLFVTNIG-----ITA
Hv GASAAHLLTSLKATEGLFKRAILMSGTGMSYFFTSPLFAAYISKQLLQILG-----INE
Cf GAASAHILSLSEAARGLFKRAILMSGTSTRSFFSTSPAYAQYVAQLFLTNLG-----ING
Tn GAVAAHLLSLSKASEGLFKRLIILMSGVATAGFYTTSPSYTQMAQMFGLGNVG-----INS
Tm GGGSVSLHLVSPLSRGLFQQATISQSGVALDLWAKPLNPLQVQITAAALATFAGCQAQLANR
Dm GGVAAHMHLLSPRSHGLFHRVISMSGTANVPFAIAEQPLEQARLLAEFADVPDARN-LST
Am GGSVHYHYLSPLSAGLFQGGISISGTALNCWTQTEENSLEKAKQVGAFMGCP-----TRNV
      * * * * *

```

Figura 7 – Alinhamento entre as seqüências conhecidas da EHJ de insetos, feito pelo programa ClustalW. Seqüências utilizadas: *Bombyx mori* (Bm), *Manduca sexta* (Ms), *Heliothis virescens* (Hv), *Trichoplusia ni* (Tn), *Choristoneura fumiferana* (Cf), *Tenebrio molitor* (Tm), *Drosophila melanogaster* (Dm) e *Apis mellifera* (Am). Os aminoácidos conservados em todas as proteínas estão destacados com um asterisco; os aminoácidos que aparecem em pelo menos cinco das seqüências estão sombreados. As regiões **IHxGxF**, **GLxD**, **FGG** e **GxSxG** que aparecem em todas as proteínas estão sublinhadas. Para o número de acesso no GenBank, ver Tabela III.

Bm	TNPDEIHEKLVAMPVEKLNANRILIDQIGLTTFEPVETPHPGITT-ILDEDPNIIIVQQ
Ms	TDPEEIHQKLIEMPAEKLNEANRFLLEQFGLTTFEPVVEESPINGVTT-ILDEDPQEILIAK
Hv	TDPEEIHRLIDLPKAEKLNEANAVLIEQIGLTTFVPVIVESPLPGVTT-IIDDDPEILIAE
Cf	TDPEEVHRLIDTPIEKIIDQNLDQDVIGITVFPVVESEHPGVEI-ILDNDPEILQSQ
Tn	TDADIEHDQLVQMPLEKIMEANRIVQFKTGVISEAPVEESELGVSR-ILDDDPANLIKQ
Tm	ADLLKCLREVDQAQKLAETADKFYFSIEPLTPYTLVTENKTAANPNP-FLEKQPLSYLQD
Dm	VKLTKALRRINATKLLNAGDGLKYWDVDHMTNFRFPVVEEG--LEVDA-FLNAHPMDMLAQ
Am	KEMIRCLRYRPARAIVETLANFMRFYYPNPTFPFGPVTEKVNNDNSNLPFIDRTPIEIIINS
Bm	GRGKDIPLIIGFTNSECHMFQHRFEQIDIVSKINEN--PAILVPSNLLYSSTP-ETIALV
Ms	GRGKHIPLIIGFTDAECEIFRQFEQIDIVSKIKEN--PGILVPLSVLFSSAP-DTVAEI
Hv	GRGKNIPLLIGFTSSECETFRNRLNFDLVKKIQDN--PTIIIPKLLFMTTP-ELLMEL
Cf	GRGKDIPFLMGFTNAECQTFRPRFESIDIISRIAEQ--PVLVMPPPAIYVTP-LDELNPK
Tn	GRGKDLPMIIGSTTKECEFFKNRIIYLDLIGLIKEN--PSVALPVNMSYSVSA-KKSFDL
Tm	EEFLKVPWIVGNVQDEGILRVAQLVRQPETLKALNDNFKTLITQLLALQVSVG-ENTTSL
Dm	GMPTSIPLLLGTVPGEGAVRVVNILGNETLRQSFNLRFDLLELLEFPASFSQDRREKM
Am	GDVQDVPWVTGVTSEEGLYPVAEFIAPKPEALKLLDENWDLIAPYFLDYNITIPKEKHVEV
	* * *
Bm	SNQISQRYFNG-----SVDLEGFINMCTDSYKYKPAKLAEKRSAAGDAPVFLYQFS
Ms	TKAMHEKYFKK-----SVMDEGYIELCTDSYFMPAISLAIKRARSNGAPVLYQFS
Hv	AKTIERKYNG-----TISIDNFVKSCSDGFYEYPALKLAQKRAETGGAPLYLRF
Cf	IGQIVQRYFNG-----TPNLNKFIKLCSESYFVYPTLKLAEAMRAANGGAPVLYRFT
Tn	YQMISDRYFQG-----NLTVENYLPYCADSFFIYPAIKVAEWRASLGAPVYRYEFN
Tm	YDNMINFYLGKSSIDVNDPKSVQGFIDLYTDRSFTYGTQYQTAILQSQKGHTPIWMYNFD
Dm	MDLLVEVYFQGHQEVN--ELTVQGFNMNLISDRGFKQPLYNTIHKNVCHTPNPVLYSFN
Am	ARLIRNYFES----NKIDETTLKHLIDVASDRFFITDGEKAARMQAKVNRQPVWFYYYT
	*
Bm	YDG-YSVFKQAFH----LHFNG-AGHADDLTIVLVKNSASG----TSSSQKADDEMKYWM
Ms	FDGDYSVFREVNH----LNFEG-AGHIEDLTIVVFRTNMMLGGHA-SFPPHDKDDHMKYWM
Hv	YEGQNSIIKKVMG----LNYEG-VGHIEDLTIVFKVNSMSDALH-ASPSEN-DVKMKNLM
Cf	YEADYSVFQEGLR----LKYRG-TGHSEDLTLLFRANHVLG----ERAI SPRDHKMDAM
Tn	FDSTFNVVKFTLM----LHYSEGAHVEDMTFVFRTNMMDGADEKSFPPRTRDDLKMSWM
Tm	YRGQYSYGDQFAATTDDINFNWGVSHCDDLILYLFKSPALFPDLE-----KESDLKMSAL
Dm	YQGPLSYASAYTSAN--VTGKYGVVHCDDLILYLFSPALFPDFQ----RNSTEAKVIHSF
Am	YKGAHSISEIMSG----TSNKYGVCHADDAVMVDTFPFLASTTT-----TNDIKMQKVL
Bm	TTFVTNFMRCSSAPMCDETTAWPPVTPRE-LQYQDIITPNLCHQTSLTKEQLEMKNFFDKI
Ms	TSFITNFMKYSNPVTDK-LWPEVRADN-LRYQDIDTPDVYQNVKPHSEQRDMLDFFDSI
Hv	TGYFLNFIKCSQPTCEDNNSLEVWPANNGMQYEDIVSPTIIRSKEFASRQQDIIEFFDLS
Cf	TTYVTNFMHLNSNPTKGVAGWPAVK--REKLQYQNIITPELVT-TEVSRDLRDTMTFFDNI
Tn	TSFVVNFMRCSSQPVCDGEVNWPPSTDAQQLKLPAD-----
Tm	VTMWTNFAIHGTPDPFNSLQWNSLNFNNTTEEIKGSNLKFLNMTGSSKTKTIEFKLQRGFY
Dm	VDYFVHFAKFGKPRNSVLLTPCSIEVLQ-SRPDGICDYHEFANAPDAYQGFEVHVASEFQ
Am	IDFWVSFVNNGVPPVNSVQWPRLNPNKSLHYLHIAGPGKIQMDSSTNFGREDFWNSINF
Bm	HNGGESRLK-----
Ms	YNWNGTSYCIK-----
Hv	SSRSPLE-----
Cf	YSSSS-----
Tn	-----
Tm	PERMQFWANQNLAENFPGLG
Dm	TDRVNLWSHILNEK-----
Am	NENKLHTSDTLKEEL-----

Figura 7 – (continuação)

Figura 8 – Dendograma de similaridade das seqüências de EHJ descritas em insetos. Seqüências utilizadas: *Manduca sexta* (Ms), *Heliothis virescens* (Hv), *Bombyx mori* (Hv), *Choristoneura fumiferana* (Cf), *Trichoplusia ni* (Tn), *Tenebrio molitor* (Tm), *Drosophila melanogaster* (Dm) e *Apis mellifera* (Am). Para o número de acesso no GenBank, ver Tabela III. A proteína acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (número de acesso: NM172009) foi usada como grupo externo (GE). A topologia do dendograma foi calculada usando-se o programa Mega 2.1 (Kumar *et al.*, 2001), e metodologia Neighbor joining, a significância foi avaliada por 1000 repetições.

Figura 9 – Esquema feito a partir da análise da sequência de aminoácidos das EHJs descritas em insetos através do programa MEME/MAST, mostrando as regiões mais conservadas, chamadas de domínios **1**, **2** e **3**. Sequências utilizadas da EHJ: (Ms) *Manduca sexta*, (Hv) *Heliothis virescens*, (Bm) *Bombyx mori*, (Cf) *Choristoneura fumiferana*, (Tn) *Trichoplusia ni*, (Tm) *Tenebrio molitor*, (Dm) *Drosophila melanogaster* e (Am) *Apis mellifera*. Os números abaixo indicam o tamanho, em aminoácidos, das sequências. Para o número de acesso no GenBank, ver Tabela III.

4.4. Expressão do AmEHJ ao longo do desenvolvimento de operárias

Os *primers* utilizados para os experimentos de RT-PCR amplificaram um trecho de 502 nucleotídeos do cDNA e 589 no DNA genômico, assim, é possível deduzir que existe um íntron de 87 pares de bases flanqueando esta sequência. A presença deste íntron impede a contaminação nos experimentos de expressão gênica por RT-PCR semiquantitativa por DNA genômico, mesmo se ocorresse alguma falha no tratamento com DNase.

A curva de saturação da PCR feita para os *primers* utilizados neste estudo mostrou que após 37 ciclos ocorre saturação da reação (FIGURA 10), sendo assim, foram escolhidos 35 ciclos para as análises de expressão do AmEHJ por RT-PCR, sem que haja necessidade de utilização de Southern Blot.

Figura 10 – Curva de saturação da PCR usando-se *primers* específicos para a EHJ. O número de ciclos está mostrado na parte superior da foto. Gel corado com EtBr.

A expressão do AmEHJ nas operárias de *A. mellifera* analisada por RT-PCR revelou existência de modulação deste gene ao longo do desenvolvimento, provavelmente pelos hormônios morfogenéticos. A expressão do AmEHJ durante o desenvolvimento em relação aos títulos de HJ e ecdisteróides está representada na FIGURA 11.

Os maiores níveis de expressão foram verificados nas fases L5F e início de L5S. A menor expressão do gene foi detectada na fase de pré-pupa (PP1, PP2 e PP3). Nas fases pupais, a expressão do AmEHJ é baixa, porém não é ausente. Após a fase pupal Pbd o nível de expressão do gene tem um pequeno aumento, que se intensifica em recém-nascidas (FIGURA 11).

A expressão da EHJ nas operárias adultas de *A. mellifera* analisada por RT-PCR seguida de Southern Blot mostrou que após o nascimento a expressão do gene aumenta de acordo com o aumento de idade das operárias (FIGURA 12).

Figura 11 – Análise da expressão, por RT-PCR, do AmEHJ ao longo do desenvolvimento pós-embriônico e relação com os títulos de HJ e ecdisteróides. Fases: L2-3 (larva de segundo e terceiro estágio), L5F (larva no quinto estágio em fase de alimentação, subdivisões: F1, F2 e F3), L5S (larva em fase de tecelagem do casulo, subdivisões: S1, S2 e S3), PP (pré-pupa, subdivisões: PP1, PP2 e PP3), Pw (pupa de olho branco), Pp (pupa de olho rosa), Pb (pupa de olho marrom), Pbl (pupa de olho marrom com tórax levemente pigmentado), Pbm (pupa de olho marrom com pigmentação média do tórax), Pbd (pupa de olho marrom com corpo fortemente pigmentado) e RN (recém-nascida). Como controle normalizador foi usada a expressão do gene da actina. A curva de HJ ao longo do desenvolvimento de operárias de *Apis mellifera* foi modificada de Rembold (1987) e Rachinsky *et al.* (1990). A curva de ecdisteróides ao longo do desenvolvimento de operárias de *Apis mellifera* foi modificada de Rachinsky *et al.* (1990), Feldlaufer *et al.* (1985) e Pinto *et al.* (2002). Géis corados com EtBr.

Figura 12 – Southern Blot da expressão do AmEHJ em operárias adultas. Fases: 1d-15d (operárias adultas com n dias de vida). Como controle normalizador foi usada a expressão do gene da actina, gel corado com EtBr.

4.5. Expressão do AmEHJ nas castas e sexos

A análise de expressão do AmEHJ nas castas e sexos revelou que zangões não têm o perfil de expressão variável nas fases analisadas. Operárias possuem os maiores níveis de expressão do gene, nas fases de L3, L4, L5F1 e L5S1; uma diferença importante foi detectada na fase PP1, em operárias, nesta fase há uma queda da expressão do AmEHJ, enquanto que em rainha pode ser observado um aumento na expressão, em relação à fase anterior: S1; em rainhas a maior expressão do gene, assim com em operárias, foi em L4 (FIGURA 13A). A análise densitométrica das bandas revelou os mesmos resultados FIGURA 13B.

Figura 13 – Análise por RT-PCR da expressão do AmEHJ em larvas de rainha, zangão e operária, nas fases de L3 (larva de 3º estágio), L4 (larvas de 4º estágio), L5F1 (larvas no início do 5º estágio em fase de alimentação), L5S1 (larvas no início do 5º estágio em fase de tecelagem do casulo) e PP1 (pré-pupas iniciais), géis corados com EtBr (A). Gráfico da expressão do gene, feito a partir de densitometria das bandas visualizadas no gel de agarose (B). Como controle normalizador foi usada a expressão do gene da actina.

4.6. Expressão do AmEHJ em ovários de larvas de rainhas e operárias

O AmEHJ mostrou expressão diferencial nos ovários de operárias e rainhas durante o período de diferenciação deste órgão. A expressão do gene foi acentuadamente maior nos ovários de operárias quando comparado aos de rainhas. Em rainhas a maior expressão foi na fase de L5F1. Em operárias a maior expressão foi em L4 e L5F1 (FIGURA 14).

4.7. Expressão do AmEHJ em diferentes tecidos e órgãos

A comparação da expressão do gene em diferentes tecidos e órgãos na fase larval L5S3 mostrou que existe expressão do gene em todos os órgãos ou tecidos analisados. A maior expressão do AmEHJ foi verificada em corpo gorduroso e no intestino. A menor expressão foi encontrada na cabeça (FIGURA 15).

Figura 14 – Resultado da análise por RT-PCR da expressão do AmEHJ durante o desenvolvimento dos ovários nas fases larvais de rainhas e operárias de *Apis mellifera*: L4 (larva de 4º estágio larval), L5F1 (larva de 5º estágio em fase de alimentação), L5S2 (larva de 5º estágio em fase de tecelagem do casulo) e PP3 (pré-pupa). Como controle normalizador foi usada a expressão do gene da actina. Géis corados com EtBr.

Figura 15 – Resultado do experimento de expressão do AmEHJ, por RT-PCR em diferentes tecidos: CG (corpo gorduroso), Ov (ovário), Ep (epitélio do intestino), TM (túbulos de Malpighi) e Cab (cabeça) na fase larval L5S3 (larva de 5º estágio larval no final da fase de tecelagem de casulo). Como controle normalizador foi usada a expressão do gene da actina. Géis corados com EtBr.

4.8. Tratamento de pupas de olho marrom com PPN e 20E

As pupas de olho marrom tratadas com 20E tiveram um pequeno atraso na pigmentação, o que pode ser entendido como um pequeno atraso no desenvolvimento. As pupas tratadas com 20E analisadas 24 e 48 horas após o tratamento apresentaram diminuição da expressão do AmEHJ, no entanto a expressão normal foi recuperada 72 horas após o tratamento (FIGURA 16). O tratamento com PPN não alterou a expressão da EHJ.

Figura 16 – Southern Blot da expressão do AmEHJ após tratamento com PPN e 20E em pupas de operárias de olho marrom. As amostras foram coletadas 24, 48 e 72 horas após o tratamento. Amostras: (1) controle sem tratamento; (2) controle tratado topicamente com acetona; (3) amostra tratada topicamente com PPN; (4) controle injetado com etanol e (5) amostra injetada com 20E. Como controle normalizador foi utilizada a expressão do gene da actina, gel corado com EtBr.

4.9. Tratamento em larvas de operárias com PPN e 20E

Não foram observadas alterações no desenvolvimento em larvas de terceiro estágio tratadas com PPN (FIGURA 17). O mesmo ocorreu para as larvas L5S2 tratadas com PPN e 20E (FIGURA 18).

Figura 17 – Expressão do AmEHJ após tratamento com PPN em larvas de terceiro estágio de operárias por RT-PCR. As amostras foram coletadas 48 e 72 horas após o tratamento. Amostras: (1) controle sem tratamento; (2) controle tratado topicamente com acetona; (3) amostra tratada topicamente com PPN. Como controle normalizador foi utilizada a expressão do gene da actina. Geis corados com EtBr.

Figura 18 – Expressão do AmEHJ após tratamento com PPN e 20E em larvas de quinto estágio em fase de tecelagem de casulo de operárias por RT-PCR. As amostras foram coletadas 24 e 48 horas após o tratamento. Amostras: (1) controle tratado topicamente com acetona; (2) amostra tratada topicamente com PPN; (3) controle injetado com etanol e (4) amostra injetada com 20E. Como controle normalizador foi utilizada a expressão do gene da actina. Geis corados com EtBr.

5. DISCUSSÃO

Ao desenvolver este trabalho localizamos, identificamos e estudamos a expressão do AmEHJ que se revelou idêntica à sequência depositada por Kamikouchi *et al.* (2004) classificada pelos autores de carboxiesterase. O conhecimento do AmEHJ permite mais um avanço no conhecimento do HJ que desempenha inúmeras funções como fator regulador na embriogênese, no desenvolvimento larval e adulto, na metamorfose, reprodução, diapausa, migração, polimorfismo e metabolismo (Nijhout, 1994; Roe & Venkatesh, 1990; de Kort & Granger, 1996; Hammock, 1985; Kamita *et al.*, 2003). Nas abelhas, o HJ é um dos responsáveis pela diferenciação das castas, que origina rainhas e operárias. Estes dois morfos com igual potencialidade genética se desenvolvem harmonicamente nas primeiras fases larvais, no entanto fatores ambientais modificam esta situação e estas fêmeas se distanciam definitivamente no final da vida larval, quando são observadas curvas hormonais que identificam cada casta. Esta modulação diferencial do HJ pode ocorrer em diversos níveis, desde o controle de sua síntese até sua degradação, onde, pensa-se que enzimas específicas exerçam papéis essenciais.

A EHJ tem sido apontada como um fator importante para o controle dos níveis do HJ em várias espécies de insetos. Assim, a localização do gene desta enzima, bem como uma análise de sua sequência e expressão devem acrescentar dados importantes a este cenário tão instigante que é o desenvolvimento diferencial das abelhas.

5.1. Análise comparativa com EHJs de outros insetos

O alinhamento entre as seqüências obtidas no projeto Electrapis que possuíam identidade com o gene de EHJ de outros insetos possibilitou a confecção de primers que amplificaram um trecho do cDNA da EHJ de *Apis mellifera*. As anotações feitas pelos programas NCBI-BLAST e ClustalW confirmaram ser esta a seqüência de uma carboxiesterase. As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos da EHJ de *A. mellifera* mostraram alta homologia com a EHJ de *D. melanogaster* e *T. molitor* (61 e 57% respectivamente), valores considerados baixos por Kamita *et al.* (2003). Na opinião destes autores o fato desta enzima ter um substrato tão específico e tão universal quanto o HJ, valores mais altos de homologia seriam esperados. Os valores encontrados por estes autores variaram de 52% a 59% para 4 lepidópteros, um coleóptero e um díptero, analisados. Nestes foram encontrados poucos e pequenos domínios conservados, entre eles o GxSxG, que está presente também na EHJ de *Apis mellifera*. Segundo Kamita *et al.* (2003) esta tríade catalítica é responsável pelo ataque nucleofílico ao átomo de carbono da ligação éster do HJ. Além deste motivo, mais três regiões: IHxGxF, GLxD e FGG são motivos funcionais putativos

O trecho de cDNA descrito por Kamikouchi *et al.* (2004) foi identificado entre as proteínas diferencialmente expressas em antenas de machos e operárias adultas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamina SDS-dodecil sulfato de sódio). O cDNA foi isolado e experimentos de Northern Blot revelaram que maiores níveis de mRNA da proteína são encontrados em antenas de zangões, assim, o gene desta carboxiesterase foi denominado D-AP1 (*Drone-preferential antennal protein*). Os resultados obtidos neste trabalho sobre a expressão do gene desta mesma carboxiesterase, em diversos aspectos, revelaram que este é o AmEHJ.

5.2. O AmEHJ tem expressão diferencial ao longo do desenvolvimento pós-embrionário de operárias.

O AmEHJ mostrou ter expressão diferencial ao longo do desenvolvimento de operárias, quando analisado por RT-PCR semiquantitativa. Nos estágios larvais L5F e L5S, onde a expressão do AmEHJ é alta, os níveis de HJ também estão elevados, porém neste período ocorre uma pequena queda dos títulos do HJ que precede o segundo pico de hormônio que deve estar relacionada ao aumento de expressão do gene. Neste mesmo período a quantidade de ecdisteróides presente na hemolinfa é muito baixa ou ausente.

Em *Leptinotarsa decemlineata* a EHJ possui atividade alta quando os níveis de HJ estão baixos (de Kort, 1990), ao contrário, o AmEHJ possui maiores níveis quando o HJ está presente em maiores quantidades.

Browder *et al.* (2001) verificaram que o pico de atividade enzimática da EHJ em *M. sexta* ocorre no final do quinto estágio larval. Em jejum, a atividade da EHJ cai antes de atingir o pico normal. Em *L. decemlineata* ocorre um pico de expressão do mRNA da EHJ no dia da muda em todos os estágios larvais, exceto no segundo (Feng *et al.*, 1999). Em *M. sexta* foi observado níveis máximos de HJ-ácido logo em seguida a muda do último estágio larval e em pré-pupa (Baker *et al.*, 1987). Em *A. mellifera* o pico de expressão do AmEHJ ocorre em larvas mais jovens.

Em pré-pupas (estágio que precede a metamorfose) o AmEHJ possui os menores níveis de expressão, período em que o HJ deve atingir níveis basais. Os dados sugerem que a queda de HJ está mais relacionada ao processo de síntese, como observado por (Rachinsky & Hartfelder, 1998). O pico de ecdisteróides que ocorre em pré-pupas pode ser responsável pela queda na expressão do AmEHJ. No início do

período pupal a expressão do AmEHJ se mantém baixa, provavelmente pela ausência do HJ neste período e presença de ecdisteróides em altas concentrações.

A presença da EHJ nos estágio embrionários não parece ser um evento universal. Em *C. fumiferana* o mRNA da EHJ não foi detectado neste período (Feng *et al.*, 1999). Em *A. mellifera* três isoformas (1, 2 e 3) estão presentes nas diferentes fases do desenvolvimento embrionário (Figueiredo *et al.*, 1996a). Contudo, em *A. mellifera* não foi investigada a presença do mRNA da EHJ nestas fases.

Algumas das isoformas de carboxiesterases detectadas em *A. mellifera* (Bitondi & Mestriner, 1983; Figueiredo, 1996a) apresentam expressão diferencial durante o desenvolvimento. Entre as isoformas estudadas, pelos autores acima mencionados, a esterase 6 foi a que apresentou menor afinidade pelos substratos utilizados, sendo detectada pelo α naftil acetato, α naftil butirato e α naftil propionato, e uma clara modulação em fases específicas do desenvolvimento. Segundo Kamita e colaboradores (2003) as EHJ, *in vivo* têm baixa afinidade pelos substratos sintéticos e são dificilmente detectadas por esta metodologia, por estar em menor concentração que as outras esterases. No entanto, quando sintetizada em grandes quantidades *in vitro* foi detectada pelo α naftil acetato e α naftil propionato. O gene localizado e seqüenciado neste trabalho apresenta modulação compatível com a esterase 6 (Figueiredo *et al.*, 1996a, Bitondi, M.M.G., informação pessoal) (ver FIGURA 19). A esterase 6 possui afinidade pelos substratos que foram capazes de revelar a EHJ em outros insetos.

Figura 19– Esquema ilustrativo mostrando a expressão do AmEHJ em operárias ao longo do desenvolvimento pós-embrionário em relação à atividade de três das isoformas de esterases detectadas em *Apis mellifera* e a curva de HJ de zangões, rainhas e operárias (modificado de Rembold, 1987 e Rachinsky *et al.*, 1990). (E2A, E5 e E6: isoformas de esterase determinadas segundo Figueiredo *et al.*, 1996a).

5.3. Existem diferenças de expressão do AmEHJ nas castas e sexos.

Rackinsky & Hartfelder (1990) sugerem que a diferença nos níveis de HJ entre rainhas e operárias no quinto estágio larval, pode estar relacionada, principalmente, com a quantidade limitada do precursor de HJ (MF) nos CA de operárias. A síntese deste hormônio é muito superior em rainhas, pois, estes autores mostraram que os CA (*in vitro*) de rainhas no final do período de alimentação sintetizam 26 vezes mais hormônio do que os CA de operárias.

Os resultados de expressão do AmEHJ entre castas e sexos corroboram com os títulos de HJ determinados para os sexos e castas da colônia. Os menores níveis de HJ ocorrem em operárias que apresentam os maiores níveis de expressão do AmEHJ. Podendo-se supor, neste caso, que os níveis de HJ são regulados também pela ação da enzima que degrada o hormônio e não apenas pelo processo de síntese pelos CA. A baixa expressão em rainhas corrobora com os maiores títulos de HJ observados nesta casta.

A alta expressão do gene em pré-pupa de rainha deve estar relacionada ao fato de que neste estágio, para que a metamorfose ocorra normalmente, os níveis de HJ atingem níveis basais, e como em rainhas ocorrem os maiores títulos de HJ, seria nesta casta a maior necessidade de degradação antes da metamorfose. Como os níveis de HJ são diferentes nas castas e sexos, a atividade diferencial do AmEHJ, deve ter relevância para o processo de diferenciação de castas.

5.4. O desenvolvimento diferencial de ovários de rainhas e operárias está relacionado a diferentes níveis de expressão do AmEHJ.

Em *Diploptera punctata* existe um pico de atividade da EHJ nos ovários de adultos em fase específica (durante o processo reprodutivo) e neste período a atividade da EHJ no corpo gorduroso e na hemolinfa não apresenta variações (Stoltzman *et al.*, 2000). Esta atividade aumentada da enzima nos ovários sugere que existe uma produção independente neste órgão, e assim, pode-se supor que há transcrição do gene em ovários quando a enzima é requerida em grande quantidade.

Estudos prévios sugerem que o HJ está envolvido na regulação do desenvolvimento dos ovários em Himenópteros primitivamente sociais como vespas *Polistes annularis* (Barth *et al.*, 1975) e abelhas *Lasioglossum zephyrum* (Bell, 1973). Em *A. mellifera* o HJ tem papel essencial no desenvolvimento diferencial da espermateca (Silva, J.E.B. - comunicação pessoal) e ovários (Schmidt Capella & Hartfelder, 1998, 2002) de rainhas e operárias.

O AmEHJ parece ter papel importante na diferenciação dos ovários de rainhas e operárias, uma vez que sua expressão é acentuadamente maior em operárias. Pode-se supor que maiores quantidades de EHJ nos ovários de operárias reduzem os níveis de HJ, e conseqüentemente, o processo de morte celular é maior tendo como conseqüência a redução do número de ovariolos nesta casta.

Ao fim do quinto estágio larval, os ovários de rainhas e operárias estão totalmente diferentes. Uma ilustração da diferenciação dos ovários de rainhas e operárias, durante o período larval está mostrada na FIGURA 21, com a permissão de Favaretto (2003). Nesta foto estão representados os ovários de rainhas e operárias nas fases de L5F2, L5F3 e PP3. Em L5F2 os ovários de rainhas e operárias estão

ainda com tamanho semelhante, a partir de então, o processo de degeneração se intensifica em operárias, culminando em ovários bem diferentes ao final do estágio larval.

Assim, a baixa expressão do AmEHJ em larvas de rainhas, pode estar atuando na diferenciação dos ovários através do controle dos níveis de HJ neste órgão. Aliado aos maiores níveis de HJ em rainhas (Rachinsky *et al.* 1990), a menor expressão do AmEHJ garante a presença do HJ nos ovários de rainhas necessária para prevenir degeneração neste órgão (Schmidt-Capella & Hartfelder, 1998, 2002).

Figura 20– Foto ilustrativa do desenvolvimento dos ovários em larvas de rainhas e operárias. (A, C e E) ovários de operárias e (B, D e F) ovários de rainhas; fases observadas: L5F2 (larva de quinto estágio na fase intermediária de alimentação), L5F3 (larva de quinto estágio na fase final de alimentação) e PP3 (final de pré-pupa,). Fonte: Favaretto, V. F. (2003).

5.5. O AmEHJ se expressa em diferentes tecidos e órgãos.

Na maioria dos lepidópteros estudados, a EHJ é sintetizada pelo corpo gorduroso e liberada para a hemolinfa, onde hidrolisa o HJ (Weirich *et al.*, 1973). Os altos níveis de HJ durante estágios específicos do desenvolvimento parecem ativar a expressão de EHJ no corpo gorduroso. Em *M. sexta* o transcrito do gene da EHJ só foi localizado no corpo gorduroso no quinto instar (Hirai *et al.*, 2002).

Em *C. fumiferana*, nas intermudas, o mRNA da EHJ está presente em diferentes tecidos e em diferentes quantidades. O corpo gorduroso apresenta as maiores quantidades de mRNA da EHJ, no entanto, o mensageiro também foi detectado no intestino médio e na epiderme (Feng *et al.*, 1999). Em *L. decemlineata* o mRNA da EHJ foi identificado em altos níveis no corpo gorduroso e cérebro em fases larvais. Baixos níveis foram encontrados nos testículos de machos adultos (Vermunt *et al.* 1999).

A EHJ possui diferença de atividade em ovários, intestino, cabeça e carcaça em *Culex quinquefasciatus*, após o período de alimentação em adultos (Lassiter *et al.*, 1996).

Em A. mellifera o mRNA da EHJ foi encontrado em ovários, corpo gorduroso, intestino, cabeça e túbulos de Malpighi, o que mostra a necessidade da enzima em locais diferentes. A alta atividade do AmEHJ em corpo gorduroso deve ser porque este é o principal local de produção da EHJ, como descrito na literatura. Para a alta atividade do gene no intestino não foi encontrada nenhuma relação com processos específicos do organismo.

5.6. Regulação da expressão do *AmEHJ*: inibição por ecdisteróides.

5

- 6 De um modo geral a expressão da EHJ acompanha os níveis de HJ e 20E nos estágios larvais e pupais.
- 7 Kithidi *et al.* (2004) localizaram um elemento de resposta de 30 pb no promotor do gene da EHJ de *Choristoneura fumiferana*, responsável pela indução deste gene por HJ e repressão por 20E. Neste trabalho, os autores induziram a expressão de um gene repórter ligado ao elemento de resposta de 30pb, através do tratamento com HJ em uma linhagem de células em meio de cultura, e reprimiram a expressão do gene repórter através da aplicação de 20E, demonstrando que o gene da EHJ de *C. fumiferana* responde ao HJ e 20E.

O tratamento com HJ aumentou os níveis de mRNA da EHJ produzidos em uma linhagem de células desenvolvidas a partir de células do intestino médio em *C. fumiferana*. Este aumento é dependente da concentração de HJ usada. O tratamento com 20E suprimiu a expressão do mRNA, nesta mesma linhagem, esta supressão também dependente da concentração aplicada (Feng *et al.*, 1999).

Em *M. sexta* foi descrita a indução da transcrição do mRNA da EHJ pelo tratamento com HJ, sendo que esta indução foi maior no tegumento do que no corpo gorduroso (Wroblewski *et al.*, 1990).

O tratamento com 20E, feito em operárias *A. mellifera*, na fase de pupa de olho marrom (Pb), reprimiu a expressão do *AmEHJ*. Nesta fase os títulos de ecdisteróides estão altos (FIGURA 2), porém o HJ está em níveis basais (FIGURA 1). A ecdisona pode estar agindo no controle da expressão da EHJ, mantendo a expressão baixa neste período, já que o aumento de concentração deste hormônio

gerou uma diminuição na expressão do gene. A ação de 20E sobre o AmEHJ em pupas comprova os experimentos de Kithidi *et al.* (2004).

No entanto, os tratamentos feitos com ecdisona em larvas de operárias não alteraram a expressão do AmEHJ. Esta diferença de resposta pode estar relacionada a uma sensibilidade “estágio-específica” do gene aos ecdisteróides, pois, em larvas os níveis de HJ estão altos e os de ecdisteróides baixos.

O AmEHJ é expresso em altas quantidades na presença de HJ. Quando os níveis de ecdisteróides aumentam nos últimos estágios larvais e os níveis de HJ começam a diminuir, o gene sofre uma redução de expressão, ocorrendo uma retomada quando os níveis de ecdisteróides caem no final do estágio pupal, e a concentração do HJ aumenta. Desta forma, supomos que a alta expressão do gene desta enzima estaria ligada mais aos níveis de HJ do que aos ecdisteróides.

O gene não respondeu ao tratamento com PPN, nem em larvas e nem em pupas de *A. mellifera*, esta ausência de resposta pode estar relacionada com a concentração de PPN usada no tratamento (1 µg), já que em outros trabalhos a indução do gene é dose específica (Feng *et al.*, 1999; Wroblewski *et al.*, 1990).

Em pré-pupas ocorre a menor expressão do AmEHJ, neste momento o HJ sofre uma queda que levará a níveis basais, talvez este estágio seja propício para o tratamento com o análogo do HJ, uma vez que, o tratamento não permitiria a queda abrupta nos títulos de HJ, e assim, poderia ser mantida a expressão do AmEHJ.

O efeito do imidazol sobre o desenvolvimento normal de insetos tem sido demonstrado em alguns trabalhos. KK-42, um imidazol, é conhecido por inibir a síntese de ecdisteróides agindo nas glândulas protorácicas, *in vitro* (Yamashita *et al.*, 1987) e *in vivo* (Kiuchi & Akai, 1988). Shiotsuki *et al.* (1999) induziram a atividade

da EHJ em *B. mori* em larvas de quarto instar quando foi aplicado imidazol KK-42 topicamente.

Vários trabalhos têm sugerido a ativação do gene da EHJ pelo HJ e a repressão do gene pelos ecdisteróides (Wroblewski *et al.*, 1990; Feng *et al.*, 1999; Shiotsuki *et al.*, 1999; Kithidi, *et al.*, 2004). O AmEHJ parece ter sua expressão ao longo do desenvolvimento regulada pelo HJ e pelos ecdisteróides. A presença de altos níveis de HJ parece ativar a expressão do gene (em larvas mais jovens e após a emergência), e altos níveis de ecdisteróides parece inibir sua expressão (em pré-pupas e pupas), o que foi reforçado devido à repressão do gene pelo tratamento com 20E em pupas.

Em rainhas a regulação do AmEHJ pelo HJ não mostra a mesma relação, ao contrário do que ocorre em operárias, o gene não está mais ativo em maiores concentrações de HJ, o mesmo ocorre no caso dos ovários. Devido ao fato do HJ ser necessário em maiores quantidades em rainhas, o processo de desenvolvimento nesta casta deve ser regulado por um sistema diferente, já que os altos níveis de HJ parecem não induzir altos níveis de expressão do AmEHJ neste organismo.

5.7. Perspectivas

A análise da expressão do AmEHJ mostra uma clara modulação durante o desenvolvimento. Além disto, foi observada também uma expressão diferencial nos sexos e castas de *Apis mellifera*. O controle da expressão da EHJ tem sido descrito para outros insetos como sendo em nível transcricional e sua função, pelo menos nos trabalhos clássicos, se resumiria a metabolizar a forma ativa do HJ para HJ-ácido, considerado inativo. No entanto, este cenário foi modificado recentemente através da

afirmativa de que a quebra do HJ daria origem a um metabólito ativo, o HJ-ácido, atribuindo assim, uma nova função a EHJ, ou seja, a de síntese de uma molécula com atividade (Ismail *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos até o momento neste trabalho revelaram que a EHJ tem ação importante durante o processo de metamorfose, já que a expressão do gene durante o desenvolvimento tem relação com os títulos de HJ. Não se tem conhecimento, pelo menos pela literatura disponível, a respeito da função da EHHJ em *A. mellifera*, vários autores sugerem um papel importante desta enzima no controle dos níveis de HJ em outros insetos. O estudo da expressão do gene da EHHJ pode revelar um papel complementar ao da EHJ durante a metamorfose ou ainda, revelar função restrita a outros processos. Um fragmento de 260 nucleotídeos do cDNA da EHHJ foi isolado (Santos & Simões, dados não publicados - número de acesso no GenBank: cDNA – AY 526236; proteína – AAS 20469). O trecho do gene desta enzima possibilitará estudos da expressão do mesmo durante o desenvolvimento de rainhas, zangões e operárias, possibilitando assim, uma análise comparativa entre as funções da EHJ e EHHJ em *Apis mellifera*.

O controle da degradação do HJ é essencial para que todo o HJ produzido pelos CA, e distribuído pelo corpo do animal, seja degradado. No entanto, a produção de HJ cessa em períodos específicos do desenvolvimento em vários insetos. O controle da produção do HJ está relacionado ao sistema nervoso (Gilbert *et al.*, 2000). Porém, não se sabe ao certo se o sistema nervoso atua diretamente na síntese de enzimas específicas da via de degradação do HJ, ou sobre outros fatores. O estudo da expressão dos genes correspondentes às enzimas responsáveis pelos passos finais da produção de HJ pode desvendar este intricado sistema.

O gene de uma das enzimas da via de síntese do HJ foi isolado: a *o*-metil transferase do ácido farnesóico, ou apenas, metil transferase do HJ. Um trecho do cDNA do gene desta enzima está disponível em banco de dados (número de acesso no GenBank: BI 946505). A análise de expressão deste gene em condições naturais, assim como, após tratamentos que induzam a síntese de HJ, podem auxiliar no entendimento do controle de síntese do HJ, bem como o papel de um suposto controle da via de produção deste hormônio.

O HJ tem um papel fundamental na diferenciação de castas. Operárias tratadas com HJ podem apresentar características de rainhas, e ainda podem antecipar a expressão de genes específicos (Bitondi et al., 1998; Pinto et al. 2000). Se a EHJ possui um papel fundamental na degradação do HJ, o silenciamento deste gene, através da técnica de interferência de RNA, poderia fazer com que os níveis de HJ se mantivessem altos, e assim poderiam ser verificados os efeitos de altas concentrações deste hormônio durante o desenvolvimento das castas e sexos, sem o uso de HJ exógeno ou procedimentos cirúrgicos. Além disto, esta técnica pode evidenciar qual das sete carboxiesterases detectadas em *A. mellifera* é a EHJ.

A modulação da expressão da EHJ seja pela indução por doses extras de HJ ou pelo silenciamento de sua expressão, será um passo importante para o entendimento do processo de metamorfose e reprodução de abelhas.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados permitem concluir que:

1. O cDNA da EHJ de *Apis mellifera* codifica um mRNA de 1.7kb, cuja expressão é modulada durante o desenvolvimento.
2. O AmEHJ possui 2.6kb e é composto por 7 éxons e 6 íntrons, encontrando-se *upstream* à extremidade 5'a provável região promotora, evidenciada pela presença de um TATA box. Próximo à extremidade 3' foi detectado o sinal de poliadenilação seguido de uma cauda poliA⁺ de 14 pares de base.
3. A análise da sequência predita da EHJ revelou a presença de 3 domínios conservados e 4 motivos: GxSxG, provável sítio catalítico, IHxxGxF, GLxD e FGG, também prováveis sítios ativos da esterase.
4. O AmEHJ mostrou uma alta homologia com o mesmo gene de *Tenebrio molitor* e *Drosophila melanogaster*.
5. Em um dendograma a EHJ de *A. mellifera* agrupou-se com as EHJ de *T. molitor* e *D. melanogaster*, outro ramo foi formado pelas EHJs de Lepidoptera.
6. A análise da expressão do AmEHJ mostrou que o mRNA está presente em altos níveis em momentos específicos, quando o HJ está em altos níveis e deve ser removido rapidamente, e que a expressão do gene é específica nos sexos e castas.
7. O mRNA da EHJ está presente nos ovários de rainhas e operárias nos últimos estágios larvais, quando os ovários das castas se diferenciam definitivamente.
8. A expressão do mRNA da EHJ durante a diferenciação dos ovários é mais baixa nas rainhas, mantendo alto os níveis de HJ, necessários para o desenvolvimento diferencial das castas.

-
9. A expressão do AmEHJ parece ser importante em vários tecidos, já que o mRNA foi identificado em ovários, corpo gorduroso, intestino, túbulos de Malpighi e cabeça. Este resultado demonstra que a EHJ é requerida em vários tecidos e não é produzida apenas pelo corpo gorduroso, como se pensou anteriormente.
 10. O AmEHJ tem expressão diferencial no desenvolvimento, apresentando uma clara modulação pelos hormônios morfogenéticos, sendo reprimido pela ecdisona.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aal, Y.A.I. & Hammock, B.D. (1985). Apparent multiple catalytic sites involved in the ester hydrolysis of juvenile hormones by the hemolymph and by an affinity-purified esterase from *Manduca sexta* Johannson (Lepidoptera: Sphingidae). *Arch. Biochem. Biophys.*, **243**: 206-219.
- Baker, F.C; Tsai, L.W.; Reuter, C.C.; Schooley, D.A. (1987). In vivo fluctuation of JH, JH acid, and ecdysteroid titer, and JH esterase activity, during development of fifth stadium *Manduca sexta*. *Insect Biochem.*, **17** : 989-996.
- Barchuk, A.R.; Bitondi, M.M.G.; Paulino-Simões, Z.L. (2002). Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *J. Insect Science*, **2**: 1.
- Barron, A.B.; Oldroyd, B.P.; Ratnieks, F.L.W. (2001). Worker reproduction in honey-bees (*Apis*) and the anarchic syndrome: a review. *Behavioral Ecol. Sociobiol.*, **50**: 199-208.
- Barth, R.H.; Lester, L.J.; Sroka, P.; Kessler, T.; Hearn, R. (1975). Juvenile hormone promotes dominance behavior and ovarian development in social wasps (*Polistes annularis*). *Experientia*, **31**: 691-692.
- Beetsma, J. (1979). The process of queen-worker differentiation in the honeybee. *Bee World*, **60**(1): 24-39.
- Bell, W.J. (1973). Factors controlling initiation of vitellogenesis in a primitively social bee, *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera:Halictidae). *Insects Sociaux*, **20**: 253-260.
- Bitondi, M.M.G. & Mestriner, M.A. (1983) Esterase isozymes of *Apis mellifera*: substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny, and electrophoretic variability. *Biochem. Genet.*, **21**: 985-1002.
- Bitondi, M.M.G.; Mora, I.M.; Paulino-Simões, Z.L.; Figueiredo, V.L. (1998). The *Apis mellifera* pupal melanization program is affected by treatment with a juvenile hormone analogue. *J. Insect Physiol.*, **44**: 499-507.
- Boleli, I.C.; Paulino-Simões, Z.L.; Bitondi, M.M.G. (1998). The stomogastric nervous system of the honey bee (*Apis mellifera*) in a critical phase of caste development. *J. Morphol.*, **236**: 139-149.
- Browder, M.H.; D'amico, L.J.; Nijhout, H.F. (2001). The role of low levels of juvenile hormone esterase in the metamorphosis of *Manduca sexta*. *J. Insect Sci.*, **1**(11): 1-5.

- Campbell, P.M.; Healy, M.J.; Oakshott, J.G. (1992). Characterization of juvenile hormone esterase in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **22**, 665-677.
- Campbell, P.M.; Harcourt, R.L.; Crone, E.J.; Claudianos, C.; Hammock, B.D.; Russel, R.J.; Oakeshott, J. G. (1998). Purification and kinetic characterization of juvenile hormone esterase from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **28**: 501-515.
- Campbell, P.M.; Harcourt, R.L.; Crone, E.J.; Claudianos, C.; Hammock, B.D.; Russel, R.J.; Oakeshott, J.G. (2001). Identification of a juvenile hormone esterase gene by matching its peptide mass fingerprint with a sequence from the *Drosophila* genome project. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **31**: 513-520.
- Cnaami, J.; Borst, D.W.; Huang, Z.Y.; Robinson, G.E.; Hefetz, A. (1997). Caste determination in *Bombus terrestris* : differences in development and rates of JH biosynthesis between queen and worker larvae. *J. Insect Physiol.*, **43**(4): 373-381.
- Coudron, T.; Dunn, A.P.; Seballos, H.L.; Wharen, R.E.; Sanmburg, L.L.; Law, J.H. (1981) Preparation of homogeneous juvenile hormone specific esterase from the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem.*, **11**: 453-461.
- de Kort, C.A.D. & Koopmanschap, A.B. (1986). High molecular weight transport proteins for JH-III in insect hemolymph. *Experientia*, **42** : 834-836.
- de Kort, C.A.D. & Koopmanschap, A.B. (1987). Specificity of binding of juvenile hormone III to hemolymph proteins of *Leptinotarsa decemlineata* and *Locusta migratoria*. *Experientia*, **43** :904-905.
- de Kort, C.A.D. & Koopmanschap, A.B (1989) Binding of juvenile hormone III to lipophorin from the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **11**: 159-172.
- de Kort, C.D.A. & Granger, N.A. (1996). Regulation of JH titers: The relevance of degradative enzymes and binding proteins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **33**: 1-26.
- de Kort, C.A.D. (1990). Thirty-five years of diapause research with the Colorado potato beetle. *Entomol. Exp. Appl.*, **56**:1-13 In: Vermunt, A.M.W.; Vermeesch, A.M.G.; de Kort, C.A.D. (1997). Purification and characterization of Juvenile Hormone Esterase from hemolymph of the Colorado Potato Beetle. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **35**: 261-277.

- de Wilde, J. & Beetsma, J. (1982). The physiology of caste development in social insects. *Adv. Insect Physiol.*, **16**: 167-256.
- Debernard, S.; Morisseau, C.; Severson, T.F.; Feng, L.; Wojtasek, H.; Prestwich, G.D.; Hammock, B.D. (1998). Expression and characterization of the recombinant juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH) from *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **28**: 409.
- Dedaj, S.; Hartfelder, K.; Aumeier, P.; Rosenkranz, P.; Engels, W. (1998). Caste determination is a sequential process : effect of larval age at grafting on ovariole number, hind leg size and cephalic volatiles in the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *J. Apicultural Res.*, **37**(3) : 183-190.
- Dias Neto, E.; Garcia Correa, R.; Verjovski-Almeida, S.; Briones, M.R.; Nagai, M.A.; da Silva, W.Jr.; Zago, M.A.; Bordin, S.; Costa, F.F.; Goldman, G.H.; Carvalho A.F.; Matsukuma, A.; Baia, G.S.; Simpson, D.H.; Brunstein, A.; de Oliveira, P.S.; Bucher, P.; Jongeneel, C.V.; O'Hare, M.J.; Soares, F.; Brentani, R.R.; Reis, L.F.; de Souza, S.J.; Simpson, A.J. (2000). Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**(7): 3491-6.
- Engels, W. & Hartfelder, K. (1999). Social insects, overview. *Encyclopedia Reprod.*, **4**: 498-507.
- Favaretto, V. F. (2003). Atividade da fosfatase ácida nos ovários, hemolinfa e corpo gorduroso durante a diferenciação de castas e metamorfose de *Apis mellifera*. Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Área: Biologia comparada.
- Feldlaufer, M.F.; Herbert, Jr.E.W.; Svoboda, J.A.; Thompson, M.J.; Lusby, W.R. (1985). Makisterone A: The major ecdysteroid from pupa of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem.*, **15**: 597-600.
- Feng, Q.L.; Ladd, T.R.; Tomkins, B.L.; Sundaram, M.; Sohi, S.S.; Retnakaran, A.; Davey, K.G.; Palli, S.R. (1999). Spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) juvenile hormone esterase: hormonal regulation, developmental expression and cDNA cloning. *Molec. Cell. Endocrinol.*, **148**: 95-108.
- Figueiredo, V.L.C.; Paulino-Simões, Z.L.; Bitondi, M.M.G (1996a). Developmental pattern of esterases in *Apis mellifera* L. honey bees. Stage-dependent changes of esterase isoenzymes in Africanized workers. *Apidologie*, **27**: 47-54.

- Figueiredo, V.L.C.; Bitondi, M.M.G.; Paulino-Simões, Z.L. (1996b). Esterase inhibition during several immature worker stages of *Apis mellifera* following topical application of DDVP insecticide. *J. Apicultural Res.*, **35**(1): 37-43.
- Fluri, P.; Lüscher, M.; Wille, H.; Gerig, L. (1982). Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titers of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *J. Insect Physiol.*, **28**: 61-68.
- Free, J.B. (1980). A organização social das abelhas (*Apis*). EPU: Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Gilbert, L.I.; Noelle, A.G.; Roe, R.M. (2000). The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **30**: 617-644.
- Goewie, E.A. & Beetsma, J. (1976). Induction of caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera* L.) after topical application of JH III. *Proc.Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenscha*, **79C**: 466-469.
- Gunawan, S. & Engelmann, F. (1984). Esterolytic degradation of adult juvenile hormone in the haemolymph of the adult female of *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem.*, **14**: 601-607.
- Halarankar, P.P.; Jackson, G.P.; Straub, K.M.; Schooley, D.A. (1993). Juvenile hormone catabolism in *Manduca sexta*: homologue selectivity of catabolism and identification of a diol-phosphate conjugate as a major end product. *Experientia*, **49**: 988-994.
- Hammock, B.D. (1985). Regulation of juvenile hormone titer: Degradation. *In*: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 2. Pergamon Press, New York, 431-472.
- Hanzlik, T.N. & Hammock, B.D. (1987). Characterization of affinity-purified juvenile hormone esterase from *Trichoplusia ni*. *J. Biol. Chem.*, **28**: 13584-13591.
- Hanzlik, T.N.; Abdell-Aal, Y.A.I.; Harshman, L.G.; Hammock, B.D. (1989). Isolation and sequencing of cDNA clones coding for juvenile hormone esterase from *Heliothis virescens*: evidence for a catalytic mechanism for the serine carboxylesterase. *J. Biol. Chem.*, **264**: 12419-12425.

- Hartfelder, K.; Tozetto, S.O.; Rachinsky, A. (1993). Sex-specific developmental profiles of juvenile hormone synthesis in honey bee larvae. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **202**: 176-180.
- Hartfelder, K.; Köstlin, K.; Hepperle, C. (1995). Ecdysteroid-dependent protein synthesis in caste-specific development of the larval honey bee ovary. *Roux's Arch. Devel. Biol.*, **205**: 73-80.
- Hartfelder, K. & Steinbrück, G. (1997). Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. *Invert. Reprod. Devel.*, **31(1-3)**: 237-250.
- Hartfelder, K. & Engels, W. (1998). Social insect polymorphism – hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honey bee. *Current Top. Dev. Biol.*, **40**: 45-77.
- Hartfelder, K. (2000). Insect juvenile hormone: from “status quo” to high society. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **33(2)**: 157-177.
- Hartfelder, K.; Bitondi, M.M.G.; Santana, W.C.; Paulino-Simões, Z.L. (2002). Ecdysteroid titer and reproduction in queens and workers of the honey bee and of a stingless bee: loss of ecdysteroid function at increasing levels of sociality? *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **32**: 211-216.
- Hinton, A.C. & Hammock, B.D. (2001). Purification of juvenile hormone esterase and molecular cloning of the cDNA from *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **32**: 57-66.
- Hirai, M.; Kamimura, M.; Kikuchi, K.; Yasukochi, Y.; Kiuchi, M.; Shinoda, T.; Shiotsuki, T. (2002). cDNA cloning and characterization of *Bombyx mori* juvenile hormone esterase: a inducible gene by the imidazole insect growth regulator KK-32. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **32**: 627-635.
- Huang, Z.Y.; Robinson, G.E.; Tobe, S.S.; Yagi, K.J.; Strambi, C.; Strambi, A.; Stay, B. (1991). Hormonal regulation of behavioral development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. *J. Insect Physiol.*, **37**: 733-741.
- Huang, Z.Y. & Robinson, G.E. (1992). Honeybee colony integration: worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**: 11726-11729.

- Ismail, S.M.; Satyanarayana, K.; Bradfield, J.Y.; Dahm, D.H.; Bhaskaran, G. (1998). Juvenile hormone acid: evidence for a hormonal fat body of the bean bug, *Riptortus clavatus* by mRNA differential display. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **28**: 181-189.
- Jassim, O.; Huang, Z.Y.; Robinson, G.E. (2000). Juvenile hormone profiles of worker honey bees, *Apis mellifera*, during normal and accelerated behavioral development. *J. Zool.*, **48**: 169-173.
- Jaycox, E.R.; Skowronek, W.; Gwynn, G. (1974). Behavioral changes in a worker honey bee (*Apis mellifera*) induced by injections of a juvenile hormone mimic. *Ann. Ent. Soc. Am.*, **67**: 529-534.
- Jaycox, E.R. (1976) Behavioral changes in worker honey bees (*Apis mellifera* L.) after injection with synthetic juvenile hormone (Hymenopter, Apidae). *J. Kans. Ent. Soc.*, **49**: 165-170.
- Jesudason, P.; Venkatech, K.; Roe, R.M. (1990). Haemolymph juvenile hormone esterase during the life cycle of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Insect Biochem.*, **20**: 593-604.
- Jones, G.; Venkataraman, V.; Ridley, B.; O'Mahony, P.; Turner, H. (1994). Structure, expression and gene sequence of a juvenile hormone esterase-related protein from metamorphosing larvae of *Trichoplusia ni*. *Biochem. J.*, **302**: 827-835.
- Kamikouchi, A.; Morioka, M.; Kubo, T. (2004). Identification of Honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex-and/or caste selective manner. *Zoological Science*, **21**: 53-62.
- Kamita, S.G.; Hinton, A.C.; Wheelock, C.E.; Wogulis, D.K.; Wilson, D.K.; Wolf, N.M.; Stok, J.E.; Hock, B.; Hammock, B.D. (2003). Juvenile hormone (JH) esterase: why are you so JH specific? *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **33**: 1261-1273.
- Kimura, K. & Trumam, J.W. (1990). Post-metamorphic cell-death in the nervous and muscular systems of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.*, **10**(2): 403-411.
- Kethidi, D.R.; Perera, S.C.; Zheng, S.; Feng, Q.; Krell, P.; Retnakaran, A.; Palli, S.R. (2004). Identification and characterization of a JH response region in the juvenile hormone esterase gene from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *JBC Papers in Press* - Manuscript M311647200.

- Koopmanschap, A.B. & de Kort, C.A.D. (1988). Isolation and characterization of a high molecular weight JH-III transport protein in the hemolymph of *Locusta migratoria*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **7**: 105-118.
- Kramer, K.J.; Dunn, P.E.; Peterson, R.C.; Seballos, H.L. (1976). Purification and characterization of the carrier protein for juvenile hormone from the haemolymph of the tobacco hornworm *Manduca sexta* Johansson. *J. Biol. Chem.*, **251**: 4979-4985.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I.B.; Nei, M. (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Laidlaw, H.H. (1992). The hive and the honey bee. Ed. Graham, J. M. Dadant, Hamilton, IL. pp. 84-89; 276-271.
- Lassiter, M.T.; Apperson, C.S.; Roe, R.M. (1995). Juvenile hormone metabolism during the fourth stadium and pupal stage of the Southern House Mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J. Insect Physiol.*, **41**, 869-876.
- Lassiter, M.T.; Apperson, C.S.; Roe, R.M. (1996). Juvenile hormone metabolism in the ovary, gut, head and carcass after blood feeding in the Southern House Mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **11**: 229-237.
- Lindauer, M. (1961). Communications among bees. Harvard, Univ. Press, Cambridge.
- McCaleb, D.C.; Reddy, G.; Kumaram, A.K. (1980). Some properties of the haemolymph juvenile hormone esterases in *Galleria mellonella* larvae and *Tenebrio molitor* pupae. *Insect Biochem.*, **10**: 273-277.
- Michellete, E.R.F.; Soares, A.E.E. (1993). Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, **24**: 431-440.
- Michener, C.D. (1969). Comparative social behavior of bees. *Ann. Review Entomol.*, **14**: 299-342.
- Michener, C.D. (1974). The social behavior of the bees: a comparative study. Cambridge, Mass., Harvard Univ. Press.
- Nijhout, H.F. & Wheeler, D.E. (1982). Juvenile hormone and physiological basis of insect polymorphism. *Quarterly Review Biol.*, **57**: 109-133.

- Nijhout, H.F. (1994). Insect hormones. Princeton University Press.
- Nussbaumer, C.A.; Hinton, A.C.; Schopf, A.; Stradner, A.; Hammock, B.D.(2000). Isolation and characterization of juvenile hormone esterase from the hemolymph of *Lymantria dispar* by affinity and by anion-exchange chromatography. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **30**: 307-314.
- Page, R.E. & Peng, Y.S. (2001). Aging in development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*, **36**: 365-711.
- Page, R.E.J. & Erber, J. (2002). Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. *Naturwissenschaften*, **89**: 91-106.
- Paulino-Simões, Z.L.; Boleli, I.C.; Hartfelder, K. (1997). Occurrence of a prothoracicotropic hormone-like peptide in the developing nervous system of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, **28**: 399-409.
- Pinto, L.Z.; Bitondi, M.M.G.; Paulino-Simões, Z.L.; (2000). Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *J. Insect Physiol.*, **46**: 153-160.
- Pinto, L.Z.; Hartfelder, K.; Gentile-Bitondi, M.M.; Paulino-Simões, Z.L. (2002). Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J. Insect Physiol.*, **48**: 783-790.
- Rachinsky, A. & Hartfelder, K. (1990). Corpora allata activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titre in honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). *J. Insect Physiol.*, **66**, 189-194.
- Rachinsky, A.; Strambi, C.; Strambi, A.; Harfelder, K. (1990). Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honey bee larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **79**: 31-38.
- Rachinsky, A. (1994). Octopamine and serotonin influence on corpora allata activity in honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *J. Insect Physiol.*, **40**: 549-554.
- Rachinsky, A. & Engels, W. (1995). Caste development in honey bees (*Apis mellifera*): juvenile hormone turns on ecdysteroids. *Naturwissenschaften*, **82**: 378-379.

- Rachinsky, A. & Hartfelder, K. (1998). In vitro biosynthesis of juvenile hormone in larval honey bees: comparison of six media. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, **34**: 646-648.
- Rachinsky, A.; Tobe, S.S.; Feldlaufer, M.F. (2000). Terminal steps in JH biosynthesis in the honey bee (*Apis mellifera* L.): developmental changes in sensitivity of JH precursor and allatotropin. *Insect Bioch. Mol. Biol.*, **30**: 729-737.
- Ratnieks, F.L.W. (1993). Egg-laying, egg-removal, and ovary development by workers in queenright honey bee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **32**: 191-198.
- Reginato, R.D. & Cruz-Landim, C. (2001). Differentiation of the worker's ovary in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) during life of the larvae. *Invertebrate Reprod. Devel.*, **39**(2): 127-134.
- Reginato, R.D. & Cruz-Landim, C. (2002). Morphological characterization of cell death during the ovary differentiation in worker honey bee. *Cell Biol. Internat.*, **26**(3): 1193-1202.
- Rembold, H.; Czoppelt, C.; Rao, P.J. (1974). Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.*, **20**: 1193-1202.
- Rembold, H.; Karmer, J.P.; Ulrich, G.M. (1980). Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* **11**: 29-38.
- Rembold, H. (1987). Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* **17**: 1003-1006.
- Rembold, H.; Czoppelt, C.; Grüne, M.; Lackner, B.; Pfeffer, J.; Woker, E. (1992). Juvenile hormone titers during honey bee embryogenesis and metamorphosis. *In: Insect Juvenile Hormone Research, Fundamental and Applied Approaches* (Eds. Mauchamp B., Couillaud F. and Baehr J.C.), Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. pp. 37-43.
- Riddiford, L.M. (1980). Interactions of ecdysteroids and juvenile hormone in the regulation of larval growth and metamorphosis of the tobacco hornworm. *In: Hoffman, J.A. (Ed), Recent Advances in Comparative Arthropod Morphology, Physiology, and Development*, vol. 1. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ, 127-179.

- Riddiford, L.M. (1996). Juvenile hormone: the status of it status quo action. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **32**: 271-286.
- Robinson, G.E. (1985). Effects of a juvenile hormone analogue on the ontogeny of honey bee foraging behaviour and alarm pheromone production. *J. Insect Physiol.*, **31**: 277-282.
- Robinson, G.E. (1987). Regulation of the honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **120**: 329-338.
- Robinson, G.E.; Strambi, A.; Strambi, C.; Paulino-Simões, Z.L.; Tozetto, S.O.; Barbosa, J.M.N. (1987). Juvenile hormone titers in European and Africanized honey bees in Brazil. *General Comparat. Endocrinol.*, **66**:457-459.
- Robinson, G.E.; Page, R.E.; Strambi, C.; Strambi, A. (1989). Hormonal behavioral variation in worker oviposition, oophagy, and larval care in queenless honey bee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **26**: 315-323.
- Robinson, G.E.; Strambi, C.; Strambi, A.; Feldlaufer, M.F. (1991). Comparison of juvenile hormone and ecdysteroid titers in adult worker and queen honey bees (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.*, **37**: 929-935.
- Robinson, G.E.; Strambi, C.; Strambi, A.; Huang, Z.Y. (1992). Reproduction in worker honey bees is associated with low juvenile hormone titers and rates of biosynthesis. *General Comparat. Endocrinol.*, **87**: 471-480.
- Roe, R.M.; Crawford, C.L.; Clifford, C.W.; Woodring, J.P.; Sparks, T.C.; Hammock, B.D. (1987). Characterization of the juvenile hormone esterases during embryogenesis of the house cricket, *Acheta domesticus*. *Int. J. Invert. Rep. Dev.*, **12**: 57-72.
- Roe, R.M. & Venkatesh, K. (1990). Metabolism of juvenile hormones: degradation and titer regulation. In: Rutgers, G. A. (Ed.), *Morphogenetic Hormones of Arthropods*, vol. 1. University Press, New Brunswick, pp. 126-179.
- Roe, R.M., Anspaugh, D.D., Venkatesh, K., Linderman, R.J., Graves, D.M. (1997). A novel germinal diol as a highly specific and stable in vivo inhibitor of insect juvenile hormone esterase. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **36**: 165-179.
- Rudnicka, M. & Kochman, M. (1984). Purification of the juvenile hormone esterase from the haemolymph of the wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Insect Biochem.*, **14**: 189-198.

- Sanburg, L.L.; Kramer, K.J.; Kezdy, F.J.; Law, J.H. (1975a). Juvenile hormone-specific esterases in the haemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.*, **21**: 873-887.
- Sanburg, L.L.; Kramer, K.J.; Kezdy, F.J.; Law, J.H.; Oberlander, H. (1975b). Role of juvenile hormone esterases and carried proteins in insect development. *Nature*, **253**: 266-267.
- Sasagawa, H.; Sasaki, M.; Okada, I. (1985). Experimental induction of the division of labor in worker *Apis mellifera* L. by juvenile hormone (JH) and its analog. In: Huang, Z.Y; Robinson, G.E.; Tobe, S.S.; Yagi, K.J.; Strambi, C.; Strambi, A.; Satay, B. (1991). Hormonal regulation of behavioral development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. *J. Insect Physiol.*, **37**: 733-741.
- Schmidt-Capella, I.C. & Hartfelder, K. (1998). Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J. Insect Physiol.*, **44**:385-391.
- Schmidt-Capella, I.C. & Hartfelder, K. (2002). Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of larval honey bee ovary. *Cell Tissue Res.*, **307**: 265-272.
- Schwartz, L.M.; Smith, S.W.; Jones, M.E.E.; Osborne, B.A. (1993). Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**: 980-984.
- Shiotsuki, T.; Yukuhiro, F.; Kiuchi, M. (1999). Effect of 1-(4-phenoxyphenoxypropyl) imidazole (KS-175) on larval growth in the silkworm *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **45**: 1049-1055.
- Shiotsuki, T.; Bonning, B.C.; Hirai, M.; Kikuchi, K.; Hammock, B.D. (2000). Characterization and affinity purification of juvenile hormone esterase from *Bombyx mori*. *Biochem. Biotech. Biosci.*, **64**: 1681-1687.
- Snodgrass, R.E. (1984). Anatomy of the honey bee. Cornell University Press Ltd., London. pp. 280-289.
- Stoltzman, C.A.; Stocker, C.; Borst, D.; Stay, B. (2000). Stage-specific production and release of juvenile hormone esterase from the ovary of *Diploptera punctata*. *J. Insect Physiol.*, **46**: 771-782.

- Thomas, B.A.; Hinton, A.C.; Moskowitz, H.; Severson, T.F.; Hammock, B.D. (2000). Isolation of juvenile hormone esterase and its partial cDNA clone from the beetle, *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **30**: 529-540.
- Tobe, S.S. & Stay, B. (1985). Structure and regulation of the corpus allatum. *Adv. Insect Physiol.*, **18**: 305-432.
- Touhara, K. & Prestwich, G.D. (1994). Role of juvenile hormone binding protein in modulating function of JH epoxide hydrolase in eggs of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **24**: 641-646.
- Touhara, K.; Bonning, B.C.; Hammock, B.D.; Prestwich, G.D. (1995). Action of juvenile hormone (JH) esterase on the JH - JH binding protein complex. In vitro model of JH metabolism in a caterpillar. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **25**: 727-734.
- Tozetto, S.O. (1997). Hormonelle Steuerung in der Entwicklung von Drohnen (*Apis mellifera carnica*). Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors, Erberhard-Karls Universität Tübingen, 1222pp.
- Trautmann, K.H.; Masner, P.; Schuler, A.; Suchi, M.; Wipf, H.K. (1974). Evidence of the JH methyl (20E, 6E-10,11-epoxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadienoate (JH-III)) in insects of 4 order. *Z. Naturforsch.* **29c**: 161-168.
- Valaitis, A.P. (1991). Characterization of hemolymph juvenile hormone esterase from *Lymantria dispar*. *Insect Biochem.*, **21**: 583-595.
- Valaitis, A.P. (1992) Use of concanavalin A in the purification of juvenile hormone esterase from the hemolymph and the fat body of *Lymantria dispar*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **22**: 639-648.
- Venkatesh, K.; Abdel-Aal Y.A.I.; Armstrong, F.B.; Roe, R.M. (1990). Characterization of affinity-purified juvenile hormone esterase from the plasma of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.*, **256**: 21727-21732.
- Vermunt, A.M.W.; Koopmanschap, A.B.; De Kort, C.A.D. (1997) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a putative juvenile hormone esterase from the Colorado potato beetle. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **27**: 919-928.
- Vermunt, A.M.W.; Koopmanschap, J.M.; Vlak, J.M.; de Kort, C.A.D. (1999). Expression of the juvenile hormone esterase gene in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: photoperiodic and juvenile hormone analog response. *J. Insect Physiol.* **45**: 135-142.

- Ward, V.K.; Bonning, B.C.; Huang, T.L.; Shiotsuki, T.; Griffeth, V.N.; Hammock, B.D. (1992). Analysis of the catalytic mechanism of juvenile hormone esterase by site-directed mutagenesis. *Int. J. Biochem.*, **24**: 1933-1941.
- Weirich, G.; Wren, J.; Sidall, J.B.; (1973). Developmental changes of the juvenile hormone esterase activity in haemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem.*, **3**: 397-407.
- Wheeler, D.E. (1986). Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. *American Naturalist*, **128**: 13-34.
- Winston, M.L. (1987). The biology of the Honey Bee. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Wroblewski, V.J.; Harshman, L.G.; Hanzlik, T.N.; Hammock, B.D. (1990). Regulation of juvenile hormone esterase gene expression in the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). *Arch. Biochem. Biophys.*, **278** : 461-466.
- Yamashita, O.; Kadono-Okuda, K.; Kuwano, E.; Eto, M. (1987). A imidazole compound as a potent anti-ecdysteroid in an insect. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2295-2297.
- Zera, A.J.; Gu, X.; Zeisset, M. (1992). Characterization of juvenile hormone esterase from genetically-determined wing morphs of the cricket, *Gryllus rubens*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **22**: 829-839.
- Zera, A.J.; Sanger, T.; Hanes, J.; Harshman, L. (2002). Purification and characterization of hemolymph Juvenile Hormone Esterase from the cricket, *Gryllus assimilis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **49**: 41-55.