Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Genética

Desenvolvimento diferencial casta-específico das pernas posteriores de *Apis mellifera*

Ana Durvalina Bomtorin

Ribeirão Preto
– 2009 –

Ana Durvalina Bomtorin

Desenvolvimento diferencial casta-específico das pernas posteriores de *Apis mellifera*

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

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

Ribeirão Preto
– 2009 –

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

BOMTORIN, ANA DURVALINA

Desenvolvimento diferencial casta-específico das pernas posteriores de *Apis mellifera*. Ana Durvalina Bomtorin; orientadora: Zilá Luz Paulino Simões – Ribeirão Preto, 2009.

86p.:24il.

Dissertação, de mestrado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Genética

1. Apis mellifera. 2. Polifenismo. 3. Genes diferencialmente expressos. 4. Corbícula. 5. Castas

A meus pais, Adetagine Meneguette Bomtorin e

Maria Aparecida S. dos Santos Bomtorin, que são a

base de minha formação e fonte de inspiração

de como me tornar um ser humano melhor

...a cada dia...

... Dedico...

AGRADECIMENTOS

Neste momento tão importante da minha vida, quero registrar meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma maneira me ajudaram para que eu pudesse chegar ao final. Agradeço

- ✓ À Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões pela orientação, amizade, carinho e paciência ao longo desde anos todos e também pela oportunidade de poder fazer parte de seu grupo de trabalho;
- ✓ Ao Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk, meu co-orientador, pela amizade, paciência, solicitude e, claro, seu eterno bom-humor;
- ✓ A Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi pela amizade, carinho e ajuda;
- ✓ Ao Prof. Dr. Klaus Hartfelder pelas conversas sobre a biologia do desenvolvimento e as abelhas;
- ✓ Aos professores Dr. Lionel Segui Gonçalves e Dr. David de Jong, e em especial, ao Dr. Ademilson Espencer Soares (coordenador da pós-graduação) pela amizade e atenção desde que cheguei ao laboratório;
- ✓ À Profa. Dra. Ana Maria Bonetti pela amizade, carinho e ensinamentos;
- ✓ À Vera L. C. Figueiredo, também carinhosamente chamada "Vó", pela incansável ajuda todos os dias;
- ✓ À Marcela Ap. F. B. Laure pela amizade, alegria e suas perfeitas dissecções dos discos imaginais;
- ✓ Aos técnicos em apicultura Adelino Penatti, Jairo Souza e, em especial, ao Luis Aguiar pela amizade e ajuda com as abelhas;
- ✓ Ao Departamento de Biologia Celular e Molecular de Bioagentes Patogênicos pelos microscópios confocal e varredura
- ✓ Ao Departamento de Química – FFCLRP/USP pelo Microscópio Eletrônico de Varredura;
- ✓ Ao Dr. Robert A. White pelo anticorpo FP6.87 cedido;
- ✓ À minha família, que me apóia muito, especialmente meus pais, duas pessoas incríveis;
- ✓ Aos amigos de laboratório, que muito me ensinaram, mas que agora estão em algum lugar do mundo exercendo sua profissão, Érica Tanaka, Anete Lourenço, Karina Guidugli, Alexandre Cristino, Rogério Pereira e o meu irmão Weyder Santana;
- ✓ Ao Tiago Francoy, também chamado "Peludito", que é agora o Prof. Dr. Tiago, pela grande amizade e pela mão sempre estendida, disposto a ajudar a qualquer hora;
- ✓ Ao Rodrigo I. Marques dos Santos, querido "Super", pela imensa alegria e grande amizade;

- ✓ A amiga que “surgiu “na minha vida como se eu a conhecesse desde criança, Adriane Feijó Evangelista, querida “Feijão”, pelas risadas diárias e apoio nos momentos de decisão;
- ✓ Aos meus dois “irmãos de coração”, Luciana Marques e Alexandre Boer, que fazem muita falta no meu dia-a-dia;
- ✓ Aos queridos amigos e amigas pelos momentos de alegria no laboratório tornando o trabalho diário mais prazeroso, Fernanda Torres, Michelle Prioli, Mônica Florecki, Adriana Mendes, Carlos Lobo, Liliane Macedo, Moysés Elias, Rodrigo D’allaqua, Flávia Cristina Tathyana Mello, Omar Martinez, Mipsi Cristina, Aline Aleixo em especial ao Francis Nunes pelos conselhos;
- ✓ Aos amigos do Bloco A e Apilab Paulo Emílio, Amanda Assis, Aline Mackert, Juliana Martins, André Micas, David Marco Antonio, Ivan Akatsu, Ana Rita, Camila Dias, Sérgio Azevedo, Marina, Daiana Miranda, Vanessa, Mauro Prato e a Camila Maia;
- ✓ Aos meus eternos amigos Micheli Ferrari (Tia), Marina Fonseca (Skol), José Marcos (Zé), Mariana do Valle (Hema) e Wesley pelo companheirismo e apoio;
- ✓ A Vanessa Bonatti, estagiária e acima de tudo amiga que conheci graças ao meu co-orientador com quem aprendi muito;
- ✓ Ao Departamento de Genética e ao Programa de pós–graduação em Genetica pela oportunidade de aprendizado e especialmente `as secretárias, Maria Aparecida Oliveira Silva Elias e Susie Adriana Penha Nalon;
- ✓ A FAPESP pelo apoio financeiro.

" Nunca te é concedido um desejo sem que te seja concedida

também a faculdade de torná-lo realidade. Entretanto,

é possível que tenhas que lutar por ele."

(Richard Bach)

RESUMO

Bomtorin, AD. Desenvolvimento diferencial casta-específico das pernas posteriores de *Apis mellifera*. 2009. 86pp Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. SP, 2009.

A diferenciação morfo-fisiológica entre rainhas e operárias de *Apis mellifera* decorre da alimentação recebida durante o desenvolvimento larval, que estimula o aumento da produção de Hormônio Juvenil nas larvas que originarão rainhas. Dentre as diversas diferenças morfológicas entre operárias e rainhas encontram-se estruturas especializadas para a coleta de pólen e própolis, localizadas na região da tíbia e do basitarso das pernas posteriores de operárias. A diferenciação das pernas tem início entre o quarto e o quinto estágio do desenvolvimento larval. Utilizando-se Microscopia Eletrônica de Varredura o presente trabalho relata a presença das cerdas formando as estruturas casta-específicas na fase de pupa de olho marrom. A partir de estudos de hibridação de *microarrays* de cDNA com amostras de RNA de *A. mellifera* de diversas fases do desenvolvimento larval, foram encontrados 91 genes com ortólogos conhecidos em *Drosophila*, diferencialmente expressos entre rainhas e operárias no período crítico da diferenciação de castas. Destes, cinco estão relacionados com o desenvolvimento de apêndices: *ataxin-2* (*atx-2*), *cryptocephal* (*crc*), *dachshund* (*dac*), *grunge* (*gug*) e *Retinoic and fat acid Binding Protein* (*RfaBP*). O perfil destes genes, e ainda, *ultrabithorax* (*ubx*), *distal-less* (*dll*) e *abdominal-A* (*abd-A*) (estes por suas suas funções durante a diferenciação das pernas de insetos) foram analisados por RT-PCR em Tempo Real em pernas posteriores de operárias e rainhas desde o quarto estágio larval até o estágio de pupa de olho branco. Apenas *ubx* e *abd-A* foram encontrados mais expressos em operárias ao final do desenvolvimento larval e início do desenvolvimento pupal. Estudos similares dos genes *abd-A*, *dac*, *dll* e *ubx* nos segmentos das pernas de pupas de olho branco indicam a tíbia como domínio de expressão de *dac*. Imunolocalizações utilizando um anticorpo contra um epitopo conservado entre Ubx e Abd-A, FP6.87, em pernas posteriores de pré-pupas de operárias e rainhas revelam a presença destas proteínas na tíbia apenas de operárias e diferencialmente localizadas no basitarso de operárias e rainhas. Os dados acima apresentados apontam Ubx, um gene Hox, como ponto-chave na regulação da formação das estruturas casta-específicas.

ABSTRACT

Bomtorin, AD. Differential hind leg development in *Apis mellifera* castes. 2009. 86 pp. Master of Science Thesis. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil. 2009.

Diphenism in the honey bee, *Apis mellifera*, results from differential feeding of female larvae. Among the morphological differences, the hind legs of workers have structures that is used for carrying pollen and propolis, e.g. the corbicula, while the queen's hind legs lack this structures. The corbicula is an expanded region of the tibia deprived of bristles, which has a single bristle in the middle that seems to have a sensorial function. Using scanning electronic microscopy, we found that the leg structures and bristles of the corbicula are already formed in brown-eyed pupa. Microarray analysis has demonstrated that five of 240 differentially-expressed genes in developing castes are potentially related to the caste differences in leg development (*ataxin-2*, *cryptocephal*, *dachshund, grunge* and *Retinoic and fat acid Binding Protein*). Using qPCR, we analyzed the expression of *abdominal-A*, *ataxin-2*, *cryptocephal*, *grunge, Retinoic and fat acid Binding Protein* and *ultrabithorax* genes during hind leg development. *cryptocephal*, *ataxin-2*, *grunge* and *Retinoic and fat acid Binding Protein* genes, which are involved in imaginal disc elongation and bristle formation and are inhibited by juvenile hormone, were not found to be differentially expressed. However, *ultrabithorax* and *abdominal-A* are over expressed in workers in the early pupal stage. By using immunohistochemistry, Ubx was localized in the tibia and basitarsus of pre-pupae of workers and in the basitarsus of pre-pupae of queens. The pattern of Ubx expression suggests that this Hox gene is a key player in leg structures formation and caste differentiation in *A. mellifera*.

Lista de Figuras

Figura 1: Diferentes momentos do desenvolvimento das pernas dos insetos. 6

Figura 2: Linha do tempo resumindo os eventos importantes no desenvolvimento de pernas de *Drosophila***.** Modificado de Angelini e Kaufman, 2005. 9

Figura 3: Alinhamento das proteínas UBX e ABD-A.. 24

Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura de pernas posteriores de pupas de olho marrom de operárias e rainhas de *A. mellifera.* 26

Figura 6: Localização dos domínios conservados encontrados nas seqüências gênicas de *A. mellifera* analisadas neste trabalho.. 31

Figura 7: Alinhamento de seqüências feito pelo programa NCBI *Conserved Domain Search* 32

Figura 8: Perfil de expressão dos genes *abdominal-A*, *ataxina-2*, *cryptocephal, dachshund*, *distal-less*, *grunge, Retinoic and Fat acid Binding Protein* e *ultrabithorax* durante o desenvolvimento das pernas posteriores de operárias e rainhas de *A. mellifera*, por RT-PCR em Tempo Real. 36

Figura 11: Alinhamento seqüências de UBX por ClustalX 42

Figura 18: Busca por "proteínas secretadas não-clássicas" nas seqüências de diferentes insetos, utilizando o programa SecretomeP. 52

Figura 19: Comparação entre os perfis de expressão de *cryptocephal* nos discos imaginais das pernas posteriores e os títulos de ecdisteróides circulantes na hemolinfa ao longo do desenvolvimento de operárias e rainhas de *A. mellifera* 56

Figura 20: Comparação entre os perfis de expressão de *Retinoic and fat acid Binding Protein* nos discos imaginais das pernas posteriores e os títulos de Hormônio Juvenil circulantes na hemolinfa ao longo do desenvolvimento de operárias e rainhas de *A. mellifera* 58

Figura 21: Inibição de *distal-less* (*dll*) por Ultrabithorax (Ubx) 61

Figura 22: Representação esquemática dos domínios de Ultrabithorax de *A. mellifera* descritos por Galant e Carroll, 2002 65

Figura 23: Alinhamento da proteína Ultrabithorax de *A. mellifera* e seu ortólogo HoxC8 em camundongo 67

Figura 24: Representação esquemática do modelo proposto para a diferenciação de pernas posteriores em *A. mellifera* 71

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) e pupal (P) de operárias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas.. 15

Tabela 2: Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) e pupal (P) de rainhas de abelhas européias, *Apis mellifera carnica* (modificado de Rembold *et al.*, 1980). 16

Tabela 3: Seqüência dos *primers* utilizados em RT-PCR em Tempo Real. 20

Tabela 4: Eficiência e valores de *Slope* e R2 dos *primers* utilizados para RT-PCR em Tempo Real. 21

Tabela 5: Relação dos domínios conservados da proteínas analisadas, número de acesso no *Official gene set* (GB), tamanho da proteína (em aminoácidos) e grupo de ligação do gene em *A. mellifera*. 29

Sumário

1. Introdução 1
1.1. Hormônio Juvenil e o polifenismo em abelhas 1
1.2. O desenvolvimento das pernas dos insetos 4
1.3. A regulação gênica do desenvolvimento das pernas 7
1.4. Os genes Hox e a identidade dos apêndices dos insetos 10
1.5. Determinação dos mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento diferencial das pernas de fêmeas de *A. mellifera* 11
2. Objetivos 13
2.1. Objetivos gerais 13
2.2. Objetivos específicos 13
3. Material e métodos 14
3.1. Material biológico - obtenção de abelhas, discos imaginais e pernas 14
3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura 17
3.3. Obtenção e análises in silico das seqüências gênicas 18
3.4. Estudos de expressão gênica por RT-PCR em Tempo Real 19
3.4.1. Extração de RNA total e síntese do cDNA 19
3.4.2. A RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR) 19
3.4.3. Padronização dos primers para os experimentos de PCR em Tempo Real 20
3.4.4. Seqüenciamento dos fragmentos obtidos 22
3.4.5. Análises estatísticas 22
3.5. Imunohistoquímica de UBX e ABD-A 23
4. Resultados 25
4.1. Morfologia diferencial de caracteres externos de pernas posteriores de abelhas 25
4.2. Análises in silico dos genes e produtos protéicos de *abd-A*, *atx-2*, *crc*, *dac*, *dll*, *gug*, *RfaBP* e *ubx* 27
4.3. Quantificação de transcritos por RT-PCR em Tempo Real 33
4.3.1. Perfis de expressão gênica ao longo do desenvolvimento das pernas posteriores de fêmeas 33
4.3.2. Perfil de expressão gênica nos diferentes segmentos das pernas de operárias Pw 37
4.4. Análises in silico da seqüência de Ubx 39
4.5. Localização das proteínas Ubx e Abd-A nas pernas de pré-pupas de abelhas 43
4.6. Busca de regiões secretoras em Ubx 51
5. Discussão 53

5.1. Sobre a expressão de *atx-2*, *crc*, *RfaBp*, *gug* e *dac* durante o desenvolvimento de pernas posteriores em castas de abelhas melíferas 53
5.2. Sobre o controle da expressão de dll por Ubx durante o desenvolvimento de pernas posteriores em castas de abelhas 59
5.3. A função de Ubx na determinação do desenvolvimento diferencial das pernas posteriores de *A. mellifera* 62
5.4. A localização de Ubx fora do núcleo em pernas de pré-pupas de rainhas de *A. mellifera.* 65
5.5. Controles extrínsecos do desenvolvimento das pernas posteriores em abelhas 68
6. Conclusões e considerações finais 72
7. Referências Bibliográficas 73

1. Introdução

1.1. Hormônio Juvenil e o polifenismo em abelhas

As abelhas *Apis mellifera* (Apidae, Apinae, Apini) são insetos eussociais da ordem dos Hymenoptera, haplodiplóides. As fêmeas (rainhas e operárias) se originam a partir de ovos fecundados (diplóides) e os machos (zangões) de ovos não fecundados (haplóides) (revisado por Winston, 1987). Operárias e rainhas desenvolvem-se a partir de ovos com o mesmo potencial genético e a diferenciação de castas é dada por um estímulo trófico diferencial durante o desenvolvimento larval. Inicialmente, as larvas de fêmeas são alimentadas com geléia real. A partir do terceiro estágio, as larvas que originarão rainhas continuam recebendo geléia real, enquanto as larvas que originarão operárias são alimentadas com uma mistura de mel, pólen e geléia real (Michener, 1969; revisado por Free, 1980).

Apesar de não estar claro como essa informação trófica é interpretada, sabe-se que a alimentação com geléia real provoca uma série de reações, entre elas, o aumento da síntese de Hormônio Juvenil (HJ) pelos *corpora allata* (CA), que são um par de glândulas localizadas no complexo retrocerebral (Nijhout & Wheeler, 1982; Wheeler, 1986; Rembold, 1987; Rachinsky & Hartfelder, 1990). Uma das possibilidades é que as informações de qualidade e quantidade do alimento sejam transmitidas via sistema nervoso estomatogástrico da larva, o qual está diretamente conectado ao sistema endócrino através do nervo recorrente. Essa hipótese está baseada no fato dessa via terminar perto das células serotoninérgicas, localizadas próximas aos CA, e assim, aminas biogênicas estimulariam a síntese de HJ nos CA (Boleli *et al*., 1998).

Os CA estão sob controle da via de insulina/Insulin Growth Factor (IGF), como sugerido para *Drosophila* (Brogiolo *et al*., 2001). A maior expressão de genes ativados pela concentração de

aminoácidos, abundantes na geléia real, entre eles o gene *TOR* (*Target of Rapamycin*) de larvas que estão se desenvolvendo em rainhas, levaria a um aumento do tamanho do corpo e à formação de características casta-específicas (Patel *et al*., 2007; Barchuk *et al*., 2007). Sugere-se também que a maior expressão de *cryptocephal* (*crc*) e *cellular repressor of E1A-stimulated genes* (*creg*) encontrada em operárias esteja relacionada à formação de indivíduos menores, constituindo, possivelmente, em um segundo determinante para esse sistema de crescimento diferencial do corpo em resposta a diferentes alimentações (Barchuk *et al*., 2007).

Experimentos com abelhas sem ferrão e *A. mellifera* mostraram que a aplicação de HJ em larvas induz o desenvolvimento de características próprias de rainhas (Wirtz & Beetsma, 1972; Velthuis & Velthuis-Kluppell, 1975; Campos *et al.*, 1975). Isto mostra que a determinação do desenvolvimento casta-específico obedece a sinais hormonais (HJ e ecdisteróides) gerados por determinantes iniciais, independentes da origem, por exemplo, alimentação, determinação genética ou por influências de ferômonios (Kerr *et al.*, 1975; Evans & Wheeler, 2001; Bloch *et al.*, 2001).

De maneira semelhante à diferenciação de castas, presente em insetos eussociais, os besouros *Onthophagus taurus* – família Scarabaeidae – também apresentam polifenismo alternativo, com chifres ausentes em fêmeas e de diferentes tamanhos em machos, sendo o desenvolvimento do disco imaginal (vide detalhes no item 1.2) do chifre dependente do sexo e da alimentação durante o período larval. Nesses organismos, há dois momentos críticos durante o terceiro estágio larval, nos quais os hormônios parecem influenciar o crescimento dos chifres. O primeiro momento ocorre próximo ao final da fase de alimentação, quando interações entre HJ e ecdisona controlam o destino das células do chifre (Emlen & Nijhout, 2001; Moczek & Nijhout, 2002). No segundo momento, quando as larvas pararam de se alimentar, as células dos discos imaginais se proliferam rapidamente como se estivessem sob o controle das vias de insulina ou outros sinais circulantes (Emlen *et al.*, 2006).

Dentre as inúmeras diferenças morfológicas entre rainhas e operárias de *A. mellifera* notam-se: maior quantidade de ovaríolos em rainhas, i.e., desenvolvimento do sistema reprodutivo (Michener, 1974); as relações entre tamanho total do cérebro/tamanho do corpo e volume dos corpos cogumelares/volume do cérebro são notavelmente maiores em operárias (Lucht-Bertram, 1962; Michener, 1974); a presença de corbícula e outras estruturas especializadas na coleta de pólen e própolis nas pernas de operárias (Snodgrass, 1956). Devido a esse polifenismo apresentado pelas fêmeas de abelhas, as atividades de manutenção e proliferação de uma colônia de *A. mellifera* são divididas entre as operárias e a rainha, a qual detém a função de reprodução, sendo as demais tarefas de cuidado com a colônia, desempenhadas pelas operárias. As relações entre morfologia e divisão de trabalho reprodutivo têm sido muito estudadas nas abelhas melíferas, especialmente em relação ao desenvolvimento de ovários (Tanaka & Hartfelder, 2004).

O desenvolvimento diferencial dos apêndices é outra característica importante para estudos de diferenciação de castas. Dentre eles está o par de pernas posteriores, onde se localizam estruturas relativas à coleta de pólen e própolis, que são encontradas exclusivamente em operárias. Essas estruturas (corbícula, prensa-pólen, pente-de-pólen e escova-de-pólen) estão localizadas na tíbia e no basitarso do terceiro par de pernas (Figura 1). O prensa-pólen, o pente e a escova-de-pólen são estruturas formadas por cerdas, que servem para prensar o pólen na corbícula, a qual (estrutura característica dos Apidae) é formada por cerdas longas e curvas e um espaço dentre estas, localizada na face exterior da tíbia, a qual transporta pólen ou própolis (Snodgrass, 1956; Michener, 1974).

1.2. O desenvolvimento das pernas dos insetos

Os apêndices dos insetos são classificados como: dorsais (asas e halteres) e ventrais (pernas, antenas, genitália e aparelho bucal). Os dorsais são os únicos não segmentados, enquanto os ventrais, característicos de Arthropoda, consistem de diversos segmentos conectados por juntas. Apesar de serem muito diferentes em sua aparência e função, os apêndices são considerados como derivados de apêndices de um ancestral comum. Tal constatação baseia-se em análises histórico-anatômicas (Snodgrass, 1956), descobertas de mutações homeóticas que transformaram um apêndice em outro (Gehring, 1966; Estrada & Sanches-Herrero, 2001) e recentes estudos de mecanismos moleculares do desenvolvimento das pernas (Kojima, 2004). Dentre os apêndices, as pernas são as que menos divergiram nos Arthropoda, consistindo basicamente de seis segmentos ao longo do eixo próximo-distal (PD): coxa, trocanter, fêmur, tíbia, tarso e pré-tarso (Snodgrass, 1956).

Assim como a maioria dos tecidos adultos dos insetos holometábolos, as pernas são formadas a partir de discos imaginais (Cohen, 1993; Fristom & Fristom, 1993). Essas estruturas são, inicialmente, uma dobra da ectoderme, que se invagina durante a embriogênese, composta por uma lâmina de uma única camada de células epiteliais. Os discos imaginais são em forma de saco, (Figura 1) e nomeados de acordo com a estrutura que darão origem no adulto, p.ex., o disco que dará origem à perna chama-se disco imaginal da perna, etc. (Cohen, 1993; Fristom & Fristom, 1993).

Em *Drosophila*, os discos imaginais das pernas são formados inicialmente por somente 10-30 células, aumentando para mais de 10.000 durante o segundo e terceiro estágios larvais. Com o início do terceiro estágio, o disco começa a ser moldado concentricamente até que não pareça mais uma superfície plana, embora ainda seja constituído por uma única camada de células (Condic *et al.*, 1991; Fristom & Fristom, 1993). Essa subdivisão é decorrente de uma seqüência hierárquica de sinais espaciais que difundem célula a célula. Diferentes domínios de expressão de proteínas se sobrepõem parcialmente criando um mosaico de regiões distintas (Emlen, *et al.*, 2006).

Dentro do disco epitelial, interações entre sinais iniciam e coordenam programas de expressão gênica e comportamento celular. O resultado é uma cascata de interações gênicas autônomas, tanto que cada série de expressão gênica é suficiente para induzir a próxima (Emlen, *et al.*, 2006). Esse complexo sistema de expressão gênica é capaz de definir o posicionamento e a identidade de cada apêndice no corpo; formar os eixos ântero-posterior (AP), próximo-distal (PD) e dorso-ventral (DV) dos apêndices; dar identidade aos segmentos das pernas e definição das juntas destes; e desenvolver estruturas internas e externas aos apêndices (Kojima, 2004).

Os discos imaginais das pernas se alongam durante o estágio pupal para formar a delgada perna do adulto por rearranjos celulares, assemelhando-se a um telescópio (Condic *et al.*, 1991; Fristom & Fristom, 1993). Conseqüentemente, o centro do disco da perna corresponde ao segmento distal na estrutura do adulto (Figura 2F-G).

O desenvolvimento dos discos imaginais dos insetos é governado por dois mecanismos, aparentemente independentes. Um intrínseco, supracitado, e outro, dependente de fatores externos, como a nutrição, que ativam vias paralelas como a de insulina e a de TOR, como o controle do desenvolvimento dos chifres em *O. taurus* (Hipfner & Cohen, 1999; Stern & Emlen, 1999; Bryant, 2001; Goberdhan & Wilson, 2002; Emlen & Alen, 2004; Weihe *et al.*, 2005).

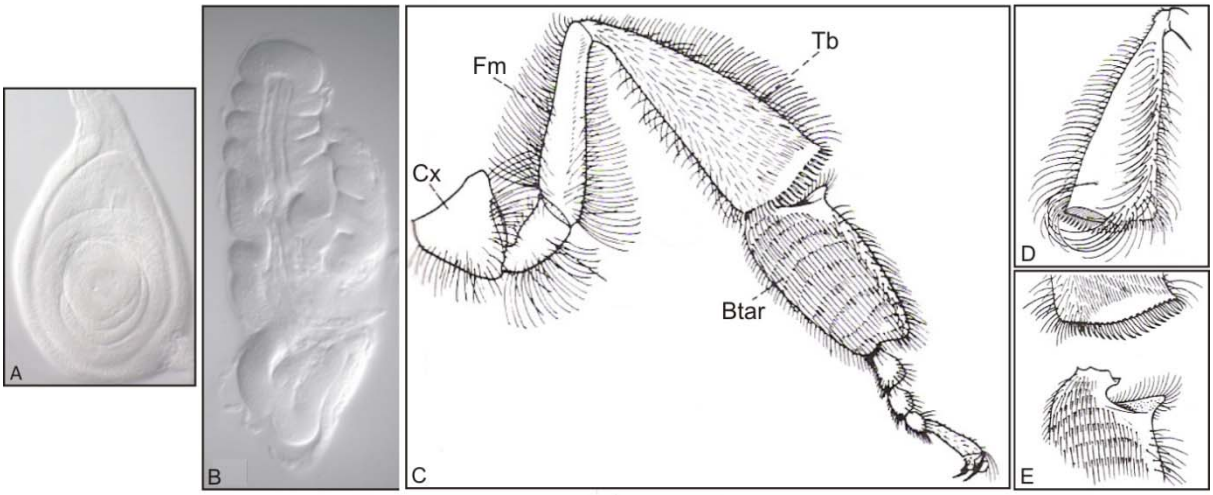


Figura 1: Diferentes momentos do desenvolvimento das pernas dos insetos. **A**: Disco imaginal de perna de *Drosophila* ao final do terceiro estágio larval, região dorsal acima e anterior à esquerda; **B**: Corte ao longo do eixo ântero-posterior do disco imaginal da perna evertido, ao final do terceiro estágio larval de *Drosophila*, região distal acima; **C**: Face interna das pernas posteriores de operárias de *A. mellifera*, detalhe da escova-de-pólen no basitarso, região distal à esquerda; **D**: detalhe da corbícula, localizada na face externa da tíbia das pernas posteriores de operárias, região proximal acima; **E**: detalhe da região da junta entre tíbia e basitarso onde se localiza o prensa-pólen, região proximal acima. Modificado de Kojima (2004) e Snodgrass e Erickson (2000).

1.3. A regulação gênica do desenvolvimento das pernas

A diferenciação entre os apêndices (pernas, asas e antenas) ocorre principalmente por expressão diferencial de um mesmo grupo de genes e de alguns poucos genes específicos de cada apêndice, regulados diferencialmente por genes Hox (Casares & Mann, 1998). Durante os estágios larvais, subdomínios concêntricos no disco das pernas ao longo do eixo PD são reconhecidos como regiões específicas, onde há domínios de expressão circular de genes codificadores de fatores de transcrição. De acordo com estudos dos perfis de expressão e função dos genes durante o desenvolvimento das pernas, Kojima (2004) sugere que a diferenciação das regiões de uma perna não ocorre simultaneamente, mas sim seqüencialmente.

Durante o desenvolvimento embrionário de *Drosophila*, duas moléculas sinalizadoras, Wingless (Wg) e Decapentaplegic (Dpp), são expressas diferencialmente no dorso e no ventre dos discos imaginais, reguladas por Hedgehog (Figura 2). Wg define a região ventral e Dpp define a região dorsal. Na região central, onde há sobreposição de expressão dos dois genes, é definida a região distal do apêndice (Mann & Casares, 2002). Durante o primeiro e segundo estágios larvais, a alta expressão de Wg e Dpp induz a expressão de *distal-less* (*dll*), enquanto células que recebem menor atividade desses genes expressam *dachshund* (*dac*) (Figura 2) (Lecuit & Cohen, 1997).

Ao contrário do que acontece com *dll*, os sinais Wg e Dpp reprimem a expressão de *hth* e *teashirt* (*tsh*), então ao final do primeiro estágio larval, *dll* é expresso centralmente no disco imaginal da perna e, perifericamente a ele, é expresso o gene *homotorax* (*hth*), definindo-se assim dois domínios concêntricos (Figura 2). (Abu-Shaar & Mann, 1998). Assim como foi proposto por Snodgrass (1956), de acordo com a morfologia, as pernas são subdivididas em região proximal e distal no início do desenvolvimento, sendo determinadas por *dll*, *hth* e *tsh* (Mardon *et al.*, 1994). Ademais, os ortólogos a Dll e Extradenticle e HTH em vertebrados são expressos nos domínios distais e proximais,

respectivamente (Sato, 1984; Sunkel and Whittle, 1987; Cohen and Jurgens, 1989, Rieckhof *et al*., 1997; Pai *et al*., 1998; Gorfinkiel *et al*., 1999; revisado por Panganiban, 2000).

Ao final do segundo estágio larval há a expressão do gene *dac* (Abu-Shaar & Mann, 1998), essencial para o desenvolvimento da região mediana das pernas, incluindo trocanter, tíbia, fêmur e o primeiro segmento tarsal (Mardon *et al.*, 1994). A expressão e sobreposição dos domínios de expressão dos genes *dll*, *hth* e *dac* leva à subdivisão destas de maneira subseqüente até a formação de cinco domínios concêntricos, o que, progressivamente, determina a identidade ao longo do eixo PD das pernas (Kojima, 2004) (Figura 2).

Ao final do desenvolvimento das pernas dos insetos, o número e o arranjo dos segmentos foram conservados evolutivamente. Contudo, o tamanho relativo e a morfologia funcional dentre os três pares de perna de uma mesma espécie podem variar, refletindo respostas adaptativas ao ambiente. Como exemplo disso, pode-se citar o par de pernas localizado no terceiro segmento torácico (T3), que é usado para o salto pelos gafanhotos e grilos, e que pode ser até duas vezes maiores que as pernas anteriores, cuja diferenciação é controlada pela expressão dos produtos protéicos dos genes Hox Ubx e Abd-A. Entretanto, espécies basais de Hexapoda, como os Colembola e os Tisanura apresentam todas as pernas com mesmo tamanho relativo e mesma forma (Mahfooz, *et al.*, 2004).

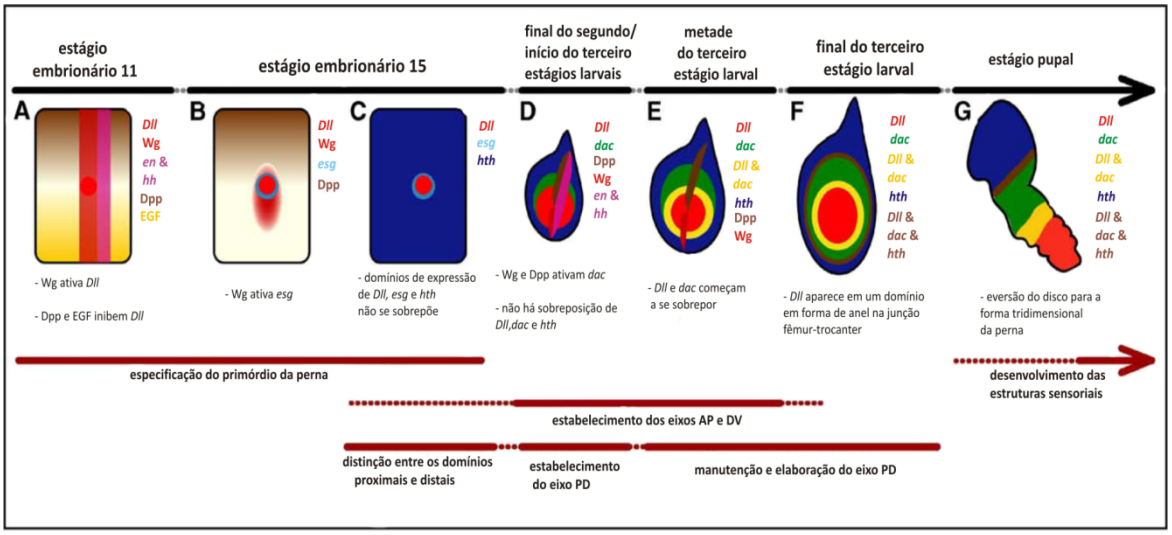


Figura 2: Linha do tempo resumindo os eventos importantes no desenvolvimento de pernas de *Drosophila***.** Modificado de Angelini e Kaufman, 2005. **A**: no estágio embrionário 11, o primeiro primórdio se torna evidente, como visto pela expressão de *Dll*; **B –C**: no estágio embrionário 15, expressão de Wg se torna localizado ao redor do primórdio; **D**: no final do segundo estágio e início do terceiro estágio larval, os eixos DV e PD do disco das pernas são estabelecidos por Wg e Dpp. *dac* aparece como um domínio intermediário, o qual não é sobreposto por *Dll* e *hth*. **E**: no meio do terceiro estágio, a expressão de *Dll* e *dac* se sobrepõe na futura tíbia. **F**: no final do terceiro estágio, expressão de *Dll* aparece como um anel se sobrepondo a *hth* e *dac*. **G**: durante o desenvolvimento pupal os discos imaginais se evertem e a expressão de *Dll* aparece nas cerdas sensoriais, através da perna. ***Dll***: Distal-less; **Wg**: Wingless; ***en***: *engrailed*; ***hh***: *hedgehog*; **Dpp**: Decapentaplegic; **EGF**: Epidermal Growth Factor; ***esg***: *escargot*; ***hth***: *homotorax*; ***dac***: *dachshund*; **AP**: eixo antero-posterior; **DV**: eixo dorso-ventral; **PD**: eixo próximo-distal.

1.4. Os genes Hox e a identidade dos apêndices dos insetos

Os apêndices homólogos dos insetos se diversificaram em um contexto de modelagem por expressão de genes Hox, altamente conservado ao longo do eixo principal do corpo. Mudanças nos domínios de expressão desses genes Hox levam a grandes mudanças fenotípicas. Em *Drosophila,* quando o gene *Antennapedia* (*antp*) é expresso na cabeça, desenvolvem-se pernas no lugar das antenas, ao passo que, quando se inibe a expressão de *antp* na perna mesotorácica (domínio de expressão de *antp*), desenvolvem-se antenas no lugar de pernas (Strhul, 1981; Fischer *et al*., 1986; Schneuwly *et al*., 1987).

Os halteres de Diptera; as asas membranosas dos Coleoptera; e as asas posteriores de Lepidoptera são controladas pela expressão de Ubx (Lewis, 1978; Tomoyasu *et al*., 2005; Weatherbee *et al*., 1999). Entretanto, em formigas, as quais apresentam divisão de castas, os indivíduos reprodutivos são alados, enquanto os soldados e operários não possuem asas. A ausência de asas nas castas não-reprodutivas regulada pela ausência de expressão de Engrailed, apesar de Ubx e Exd serem expressos de maneira semelhante àquela da casta reprodutiva (Abouheif and Wray, 2002; Bowsher *et al*., 2007).

Quanto à diversificação de pernas em insetos, o terceiro par de pernas apresenta diferenças morfológicas e funcionais que podem ser observadas tanto em holometábolos quanto em hemimetábolos, e têm sido relacionadas à expressão diferencial tardia de dois genes Hox, *ultrabitorax* (*ubx*) e *abdominal-A* (*abd-A*) (Mahfooz *et al.*, 2004). A expressão diferencial de Ubx parece também ser responsável pela determinação do número de tricomas e cerdas nas pernas de *Drosophila* (Stern, 1998).

Oncopeltus fasciatus e *Acheta domesticus*, duas espécies de Ortoptera, apresentam as pernas do T3 diferenciadas das demais devido à expressão diferencial de Ubd-A (coletivo para Ubx e Abd-A) e a diferenciação das pernas está associada à hora e ao lugar onde são expressos esses genes

modificando o tamanho e a magnitude do aumento do tamanho dos segmentos (Mahfooz *et al*., 2007).

1.5. Determinação dos mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento diferencial das pernas de fêmeas de A. mellifera

O marco conceitual sobre a determinação-diferenciação de castas em insetos sociais possui grandes lacunas. A participação fundamental de fatores externos como o tipo de alimentação e o grau de cuidados recebidos durante o desenvolvimento e a indução de diferenciais de concentração de hormônios na determinação de castas em abelhas, é amplamente aceito. Mas quais são os fatores últimos mediadores destes ambientes condicionantes, ainda não se sabe. Com a entrada das pesquisas sobre a abelha melífera em uma fase pós-genômica, essa se torna mais e mais um organismo modelo para estudos morfológicos, moleculares, genéticos e, claro, questões relativas à biologia da socialidade.

O presente trabalho buscou entender os mecanismos moleculares responsáveis pela diferenciação durante o desenvolvimento das pernas posteriores das fêmeas de abelhas com base em estudos de hibridação de *microarrays* de cDNA.

Barchuk e colaboradores (2007) compararam, por hibridacao de *microarrays* de cDNA, amostras de RNA total de larvas de operárias e rainhas de *A. mellifera*, e encontraram 240 genes diferencialmente expressos no período crítico da diferenciação de castas. Destes, 91 genes possuem ortólogos em *Drosophila* (Barchuk *et al.*, 2007). Dentre estes genes, cinco estão, possivelmente, envolvidos na diferenciação de pernas:

- ✓ *ataxin-2* (*atx2* - n° de acesso: GB18802) – organização dos filamentos de Actina durante a formação das cerdas (Satterfield *et al*., 2002);

- ✓ *cryptocephal* (*crc* - GB19338) – eversão dos discos imaginais (Hewes *et al.*, 2000);
- ✓ *dachshund* (*dac* - GB17219) – diferenciação dos segmentos intermediários das pernas (Mardon *et al.*, 1994);
- ✓ *grunge* (*gug* - GB18685) - localização e a manutenção da quantidade de cerdas nas pernas (Erkner *et al*., 2002);
- ✓ *Retinoic and fat acid Binding Protein* (*RfaBP* – GB11059) - responde negativamente ao HJ e é ponto chave nas redes de regulação da diferenciação de castas (Barchuk *et al*., 2007).

Foram também incluídos na lista de genes a serem estudados:

- ✓ *distal-less* (*dll*) (AB248729 – GB14516) - regulação do desenvolvimento do eixo próximo-distal dos apêndices (Cohen *et al.*, 1989);
- ✓ *ultrabithorax* (*ubx* - GB30077) e *abdominal-A* (*abd-A* - GB19738) - diferenciação das pernas posteriores e controle das características de cerdas e tricomas nas pernas (Mahfooz *et al*., 2004; Stern, 2003; Rozowski & Akam, 2002).

Com base em dados de morfologia clássica, que mostraram a existência de estruturas casta-específicas caracterizadas pela localização e morfologia diferenciais das cerdas no terceiro par de pernas das abelhas, a hipótese desse trabalho é que a maior expressão gênica de *atx-2*, *crc, dac, gug* e *RfaBP* em operárias durante o desenvolvimento larval encontradas por Barchuk e colaboradores (2007) juntamente com *dll*, *ubx* e *abd-A* está associada à formação da corbícula em abelhas *A. mellifera*.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve por objetivo principal avaliar morfo-geneticamente o desenvolvimento casta-específico do par de pernas posteriores em abelhas *A. mellifera*.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Analisar *in silico* a organização dos genes, da seqüência de aminoácidos das proteínas e domínios conservados das seqüências protéicas de *abdominal-A*, *ataxin-2*, *cryptocephal*, *dachshund*, *distal-less*, *grunge, Retinoic and fat acid Binding Protein* e *ultrabithorax* de *A. mellifera*;
- ✓ Determinar a evolução de características morfológicas externas de pernas de operárias e rainhas em desenvolvimento pós-embrionário de *A. mellifera*;
- ✓ Determinar os níveis de transcritos dos genes *abdominal-A*, *ataxin-2*, *cryptocephal*, *dachshund*, *distal-less*, *grunge, Retinoic and Fat acid Binding Protein* e *ultrabithorax* durante o desenvolvimento das pernas posteriores de operárias e rainhas de *A. mellifera*;
- ✓ Determinar os níveis de transcritos dos genes *abdominal-A, dachshund*, *distal-less* e *ultrabithorax* nos diferentes segmentos das pernas posteriores de operárias em fase de pupa de olho branco de *A. mellifera*;
- ✓ Identificar o padrão de expressão protéica Ultrabithorax nas pernas posteriores de pré-pupas de operárias e rainhas e pupas de olho branco de operárias de *A. mellifera*.

3. Material e métodos

O presente trabalho buscou investigar o desenvolvimento diferencial das pernas posteriores de operárias e rainhas, o qual se sabe que é iniciado entre o quarto e quinto estágio do desenvolvimento larval (Dedej *et al*., 1998; Patel *et* al., 2007). Para determinar o momento em que as estruturas das pernas do adulto estão prontas sob a cutícula pupal, as pernas foram observadas em Microscopia Eletrônica de Varredura. Para avaliar a expressão dos genes relacionados ao desenvolvimento das pernas foram feitas RT-PCR em Tempo Real a partir de amostras de RNA total das estruturas que darão origem as pernas posteriores do adulto desde o quarto estágio larval ao estágio de pupa de olho branco. Foram ainda feitas imunohistoquímicas com anticorpo contra um epitopo conservado entre Ubx e Abd-A para relacionar a localização destas proteínas e a formação de estruturas casta-específicas nas pernas posteriores de operárias e rainhas.

3.1. Material biológico - obtenção de abelhas, discos imaginais e pernas

Para este estudo foram utilizadas operárias e rainhas de abelhas africanizadas em diversas fases do desenvolvimento. Para a obtenção de larvas de mesma idade, a rainha foi periodicamente confinada em regiões dos quadros de cria de operárias, sem larvas, por um período de 6 horas, para a postura de ovos fecundados. Parte das larvas que eclodiram foram transferidas para células de crias de rainhas e colocadas de volta nas colônias, as restantes foram criadas como operárias, desta forma as abelhas utilizadas eram, na medida do possível, homogêneas. As fases do desenvolvimento de operárias foram identificadas segundo Michelette e Soares (1993) (Tabela 1) e as de rainhas baseando-se nas descrições feitas para abelhas européias segundo Rembold *et al.* (1980) (Tabela 2).

Tabela 1: Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) e pupal (P) de operárias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas. A duração dos estágios larvais no desenvolvimento preimaginal refere-se às horas após eclosão (modificado de Michelette e Soares, 1993).

FASE			CARACTERIZAÇÃO	DURAÇÃO (horas)
Ovo			Embriões de 0 a 72 horas	72 (antes da eclosão)
Larva de primeiro estágio (L1)			Peso – 0,0001 a 0,0003g	0-20 (após a eclosão)
Larva de segundo estágio (L2)			Peso – 0,0003 a 0,001g	20-35
Larva de terceiro estágio (L3)			Peso – 0,0015 a 0,004g	35-55
Larva de quarto estágio (L4)			Peso – 0,004 a 0,0248g	55-80
Larva de quinto estágio (L5)	**Fase de alimentação (F)**	**1**	Peso – 0,029 a 0,06g	80-95
		2	Peso – 0,06 a 0,11g	95-105
		3	Peso – 0,11 a 0,16g	105-115
	Fase de tecelagem do casulo (S)	**1**	Célula operculada, larva com intestino cheio	115-130
		2	Célula operculada, larva com intestino semi-cheio	130-145
		3	Célula operculada, larva com intestino vazio	
	Pré-pupa (PP)	**1**	Comprimento da tíbia-tarso = 1,4 a 1,99mm	145-160
		2	Comprimento da tíbia-tarso = 2,0 a 2,6mm	160-180
		3	Comprimento da tíbia-tarso > 2,6mm	180-190
Pw			Pupa de olho branco	190-230
Pp			Pupa de olho rosa	230-250
Pdp			Pupa de olho rosa-escuro	250-265
Pb			Pupa de olho marrom	265-305
Pbl			Pupa de olho marrom com pigmentação torácica leve	305-330
Pbm			Pupa de olho marrom com pigmentação torácica intermediária	330-370
Pbd			Pupa de olho marrom com pigmentação torácica forte	370-390
RN			Operárias emergidas de até 24 horas de vida	

Tabela 2: Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) e pupal (P) de rainhas de abelhas européias, *Apis mellifera carnica* (modificado de Rembold *et al.*, 1980).

FASE			CARACTERIZAÇÃO
Ovo			Embriões de 0 a 72 horas
Larva de primeiro estágio (L1)			Peso – 0,0001 a 0,00045g
Larva de segundo estágio (L2)			Peso – 0,00035 a 0,0015g
Larva de terceiro estágio (L3)			Peso – 0,0013 a 0,007g
Larva de quarto estágio (L4)			Peso – 0,0038 a 0,044g
Larva de quinto estágio (L5)	**Fase de alimentação (F)**	**1**	Peso – 0,035 a 0,090g
		2	Peso – 0,091 a 0,180g
		3	Peso – 0,181 a 0,260g
	Fase de tecelagem do casulo (S)	**1**	Larva com intestino cheio
		2	Larva com intestino semi-cheio
		3	Larva com intestino vazio
	Pré-pupa (PP)	**1**	Comprimento da tíbia-tarso = 1,6 a 2,19mm
		2	Comprimento da tíbia-tarso = 2,2 a 2,8mm
		3	Comprimento da tíbia-tarso > 2,9mm
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 pigmentação torácica leve
Pbm			Pupa de olho marrom com pigmentação torácica intermediária
Pbd			Pupa de olho marrom com pigmentação torácica forte

As análises de expressão dos genes *abd-A*, *atx-2, crc*, *dac*, *dll*, *gug*, *RfaBP* e *ubx* ao longo do desenvolvimento das abelhas foram realizadas por RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR). Para tanto, foram utilizados discos imaginais de pernas posteriores e pernas posteriores, provenientes de operárias e rainhas do quarto estágio larval ao estágio de pupa de olho branco. A dissecção dos discos imaginais foi feita em solução salina (0,9% de NaCl) esterilizada. Cada amostra consistiu de oito a dez pares de discos imaginais e de dois ou três pares de pernas de pupas e pré-pupas. As pernas foram incubadas diretamente em reagente TRIzol® (Invitrogen) e congelados em *freezer* (-

80ºC) até o momento da extração do RNA e os discos imaginais armazenados em meio de cultivo em *freezer* (-80°C).

Foi estudada também a expressão dos genes *abd-A*, *dac*, *dll* e *ubx* nos segmentos das pernas de operárias. Para isso, foram dissecados cinco pares de pernas de operárias Pw e separados os segmentos em coxa e trocanter, fêmur, tíbia, basitarso e tarso e armazenados em reagente TRIzol® (Invitrogen) em *freezer* (-80°C).

3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram feitas análises morfológicas das pernas de operárias e rainhas nas fases de Pb, Pbl e recém-emergidas por microscopia eletrônica de varredura. As pernas das abelhas foram dissecadas em solução salina (0,9% de NaCl) esterilizada, retirando-se também a cutícula pupal que recobre a perna do adulto em diferenciação na fase de pupa de olho marrom (a cutícula do adulto ainda não está pronta em pupa de olho branco). Logo após a dissecção, as pernas foram transferidas para fixador (glutaraldeído 25% e paraformaldeído 40% em tampão cacodilato 0,1M), onde foram mantidas por 12 horas. Em seguida, foram mantidas em tampão cacodilato até o momento da desidratação.

Foram feitas oito séries crescentes de desidratação em etanol de concentração de 30 a 100%. Cada etapa da série foi repetida duas vezes por 10 minutos cada uma. Depois de obtido o ponto crítico de secagem, as amostras foram montadas em *stubs* e então, metalizadas. Os passos de ponto crítico de secagem, banho de ouro, visualização em microscópio eletrônico de varredura Jeol Scanning Microscope JSM-5200 e fotografia (ACROS 100/120 Neopan - Fujifilm) foram feitas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

3.3. Obtenção e análises in silico das seqüências gênicas

Para a obtenção das seqüências foram utilizadas duas estratégias: a seqüência de *dll* foi obtida a partir de uma EST (Expressed Sequence Tag) depositada no GenBank por Takahashi (2006) (nº de acesso AB248729); para os demais genes foi feita uma busca, a partir de ortólogos conhecidos em *Drosophila melanogaster,* por seqüências preditas em *A. mellifera,* através da estratégia de BLAST recíproco utilizando o FlyBase (http://flybase.bio.indiana.edu/) e o genoma de *A. mellifera* versão 4 (http://zulu.fmrp.usp.br/beelab).

Todos os genes foram anotados utilizando a plataforma *Artemis* (Rutherford *et al*., 2000) que permite visualização de características gênicas, realização de alinhamentos, análises e anotação de seqüências de DNA. As análises dos domínios conservados foram feitas utilizando o programa de busca por domínios conservados (cds) do NCBI - NCBI *Conserved Domain Search* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi).

A seqüência de UBX de *A. mellifera* foi analisada utilizando-se ClustalX, através de alinhamentos com as seqüências de UBX de: *Junonia coenia* (Lepidoptera), *Drosophila melanogaster* (Diptera), *Anopheles gambiae* (Diptera), *Tribolium castaneum* (Coleoptera), *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera) e *Akanthokara kaputensis* (grupo externo – Onicophora). Estas seqüências também foram submetidas, juntamente com a seqüência de ABD-A de *A. mellifera,* ao programa de predição de "proteínas secretadas não-classicas", o SECRETOMEP 2.0, no site http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/ e UBX de *A. mellifera* foi submetida ao SignalP, para busca por peptídeo sinal, no site http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/.

3.4. Estudos de expressão gênica por RT-PCR em Tempo Real

3.4.1. Extração de RNA total e síntese do cDNA

O RNA total dos discos imaginais foi extraído utilizando-se o kit GenElute™ Mammalian Total RNA Kit (Sigma), utilizando o protocolo para extração de material fresco ou congelado, seguindo indicações do fabricante. A obtenção do RNA total de pernas e segmentos das pernas de operárias Pw foi feita através do uso de 500µL de reagente TRIzol® (Invitrogen) para cada amostra. O protocolo de extração utilizado foi o recomendado pelo fabricante. O RNA obtido foi ressuspendido em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% para evitar degradação de RNA. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Tecnologies) em comprimento de onda igual a 260ηm, após o tratamento com DNAse I (*RQ1 Rnase-Free Dnase*, Promega).

A síntese de cDNA foi feita a partir de 1µg de RNA total para todas as amostras. Para o procedimento de síntese de cDNA foi utilizado o sistema Superscript II (Invitrogen) e *Oligo* $(dT)_{12\text{-}18}$ (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante.

3.4.2. A RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

A análise dos genes *abdominal-A*, *ataxin-2*, *cryptocephal*, *dachshund*, *distal-less*, *grunge, Retinoic and fat acid Binding Protein* e *ultrabithorax* foi feita por RT-PCR em Tempo Real utilizando-se SYBR® Green, aparelho 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems) e *primers* específicos (Tabela 3). Para cada fase do desenvolvimento, desde larvas de quarto estagio a pupas de olho branco, foram analisadas três amostras de cDNA de discos imaginais de pernas posteriores e pernas posteriores de

pré-pupas e pupas de operárias e rainhas. Para cada segmento das pernas de operárias Pw, também foram utilizadas três amostras. A reação de amplificação foi feita utilizando-se 20µl de volume final, sendo: 10µl de SYBR® Green PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems); 0,8µl de cada *primer* (*forward* e *reverse*) de uma solução estoque de 10pmol; 7,4µl de água *Milli-Q* autoclavada esterilizada e uma alíquota de 1µl de cDNA. O "*threshold*" e a linha de base foram ajustados automaticamente pelo sistema. Os genes da *β-actina* (*β-act*) e da *proteína ribossomal-49* (*rp-49*) foram utilizados como genes endógenos para controle das análises. Os valores de quantificação relativa foram calculados utilizando-se a metodologia de Pfaffl (2001).

Tabela 3: Seqüência dos *primers* utilizados em RT-PCR em Tempo Real.

Gene	*PRIMER sense*	*PRIMER antisense*	Tamanho do fragmento em pb
abd-A	5'ACAACCACTACCTGACGCG	5'ACTCCTTCTTCAATTTCATC	114
atx-2	5'ACAACATCCCAACAGTCAC	5'TGTAGGTCGCAAAGGTAATGG	162
crc	5'GGAGATGTGGAAGCTTGTCA	5'ATGGTTGTACTGGTTGTAAAGT	133
dac	5'GCACCTCAGTCACATGCAAT	5'GACATGTTCGGGTTCACCTT	150
dll	5'ACGCCTACGGATATCACCTG	5'CCCTTTACCGTTCCTCAAG	146
gug	5'ATTAGTTCTGTGACAGAGGAC	5'CATTCCGTACAGAGCAATAAC	158
RfaBP	5'TGCAAAGGCTGACGCTCAC	5'TGCCATCGCTGGTGACAGT	167
ubx	5'CCCTGGATGGCTATAGCAG	5'GTCAGGCAGAGCGAGTGTG	155
rp-49	5'CGTCATATGTTGCCAACTGGT	5'TTGAGCACGTTCAACAATGG	150
B-actina	5'TGCCAACACTGTCCTTTCTG	5'AGAATTGACCCACCAATCCA	156

3.4.3. Padronização dos primers para os experimentos de PCR em Tempo Real

A eficiência da reação foi verificada por amplificação utilizando-se diluições seriadas 1:10 de *pools* de cDNA de discos imaginais de pernas posteriores de operárias e rainhas até a concentração de 1:10000. Os valores de *Slope*, fornecidos após a construção de uma curva de regressão linear (valores da curva padrão), foram utilizados para a verificação da eficiência da reação (E) utilizando-se a fórmula $E=10^{(-1/Slope)}-1$ (User Bulletin#2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System).

R^2 é o fator de correlação linear entre as concentrações do produto amplificado e os valores de seus ciclos limítrofes (*treshold cycle*, Ct); quanto mais próximo do valor 1, mais adequado. Cts são pontos de cinética da reação que representam, em valores, a quantidade de ciclos de amplificação necessários para detecção da expressão de um gene. O Ct é inversamente proporcional à quantidade de molde e sua análise é indicada a partir de um ponto comum em que as amostras analisadas emitem fluorescência acima dos ruídos da reação (*background*). Os valores de Slope, R^2, bem como a eficiencia da reação corrigida para porcentagem estão relacionados na Tabela 4.

Foram utilizadas reações sem adição de molde, como controle negativo. Posteriormente, produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, para verificação da presença de outros fragmentos amplificados. A especificidade dos produtos de PCR foi verificada mediante seqüenciamento e pela análise da curva de dissociação para cada amostra, nas quais foram observados picos únicos, que indicam reações específicas.

Tabela 4: Eficiência e valores de *Slope* e R2 dos *primers* utilizados para RT-PCR em Tempo Real.

Genes	*Slope*	R^2	Eficiência (%)
abd-A	-3,007330	0,976136	100
atx-2	-3,306692	0,996432	100
crc	-3,452379	0,999311	95
dac	-3,266464	0,992632	100
dll	-3,428257	0,998934	96
gug	-3,325960	0,996484	100
RfaBP	-2,977147	0,992280	116
ubx	-3,236557	0,998850	100

3.4.4. Seqüenciamento dos fragmentos obtidos

Para verificação da especificidade dos *primers,* os fragmentos amplificados por PCR foram seqüenciados. As condições de PCR utilizadas para a amplificação foram as seguintes: 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Após amplificação, foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com solução de Brometo de Etídeo a existência de um único fragmento amplificado por PCR. O produto da reação de PCR foi então purificada utilizando-se o kit *MinEluteTM PCR purification Kit* (QIAGEN) e seguida de uma segunda reação de PCR utilizando DNA Sequencing Kit*, BigDye Terminator v 3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction* – ABI PRISM (Applied Biosystems) e os mesmos *primers* específicos para cada gene. O seqüenciamento foi feito pelo método de Sanger (1977), usando um seqüenciador ABI PRISM 310. Os resultados foram comparados às seqüências preditas no banco de dados para cada gene utilizando o programa de alinhamento BLAST 2 sequence (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi) e o programa BLAST na versão 4.0 do genoma de *A. mellifera* (http://zulu.fmrp.usp.br).

3.4.5. Análises estatísticas

Para as análises de diferenças de quantidade de transcritos de um mesmo gene entre operárias e rainhas, os dados obtidos por RT-PCR em Tempo Real foram submetidos a análises estatísticas utilizando o programa *Sigma Stat 3.1*, com o método One Way ANOVA All Pairwise Multiple Comparison Procedure (Holm-Sidak method).

3.5. Imunohistoquímica de UBX e ABD-A

Para localização das proteínas de UBX e ABD-A (UBD-A) nas pernas de operárias e rainhas, foi utilizado o anticorpo monoclonal FP6.87, gentilmente cedido por Dr. Robert A. H. White (Kelsh *et al.*, 1994) desenhado para reconhecer um epitopo conservado dentre estas duas proteínas (Figura 3). As preparações foram baseadas no protocolo de Patel (1994) para preparação total de larvas de estágios iniciais de *Drosophila*, resumidamente: o material coletado foi fixado em 10ml de fixador (5ml de Paraformaldeído 4%, 4ml de H_2O destilada e 1ml de PBS – Tampão fosfato-salino – 10x) e 10ml de heptano por 20min em temperatura ambiente, em um tubo de cintilação. As amostras foram transferidas para outro tubo de cintilação e fixadas em um segundo fixador (5ml Paroformaldeído 4%, 1ml PBS, 4ml H2O destilada e 0,5ml Tween 20 0,1%) por 5min. Em seguida, foram transferidas para um tubo *eppendorf* de 1.5ml e lavadas três vezes em metanol 100%, uma vez em metanol 80%, 50% e 30% diluídos em PT (PBS + Triton X-100, 0,5%). Então, o material foi lavado duas vezes em PT por 10min e uma vez por 30min sob agitação. Depois, o material foi incubado em PBT (PBS, BSA 0,5% e Triton 0,5%) com soro de cabra 5% por 30min e logo após, incubado em PBT+soro de cabra 5% com anticorpo primário FP6.87 1:10 (anti-UBD-A) *over-night*, a 4°C sob agitação.

Então, o material foi lavado três vezes por 5min e quatro vezes por 30min em PT à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi incubado em PBT+soro de cabra 5% por 30min e então incubado por 3h com o anticorpo secundário, anti- mouse, conjugado com Cy3 (Jackson immunoresearch) para as pré-pupas e *over-night* para as pupas de olho branco (na concentração de 1:200) a 4°C sob agitação.

O material foi lavado novamente por três vezes de 5min e quatro vezes de 30min em PT, a temperatura ambiente. Na última lavagem foi adicionado DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, para marcação de núcleo) por 4min e o material foi lavado por mais cinco vezes de 5min. Então o material

foi colocado em glicerol 50%. Para a montagem em lâmina, foi utilizado glicerol 80%. Então, o material foi visualizado e fotografado em microscópio Confocal Leica TCS-SP5 no Laboratório de Microscopia Confocal do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP e em microscópio ZEISS, equipado com câmera ZEISS MC80DX, e filme TMAX 3200 – Kodak, no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. O controle negativo foi feito sob as mesmas condições, entretanto sem incubar em anticorpo primário.

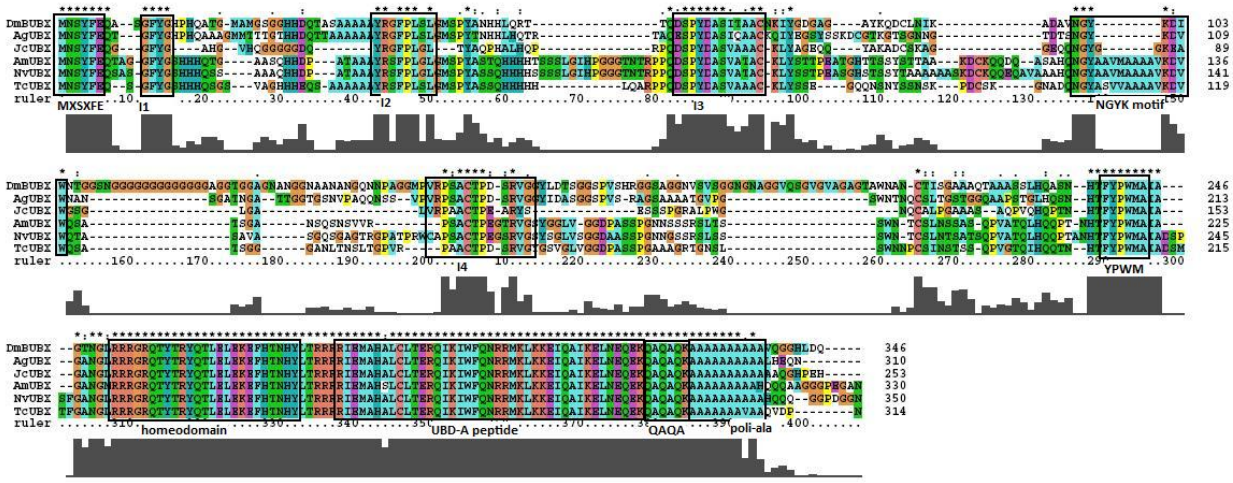


Figura 3: Alinhamento das proteínas UBX e ABD-A. O quadrado vermelho indica o epitopo conservado entre as duas proteínas reconhecido pelo anticorpo FP6.8.

4. Resultados

4.1. Morfologia diferencial de caracteres externos de pernas posteriores de abelhas

Para verificar morfologicamente o desenvolvimento diferencial das pernas das duas castas das abelhas *A. mellifera*, foram feitas preparações para microscopia eletrônica de varredura de pernas posteriores de operárias e rainhas durante o desenvolvimento pupal. Foram dissecadas pernas de operárias e rainhas Pb, Pbl e recém emergidas. Durante o desenvolvimento pupal, a cutícula do adulto se desenvolve e diferencia sob a cutícula da pupa. A cutícula em formação se destaca da cutícula pupal (fenômeno chamado de apólise) na fase de pupa de olho rosa e somente na fase seguinte, pupa de olho marrom, é possível retirar a cutícula pupal que recobre a cutícula do adulto, para avaliar o desenvolvimento das pernas. Neste momento, no estágio de pupa de olho marrom, a perna do adulto já está formada com todas as cerdas e demais estruturas (Figura 4).

Nas pernas das operárias Pb é possível identificar a corbícula, uma região desprovida de cerdas na face externa da tíbia e o prensa-pólen e a escova-de-pólen na face interna da tíbia e do basitarso, respectivamente. Entretanto, as cerdas da região da tíbia têm inserção diferente tanto dos demais segmentos da mesma perna da operária bem como da perna da rainha, apresentando uma inserção solta no soquete, o que é característico de cerdas sensoriais. As cerdas da escova-de-pólen são mais curtas e grossas que aquelas das tíbias de operárias e rainhas. As rainhas apresentam tanto a face externa quanto a face interna da perna recoberta por cerdas, as quais não parecem ser sensoriais. A cutícula da perna das operárias também é diferente da rainha, apresentando escamas poligonais como descrito por (Erickson *et al*., 1986), enquanto a da rainha é lisa (Figura 4).

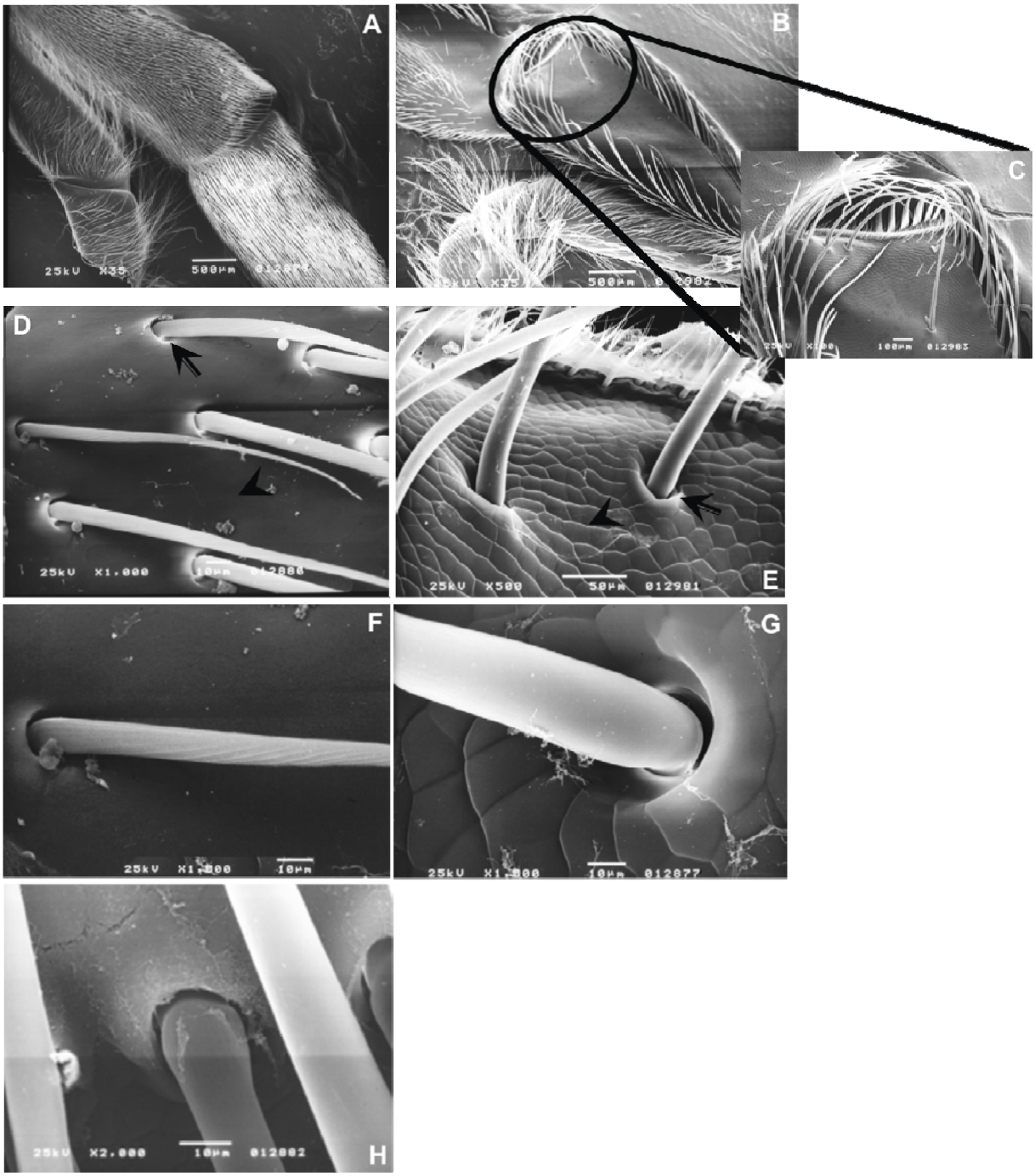


Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura de pernas posteriores de pupas de olho marrom de operárias e rainhas de *A. mellifera.* **A**: face externa da perna posterior de rainha; **B**: face externa da perna posterior de operária; **C**: detalhe da porção distal da face externa da tíbia de operária; **D**: detalhe das cerdas da perna posterior de rainha; **E**: detalhe das cerdas da tíbia da perna posterior de operária; **F**: detalhe da inserção da cerda na perna de rainha; **G**: detalhe da inserção da cerda na face externa da tíbia da perna posterior de operária; **H**: detalhe da inserção da cerda na face interna do basitarso da perna posterior de operária. Seta indica ponto de inserção das cerdas, cabeça de seta indica a cutícula de rainha lisa em D e cutícula com escamas poligonais em E.

4.2. Análises in silico dos genes e produtos protéicos de abd-A, atx-2, crc, dac, dll, gug, RfaBP e ubx

Após a identificação dos genes candidatos a reguladores casta-específicos do desenvolvimento diferencial de pernas posteriores de abelhas *A. mellifera*, os mesmos foram anotados utilizando a plataforma ARTEMIS (Rutherford, 2000) e estão representados na Figura 5. *abd-A* apresenta 3 éxons; *atx-2*, 10; *crc*, 2; *dac*, 11; *dll*, 5; *gug*, 6; *RfaBP* 23; e *ubx*, 2 éxons. De maneira semelhante ao seu ortólogo em *Drosophila*, *ubx* apresenta, em *A. mellifera*, um íntron com mais de 105 mil pares de bases. Os genes preditos com os tamanhos das proteínas esperadas, os respectivos GBs (número de acesso no *Official Gene Set*) e grupos de ligação (número do cromossomo de *A. mellifera* no qual se encontra o gene) e um resumo dos domínios descritos no cds – NCBI estão descritos na Tabela 5.

Os domínios preditos para as proteínas dos genes analisados estão representados na Figura 6, sendo que todas elas, com exceção de Atx-2 e RfaBP, representam fatores de transcrição. As proteínas Dll (349pb), Ubx (330pb) e Abd-A (399pb) possuem um homeodomínio (cd00086), sendo Dll pertencente à família Dll-type e Ubx e Abd-A à família Antp-type (Duboule, 1994). Tal domínio é de ligação ao DNA, estando, desta forma, envolvidas na regulação transcripcional de processos chave no desenvolvimento de metazoários, podendo atuar ligando-se ao DNA como monômero ou como homo e/ou heterodímeros, de maneira seqüência-específica.

A proteína Crc (357pb) apresenta um domínio bZIPMaf (pfam03131), uma subfamília dos fatores de transcrição zíper de leucina (bZIP). Tal domínio consiste em uma região rica em resíduos básicos seguida de seis resíduos hidrofóbicos repetidos, formando o zíper de leucina, que forma dímeros e liga-se ao DNA. A primeira região media a ligação da proteína ao DNA através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre cadeias laterais de aminoácidos e as bases do sulco maior, enquanto o zíper de leucina forma domínios de interação proteína-proteína através de estruturas espirais, consistindo de duas α-helices paralelas (Blank & Andrews, 1997).

A proteína Dac (781pb) possui um domínio da família SKI/SNO/DAC (pfam02437) de aproximadamente 100 aminoácidos, com um motivo CLPQ conservado (Figura -7A). As proto-oncogenes c-ski influenciam na proliferação celular, transformação morfológica e diferenciação miogênica. As Sno, homólogos a Ski, expressam duas isoformas e desempenha funções na resposta ao estímulo a proliferação celular. Dac também contém esse domínio e está envolvido em vários aspectos do desenvolvimento.

Gug (1386pb) é uma proteína com domínio Zinc-finger-GATA (ZnF GATA – cd00202), com domínio SANT, SWI3, ADA2, N-CoR e TFIIIB (cl00132) que possuem capacidade de ligar-se ao DNA. O domínio ZnF liga-se ao promotor de genes na seqüência consenso [AT]GATA[AG] e apresenta um motivo canônico de quatro resíduos de cisteína [C-X(2)-C-X(17)-C-X(2)-C] (Figura 7-B).

A proteína Atx-2 (910pb) de *A. mellifera* apresenta o domínio associado a motivos semelhantes a *splicing* de RNA (LsmAD - pfam06741), o qual contém um sinal de localização no complexo de Golgi (Ng *et al*., 2007); apresenta também o domínio PBP1 (COG5180) o qual interage com a proteína que se liga a região poli(A) de mRNAs, processando-os ou modificando. Domínios Atx-2, de aproximadamente 250 resíduos na região C-terminal, também foram encontrados, no entanto, a função ainda é desconhecida.

A região de repetição de CAG, tida como instável, na região codificadora do gene *SCA2*, ortólogo de Atx-2 em mamíferos, pode apresentar uma expansão do trecho rico em glutamina, presente em uma doença neurodegenerativa chamada Ataxia Espinocerebelar do tipo 2 (Pulst *et al*., 1996). Em *Drosophila*, a proteína Atx-2 apresenta essa região expandida. Quando submetidos ao programa BLAST, a proteína de *A. mellifera* apresenta maior similaridade com a proteína tipo selvagem de camundongo (sem expansão de poliglutamina) do que com a proteína de *Drosophila*.

A proteína RFABP (3160pb) pertence a uma família de proteínas transportadoras de lipídeos, apresenta domínios tais como: fator de von Willebrand tipo D (VWD – cl02516), domínio homólogo ao fator de coagulação de humanos; Vitelogenina N (pfam01347) e região amino-terminal de

Lipoproteina; RFABP apresenta ainda outros domínios com funções até o momento desconhecidas (pfam06448 e pfam09172).

Tabela 5: Relação dos domínios conservados da proteínas analisadas, número de acesso no *Official gene set* (GB), tamanho da proteína (em aminoácidos) e grupo de ligação do gene em *A. mellifera*.

Gene	Tamanho da proteína (aa)	GB	Grupo	Domínios descritos
Abdominal-a (Abd-A)	399	19738	16.9	Homeobox (cd00086) - Antp-Type
Ataxina-2 (Atx-2)	910	18802	2.40	LsmAD (pfam06741) e PBP1 (COG5180)
Cryptocephal (Crc)	357	19338	10.29	Zíper de leucina - bZIPMaf (pfam03131)
Dachshund (Dac)	781	30210	4.23	SKI/SNO/DAC (pfam02437)
Distal-less (Dll)	349	14516	13.10	Homeobox (cd00086) - Dll-Type
Grunge (Gug)	1386	18685	Un.154	Zinc-finger - ZnF GATA (cd00202) e SANT (cl00132)
Retinoic and Fat Acid Binding Protein (RFABP)	3160	11059	8.20	Fator de von Willebrand tipo D – VWD (cl02516) e Vitelogenina N (pfam01347)
Ultrabithorax (Ubx)	330	30077	16.9	Homeobox (cd00086) - Antp-Type

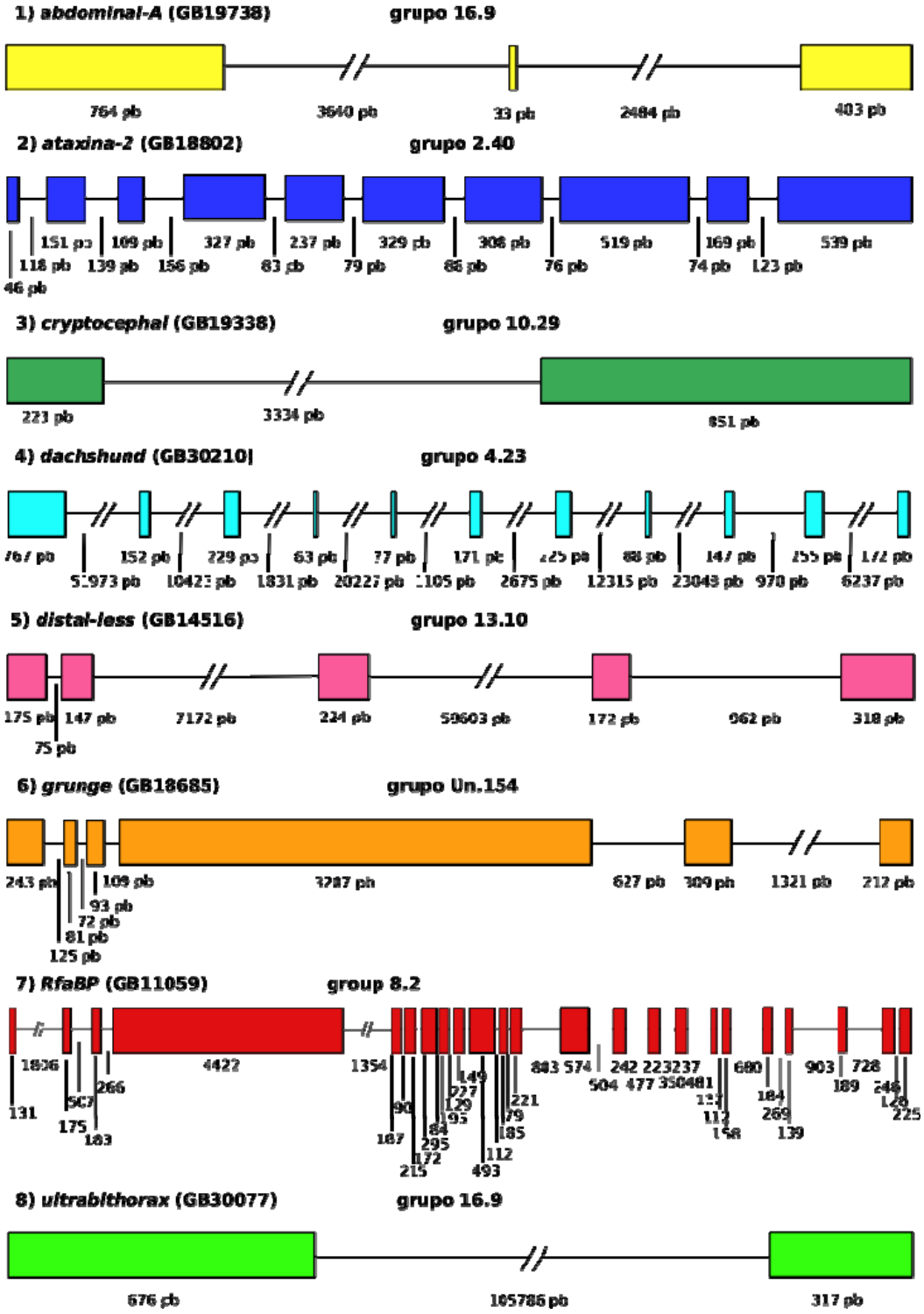


Figura 5: Organização dos genes de *A. mellifera* analisados no presente trabalho. **GB**: número de acesso do gene no *Official Gene Set*; **Grupo**: grupo de ligação, cromossomo no qual o gene se encontra; **pb**: tamanho em pares de bases. Éxons em caixas e íntrons em linhas. Os genes foram anotados utilizando a plataforma Artemis (Rutherford *et al*., 2000).

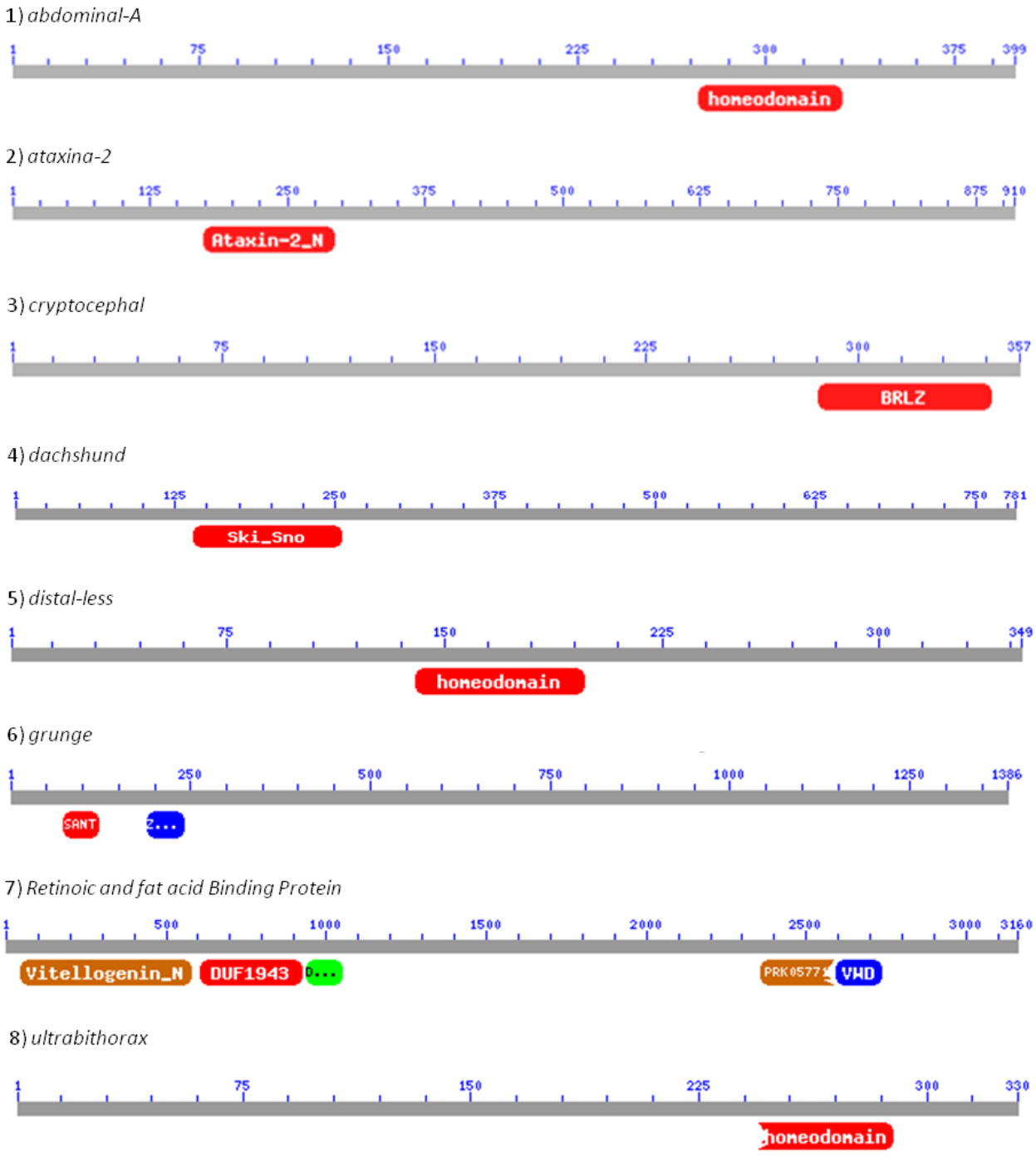


Figura 6: Localização dos domínios conservados encontrados nas seqüências gênicas de *A. mellifera* analisadas neste trabalho. As análises foram feitas utilizando-se o programa **NCBI Conserved Domain Search**. As barras abaixo da barra cinza indicam o domínio encontrado pelo programa, as barras com final arredondado indicam que o domínio está completo.

A

```
Mus160        160 LPGK.[1].VYSTPSPVENTPQN.[1].ECKMVDLRGAKVASFTVEGCELICLPQAFDLFLKHL.[2].GLHTVYTKLKR 228
Amel          140 LPPR.[1].YNSPPPISTSDPTA.[1].ECKLVDYRGQKVAAFIIAGDTMLCLPQAFELFLKHL.[2].GLHTVYTKLKR 208
gi 22945918    96 TPPR     ELSQPILSVADAGC.[1].ELYETKLEGKTIGCFSVGGEMRLCLPQFLNNVLNDF      SLEQINRIFDE 161
gi 2498917     78 QPPP.[1].VLPGPFFMPSDRST      ERCETVLEGETISCFVVGGEKRLCLPQILNSVLRDF      SLQQINSVCDE 143
gi 134594     124 LPSP.[1].VLPGPLLIPSDSST      ELTQTVLEGESISCFQVGGEKRLCLPQVLNSVLREF      TLQQINTVCDE 189
gi 624298     196 VPPR.[1].YNSPPPISTSDPSA.[1].ECKLVEYRGQKVAAFIISNETMLCLPQAFELFLKHL.[2].GLHTVYTKLKR 264
```

B

```
Feature            #       #                           #  #
GATA             6 VCS     NCQT     STTTLWRRS.[1].MGDPVCNACGLYYKLHQ     VNRPLTMR.[1].DGIQTRNR.[1].  57
Amel           189 SCQ     HCFS     TNSKEYQIA.[2].DRLLLCTECRTHLKKTG     ELPPAPPY.[2].RPVPAESP.[1].  242
gi 1709699     225 CCT     NCGT     RTTTLWRRN.[1].DGEPVCNACGLYYKLHG     VNRPLAMR.[1].DGIQTRKR.[1].  276
gi 17539622    300 KCS     NCST     IKTTAWRRD.[1].EGKLVCNACGLYYRLHR     THRPVHMR.[1].DFIQQRFR.[1].  351
gi 1706638     236 VCS     NCNG     TNTTLWRRN.[1].EGDPVCNACGLYFKLHH     IPRPTSMK.[2].GALQTRKR.[1].  288
gi 17559258    137 VCS.[2].NCRT     RETTLWRRT.[1].SGAIECNGCSLYFRKNG     IQRPAELC.[1].KTIMKRNR.[1].  190
gi 19923393    506 ACR     HCFT     TTSKDWHHG.[2].ENILLCTDCRIHFKKYG     ELPPIEKP.[3].PPFMFKPV.[1].  560
gi 9910692      71 RCP     QCAV.[1].KTSPQWREG.[2].GEVTLCNACGLFYRKIF.[2].FGKDLAKR.[2].NEIKGVSV.[1].  127
gi 14917059    933 DCA     NCHT     RNTPEWRRG.[2].GNRDLCNSCGLRWAKQT.[1].RVSPRTSS.[2].GNGDSMSK.[1].  987
gi 5901735     458 PCE     SCGT     TKSSQWNSV.[4].STSRLCLSCWEYWRRYG     SMKSATKG.[2].GEGDAKKK.[1].  513
```

Figura 7: Alinhamento de seqüências feito pelo programa NCBI *Conserved Domain Search*. **A**: alinhamento da região do domínio SKI/SNO/DAC com o motivo conservado CLPQ (em vermelho) de Dachshund. **B**: alinhamento da região do domínio Zinc-finger de Grunge com quatro resíduos de cisteína em destaque por #. Em vermelho, destacada as cisteínas conservadas na seqüência de Grunge de *A. mellifera*.

4.3. Quantificação de transcritos por RT-PCR em Tempo Real

4.3.1. Perfis de expressão gênica ao longo do desenvolvimento das pernas posteriores de fêmeas

Objetivando validar os resultados obtidos por *microarrays* relativos às diferenças encontradas na expressão dos genes *atx-2*, *crc*, *dac*, *gug* e *RfaBP* entre larvas de rainhas e operárias de *A. mellifera* (Barchuk *et al*., 2007),foram analisadas a expressão dos genes *ubx e abd-A*, responsáveis pelo crescimento diferencial do par de pernas posterior de *Acheta domesticus*, *Gryllus firmus* e *Schistocerca americana* (Mahfooz *et al*., 2004) e também do gene *dll*, requerido para o desenvolvimento das pernas em *Drosophila*.

Para tanto foram utilizadas amostras de discos imaginais de pernas posteriores e pernas posteriores de operárias e rainhas nos seguintes estágios: L4, L5F2, L5S2, L5PP2 e Pw. Tais perfis de transcrição gênica estão representados nos gráficos da Figura 8, da qual se destaca que: O gene *abd-A* tem baixos níveis de transcritos em ambas as castas durante o desenvolvimento larval e perfis semelhantes entre operárias e rainhas, apresentando um aumento estatisticamente significativo nos níveis de transcritos apenas em operárias Pw, sendo cerca de cinco vezes mais expresso que em rainhas ($P<0,01$).

Assim como *abd-A*, o gen*e atx-2* tem o mesmo perfil de transcrição entre as castas, sendo um pouco mais expresso em rainhas, porém isto não é estatisticamente significante ($P>0,01$). Operárias e rainhas têm altos níveis de transcritos de *atx-2* no quarto ínstar larval, estes sofrem uma diminuição na fase de L5F, voltando a aumentar na fase seguinte (L5S). No entanto, na fase pupal, operárias têm um aumento e rainhas têm uma diminuição nos níveis de transcritos de *atx-2*.

O gene *crc* não apresenta perfis diferentes quando comparado entre as castas durante o desenvolvimento larval. As operárias têm diminuição nas quantidades de transcritos em L5F, seguido

de um aumento em L5S, enquanto em rainhas os níveis de transcritos só diminuem em L5S, equiparando-se aos encontrados em operárias.

De maneira semelhante a *crc*, *gug* também apresenta diminuição nos níveis de transcritos em momentos diferentes do desenvolvimento das pernas de operárias e rainhas. De novo, operárias têm os níveis de transcritos diminuídos em L5F e rainhas em L5S. Nas fases L4 e L5S, as operárias têm maiores níveis de transcritos que rainhas, e nos demais momentos as rainhas têm maiores quantidades de RNAm de *gug*.

Em operárias e rainhas L4 e Pw são encontradas taxas semelhantes de transcritos de *dac*. Contudo, as rainhas apresentam um aumento de transcrição em direção à fase L5S, seguido de diminuição até Pw, enquanto as operárias têm menores níveis de transcritos em L5F, os quais aumentam em L5S e se mantém com leves variações até o início do estágio pupal.

dll apresenta o mesmo perfil de transcrição dentre as castas por todo o desenvolvimento larval, sendo maiores os níveis de transcritos em rainhas, as quais têm uma diminuição destes em Pw tornando-se semelhantes às quantidades encontradas nas operárias. As maiores quantidades de transcritos de *dll* são encontradas na fase mais inicial do desenvolvimento analisada neste trabalho (L4).

Da mesma forma, o gene *RfaBP* apresenta perfis de transcrição semelhantes entre operárias e rainhas, entretanto as rainhas apresentam maiores níveis de transcritos que as operárias. Os níveis de transcritos aumentam nas duas castas em Pw, são baixos em L5F e L5PP e são basais na fase L5S. Excetuando-se o gene *abd-A*, todos os genes acima descritos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas taxas de transcrição dentre as castas.

Quanto aos níveis de transcritos de *ubx*, operárias e rainhas apresentam grandes diferenças em seus perfis. As operárias apresentam uma redução nos níveis de transcritos na fase L5F enquanto rainhas apresentam um aumento nesta fase que atinge seu máximo na fase seguinte, L5S. Entretanto, após a redução de transcritos na fase de alimentação, as operárias apresentam um

aumento constante até atingir o seu máximo em L5PP, estágio em que *ubx* é mais expresso em operárias que em rainhas, assim como na fase de pupa de olho branco ($P<0,01$).

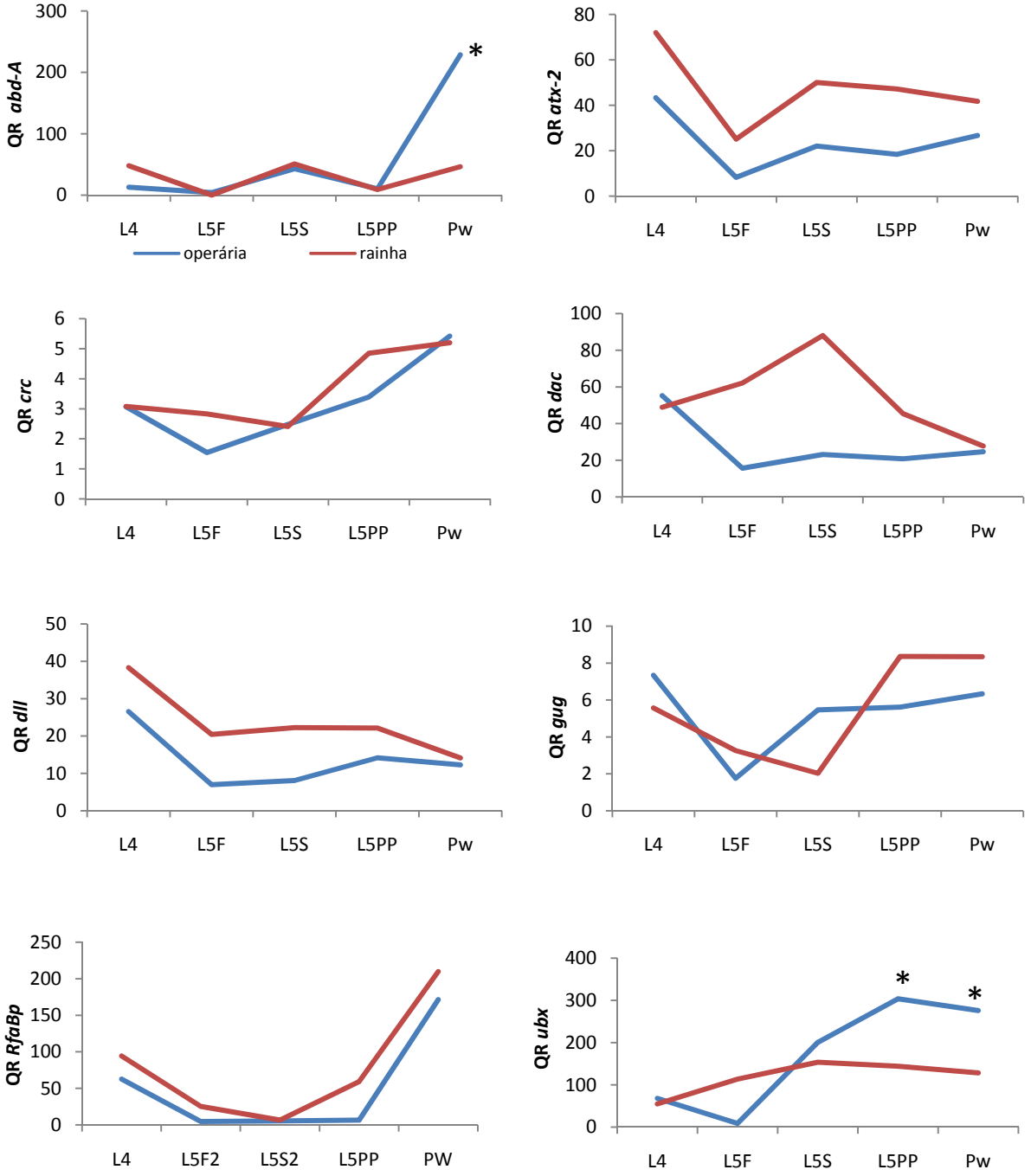


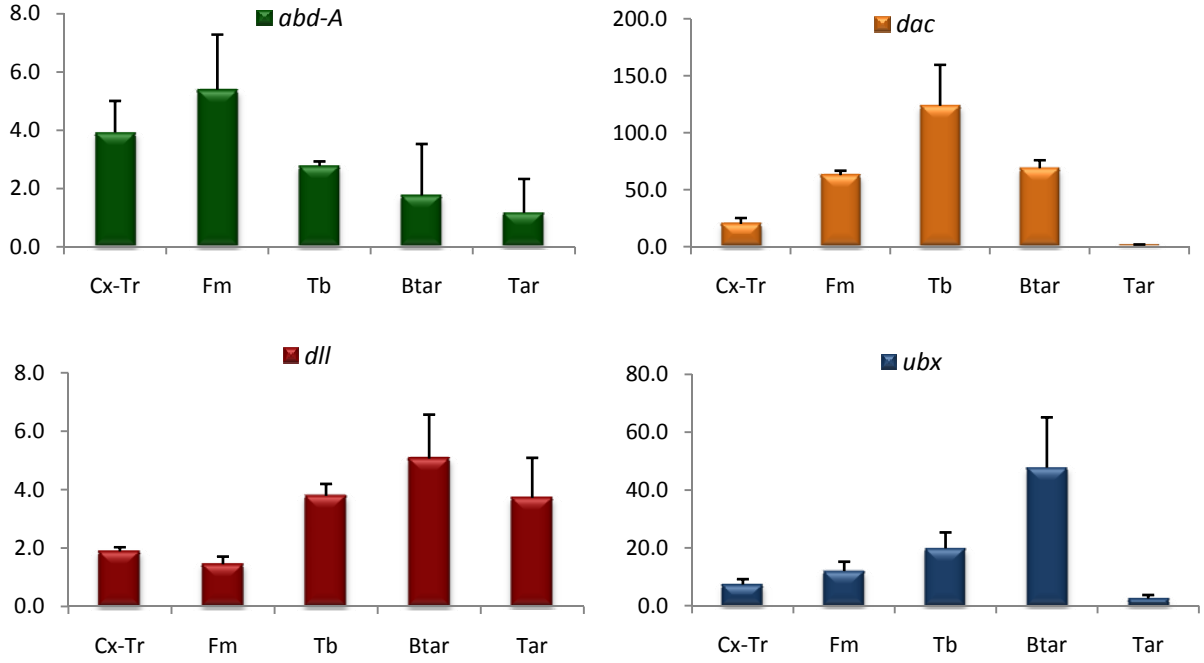
Figura 8: Perfil de expressão dos genes *abdominal-A*, *ataxina-2*, *cryptocephal, dachshund*, *distal-less*, *grunge, Retinoic and Fat acid Binding Protein* e *ultrabithorax* durante o desenvolvimento das pernas posteriores de operárias e rainhas de *A. mellifera*, por RT-PCR em Tempo Real. As linhas azuis correspondem aos perfis de expressão gênica em operárias e as linhas vermelhas a rainhas. **QR**: quantificação relativa dos transcritos; ***abd-A***: *abdominal-A;* ***atx***: *ataxina-2;* ***crc***: *cryptocephal;* ***dac***: *dachshund;****dll***: *distal-less;* ***gug***: *grunge;* ***RfaBp***: *Retinoic and fat acid Binding Protein; e* ***ubx***: *ultrabithorax*; ***** - diferenças estatísticas entre castas nos níveis de transcritos (P<0,01).

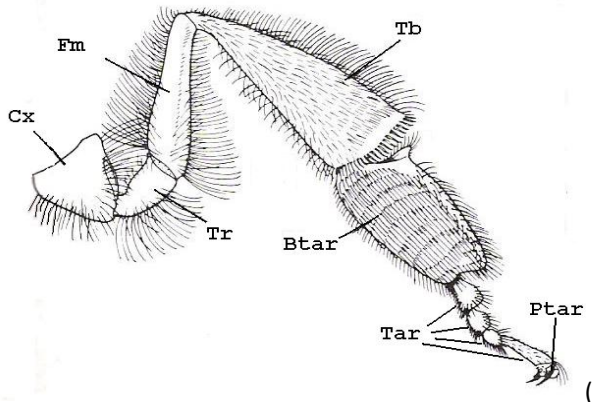
4.3.2. Perfil de expressão gênica nos diferentes segmentos das pernas de operárias Pw

Após as análises de expressão gênica ao longo do desenvolvimento de operárias e rainhas nas quais foram encontrados apenas *ub*x e *abd-A* como diferencialmente expressos, foram feitas análises de expressão dos genes relacionados à identidade dos segmentos das pernas, *dac*, *dll* e *ubx-abd-A* (Mardon *et al*., 1994, Cohen *et al*., 1989, Mahfooz *et al*.,2004). Desta forma, foi analisada a localização dos transcritos desses genes nos segmentos – coxa e trocanter (Cx-Tr), fêmur (Fm), tíbia (Tb), basitarso (Btar) e tarso (Tar) – das pernas de operárias Pw (Figura 9).

O gene *abd-A* apresenta baixos níveis de transcritos, os quais são mais abundantes no Fm seguido da amostra de coxa e trocanter. A quantidade de transcritos no fêmur é cerca de cinco vezes maior que no tarso. Enquanto *dll* é mais expresso no basitarso e tarso. No entanto, na tíbia encontram-se quantidades de transcritos próximas àquelas encontradas nos tarsos.

O gene *dac* é mais expresso na tíbia em detrimento dos outros segmentos da perna, tendo cerca de 100 vezes mais transcritos nesta região que nos tarsos e aproximadamente duas vezes mais que no fêmur e basitarso. Já *ubx* tem cerca de duas vezes mais transcritos no basitarso que na tíbia e quatro vezes mais que no fêmur. Além disso, *ubx* é vinte vezes mais expresso no basitarso que no tarso.





(modificado de Snodgrass e Erickson, 2000)

Figura 9: Quantificação relativa dos transcritos dos genes *abdominal-A*, *dachshund*, *distal-less* e *ultrabithorax* nos segmentos das pernas de operárias de *A.mellifera* no estágio de pupa de olho branco, por RT-PCR em Tempo Real. ***abd-A***: *abdominal-A;* ***dac***: *dachshund;* ***dll***: *distal-less;* e ***ubx***: *ultrabithorax.* **Cx-Tr**: coxa e trocanter; **Fm**: fêmur; **Tb**: tíbia; **Btar**: basitarso; **Tar**: tarso; e **Ptar**: pré tarso.

4.4. Análises in silico da seqüência de Ubx

Baseando-se na literatura que descreve que Ubx é responsável, em insetos hemimetábolos, pelo crescimento diferencial do par de pernas posteriores (Mahfooz *et al*., 2007), foram, então, realizados alinhamentos da proteína Ubx de *A. mellifera* com as de outros insetos e um grupo externo (Onycophora) para verificar se esse homeobox apresentaria todos os domínios conservados descritos para insetos. Uma vez encontrados tais domínios, poderiam ser realizados experimentos de imunohistoquímica localizando Ubx nas pernas de operárias e rainhas de abelhas relacionando-o com o desenvolvimento diferencial destes apêndices, já que experimentos prévios indicaram diferenças nas taxas de transcrição de *ubx* e *abd-A* entre as castas.

As seqüências de Ubx de insetos apresentam, além do homeodomínio, outros domínios necessários para sua função, como por exemplo, a inibição da transcrição de *dll*, o que determina a identidade torácica/abdominal (Grenier & Carroll, 2000). Como indicados na Figura 10-A, a seqüência protéica de Ubx de *A. mellifera* apresenta todos os domínios descritos.

Os domínios MXSXFE, NGYK e YPWM, em posição *upstream* ao homeodomínio, o próprio homeodomínio e o peptídeo UBD-A, (compartilhado com a proteína Abd-A e *downstream* ao homeodomínio), são encontrados em insetos, bem como em Onycophora, grupo irmão de Arthropoda (Galant & Carroll, 2002). Entretanto, assim como na proteína Ubx de *N. vitripennis* e *T. castaneum*, no domínio NGYK de Ubx de *A. mellifera* há uma inserção de oito aminoácidos, em sua maioria alaninas. Próximo a este domínio há outras duas regiões de inserção, uma em torno de 70 aminoácidos e outra em torno de 125aa.

Para as funções características de Ubx de insetos há outros domínios descritos que foram nomeados de I1 a I4 em posição *upstream* ao homeodomínio (Galant & Carroll, 2002). *Downstream* a este mesmo se encontra o domínio denominado QAQA e uma extensão de resíduos de alanina (Galant & Carroll, 2002) (Figura 10-B). Porém, o I4 é mais semelhante entre *A. mellifera*, *N.*

vitripennis, J. coenia e *T. castaneum*, quando comparados aos respectivos de *D. melanogaster* e *A. gambiae*.

Como se pode ver na Figura 11, a proteína Ubx de Onycophora não apresenta os domínios descritos para Insecta, bem como as inserções presentes em *A. mellifera* e *N. vitripennis*. Contudo, o domínio homeobox é muito conservado, sendo que entre a proteína Ubx de Onycophora e os insetos analisados possuem apenas um aminoácido diferente. Além do mais, a proteína de *A. kaputensis* (Onycophora) é, ao menos, 100 aminoácidos menor que as dos insetos analisados neste trabalho.

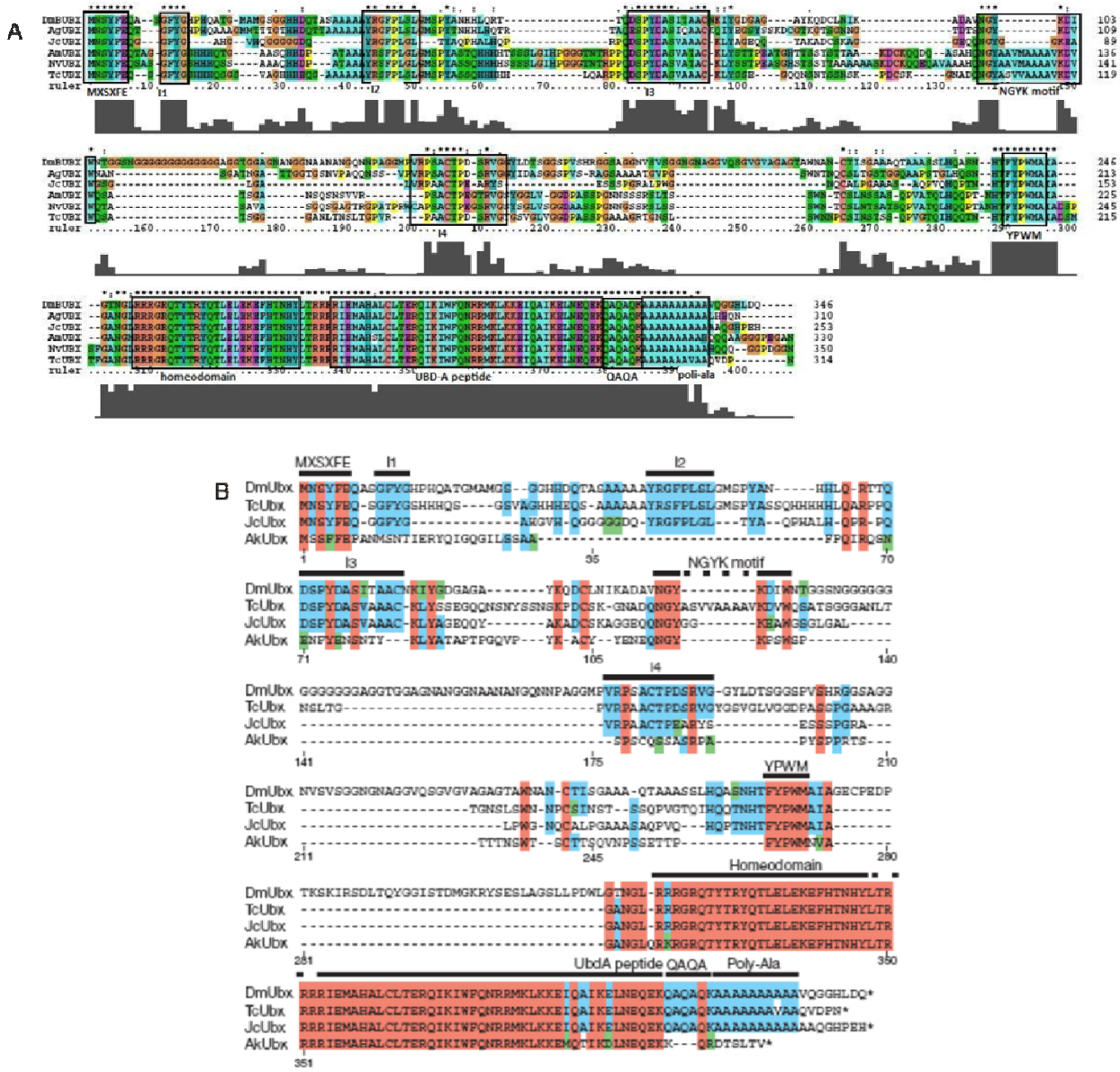


Figura 10: Alinhamento das seqüências de UBX. **A** – alinhamento das seqüências de UBX de insetos por ClustalX. Os quadrados destacam os domínios descritos na literatura; acima do alinhamento, os asteriscos representam as posições conservadas e os dois pontos, aminoácidos de mesma função; a barra cinza abaixo representa a freqüência de conservação dos aminoácidos dentre as seqüências analisadas; à margem esquerda do alinhamento estão representadas as posições dos aminoácidos; e a linha *ruler* indica a posição média dos aminoácidos. **B**- modificado de Galant e Carroll, 2002. Os domínios estão representados pelas barras acima do alinhamento. **Am** – *Apis mellifera* **Ag** - *Anopheles gambiae* (Diptera); **Dm** - *Drosophila melanogaster* (Diptera); **Jn** - *Junonia coenia* (Lepidoptera); **Tc** - *Tribolium castaneum* (Coleoptera); **Nv** - *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera); e **Ak** - *Akanthokara kaputensis* (grupo externo – Onicophora).

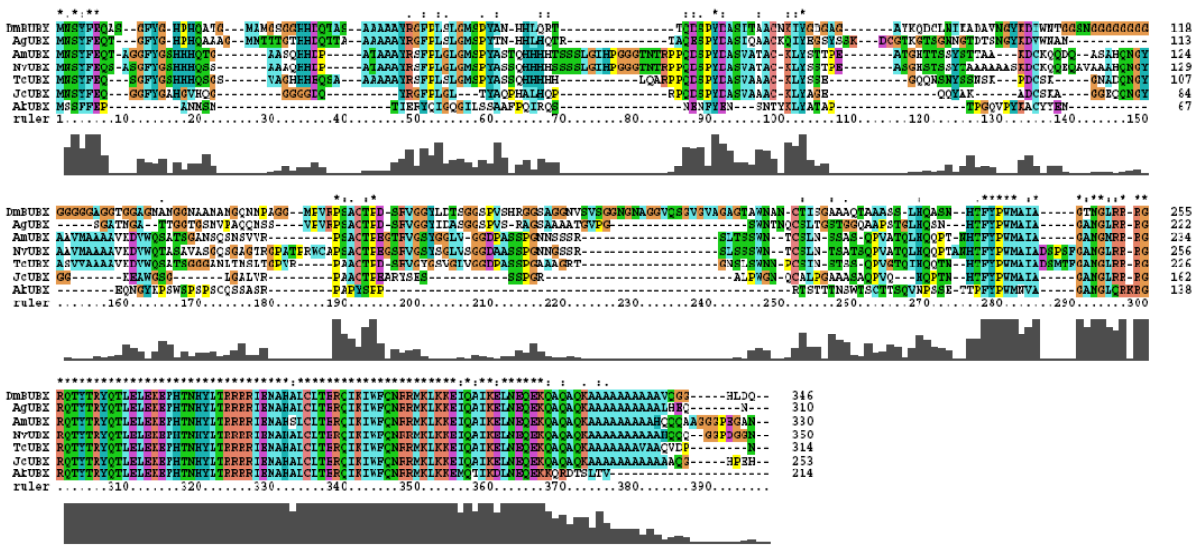


Figura 11: Alinhamento seqüências de UBX por ClustalX. Os quadrados destacam os domínios descritos na literatura; acima do alinhamento, os asteriscos representam as posições conservadas e os dois pontos, aminoácidos de mesma função; a barra cinza abaixo representa a freqüência de conservação dos aminoácidos dentre as sequencias analisadas; à margem esquerda do alinhamento estão representadas as posições dos aminoácidos; e a linha *ruler* indica a posição média dos aminoácidos. Ag - *Anopheles gambiae* (Diptera); Dm - *Drosophila melanogaster* (Diptera); Jn - *Junonia coenia* (Lepidoptera); Tc - *Tribolium castaneum* (Coleoptera); Nv - *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera); e Ak - *Akanthokara kaputensis* (grupo externo – Onycophora).

4.5. Localização das proteínas Ubx e Abd-A nas pernas de pré-pupas de abelhas

Uma vez que apenas *ubx* e *abd-A* mostraram ser diferencialmente expressos e as análises de seqüência de Ubx, um alto grau de identidade em relação aos outros insetos, foram feitas análises de imunolocalização das proteínas de Ubx e Abd-A usando-se um anticorpo monoclonal desenhado em um epitopo conservado entre as duas seqüências destas proteínas. Entretanto, os níveis de transcritos relativos a *abd-A,* já descritos no presente trabalho, são muito baixos, assim, considera-se que a maior parte da marcação com o anticorpo FP6.87 se refere a Ubx, cujo gene apresenta altos níveis de transcritos em operárias L5PP e Pw e menores níveis em rainhas. Desta forma, visando relacionar a função de Ubx durante o desenvolvimento de pernas posteriores de abelhas, foi comparada a localização de Ubx nas pernas de rainhas e operárias L5PP.

Os níveis de Ubx nas pernas são condizentes com os níveis de transcritos encontrados, ou seja, muito maiores em operárias. Observa-se na Figura 12 (B e D) que a quantidade de fluorescência nas pernas de rainhas é tão baixa que não foi possível fotografá-la, ou seja, há pouca quantidade de Ubx em pernas de rainhas L5PP. Nota-se maior concentração de Ubx no basitarso e na tíbia das pernas de operárias L5PP em relação aos outros segmentos, sendo ausente a marcação no tarso (Figura 12 A e C). Nas pernas de operárias Pw, encontra-se marcação na tíbia e em menores quantidades na coxa e no trocanter, local de inserção da perna ao tórax.

Em objetivas de aumento de 20X, observa-se que as pernas tanto de operárias quanto de rainhas L5PP, são formadas por faixas de células reconhecidas por seus núcleos celulares, nos quais se observa a presença de Ubx (Figuras 13 e 14 para operárias e Figura 15 para rainhas). Notam-se, também, aglomerados nucleares distribuídos de forma linear apenas no basitarso das operárias L5PP, nos quais não se encontra Ubx (Figuras 13 e 14).

A tíbia de operárias aparentemente não é composta por faixas de células nem são notáveis aglomerados nucleares. Neste segmento das pernas de operárias, há a localização de Ubx no núcleo

das células, assim como pode ser visto no basitarso (Figura 16) Contudo, a tíbia de rainhas é formada por faixas celulares assim como o basitarso, e não se observa aglomerados nucleares semelhantes àqueles do basitarso de operárias. E, além de não haver marcação de Ubx nos núcleos da tíbia de rainhas, parece existir Ubx fora deles (Figura 17).

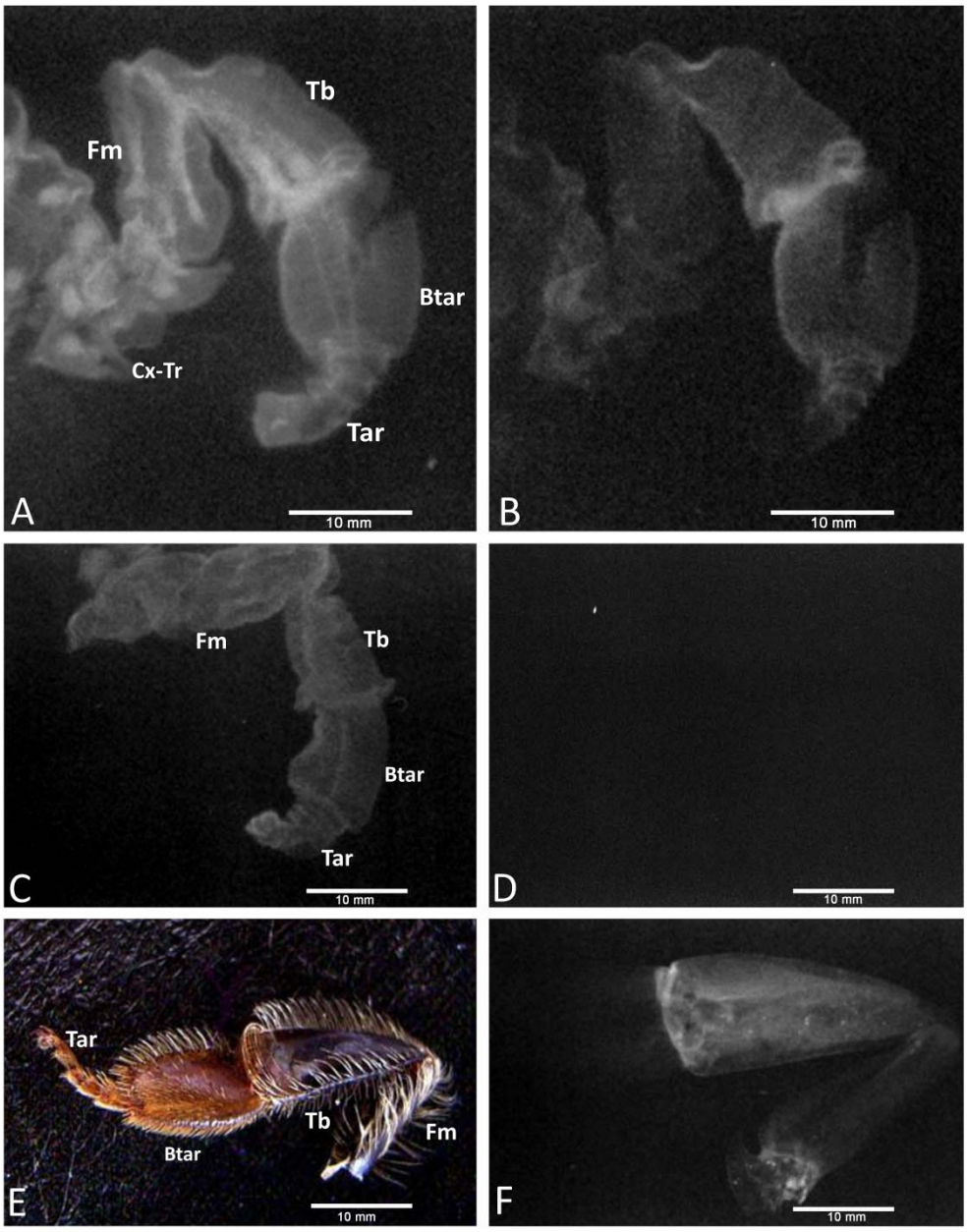


Figura 12: Imunohistoquímica em pernas de pré-pupas de operárias e rainhas e pupas de operárias de *A. mellifera*. **A**: perna de pré-pupa de operária marcada com DAPI; **B**: perna de pré-pupa de operária marcada com anticorpo FP6.87 (anti-UBX); **C**: perna de pré-pupa de rainha marcada com DAPI; **D**: perna de pré-pupa de rainha marcada com anticorpo FP6.87 (anti-UBX) – notar a ausência de marcação; **E**: perna de operária adulta; **F**: perna de operária em fase de pupa de olho branco, marcada com anticorpo FP6.87 (anti-UBX). **Cx-Tr**: coxa e trocanter; **Fm**: fêmur; **Tb**: tíbia; **Btar**: basitarso; **Tar**: tarso.

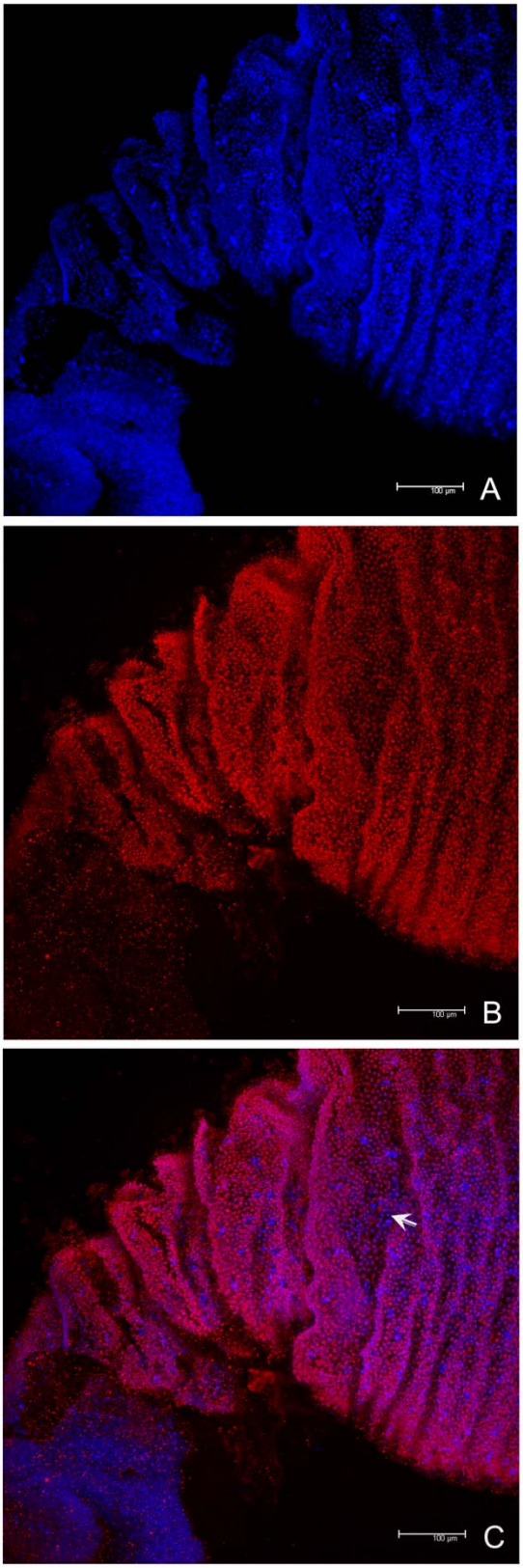


Figura 13: Imunohistoquímica em pernas posteriores de pré-pupas de operárias de *A. mellifera*, detalhe do basitarso e do tarso. **A**: DAPI; **B**: anticorpo FP6.87 (anti-UBX); **C**: sobreposição das imagens A e B. Região distal à esquerda. Seta aponta os núcleos sem expressão de Ubx.

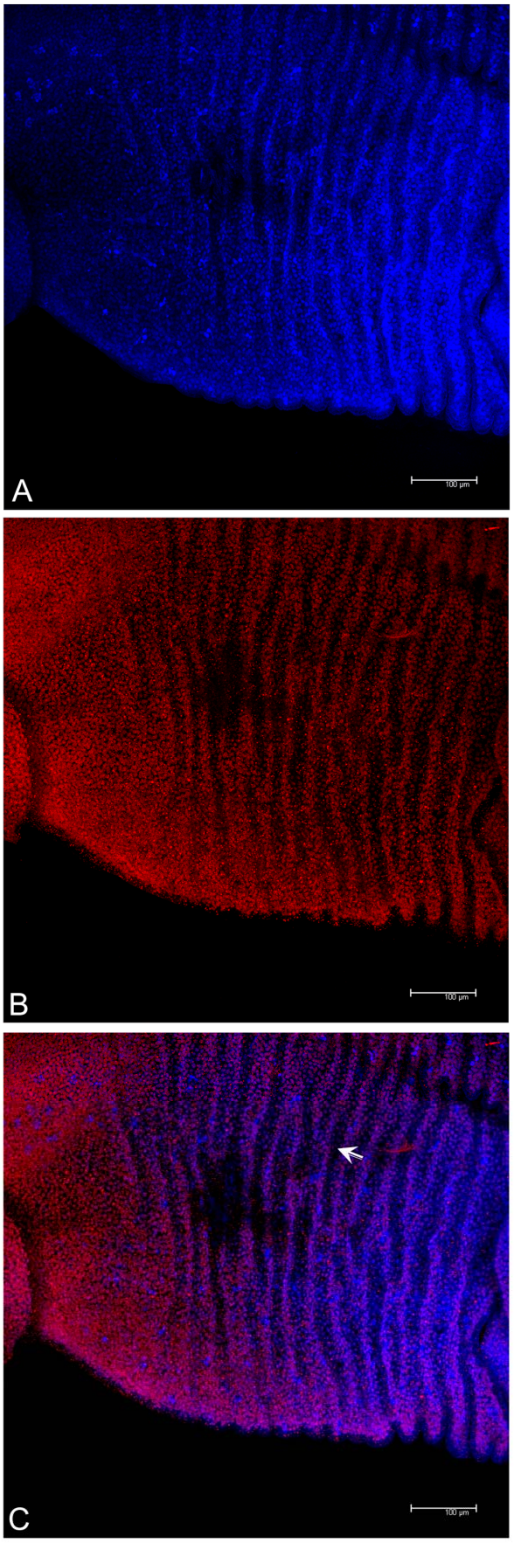


Figura 14: Imunohistoquímica em pernas posteriores de operárias pré-pupas de *A. mellifera*, detalhe do basitarso. **A**: DAPI; **B**: FP6.87 (anti-Ubx); **C**: sobreposição das imagens A e B. Região distal à direita. Seta aponta arranjo de núcleos celulares em fileira.

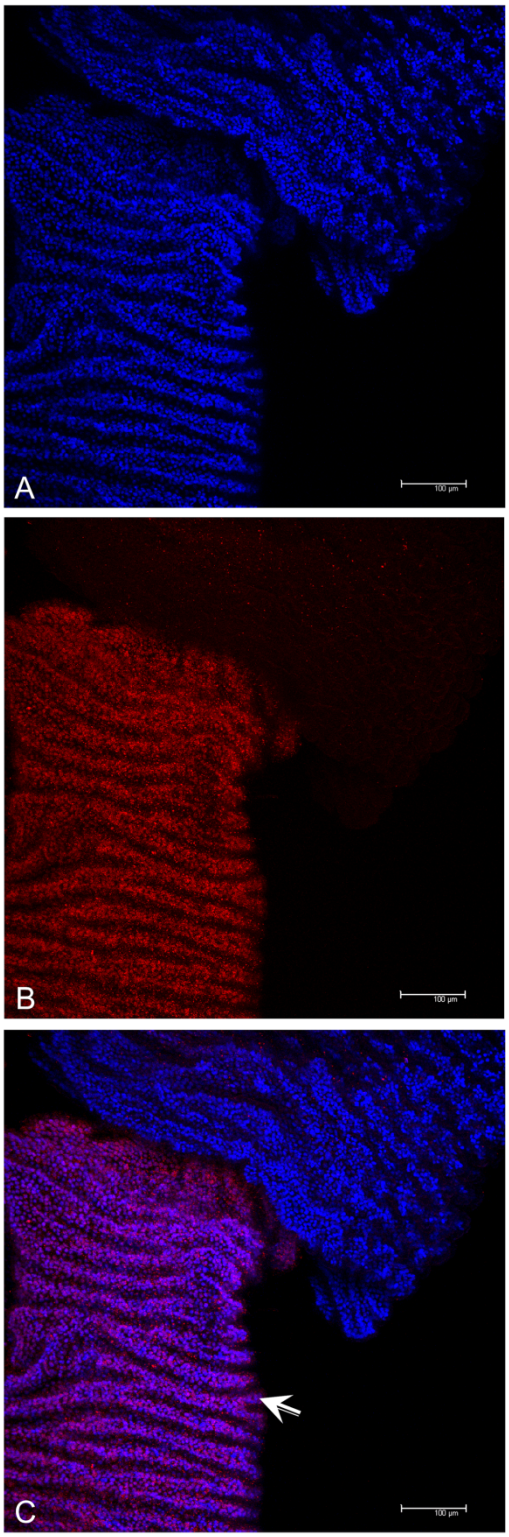


Figura 15: Imunohistoquímica em pernas posteriores de pré-pupas de rainhas de *A. mellifera*, detalhe da tíbia e do basitarso. **A**: DAPI; **B**: anticorpo FP6.87 (anti-UBX); **C**: sobreposição das imagens A e B. Região distal abaixo. Seta aponta arranjo de núcleos celulares em fileira.

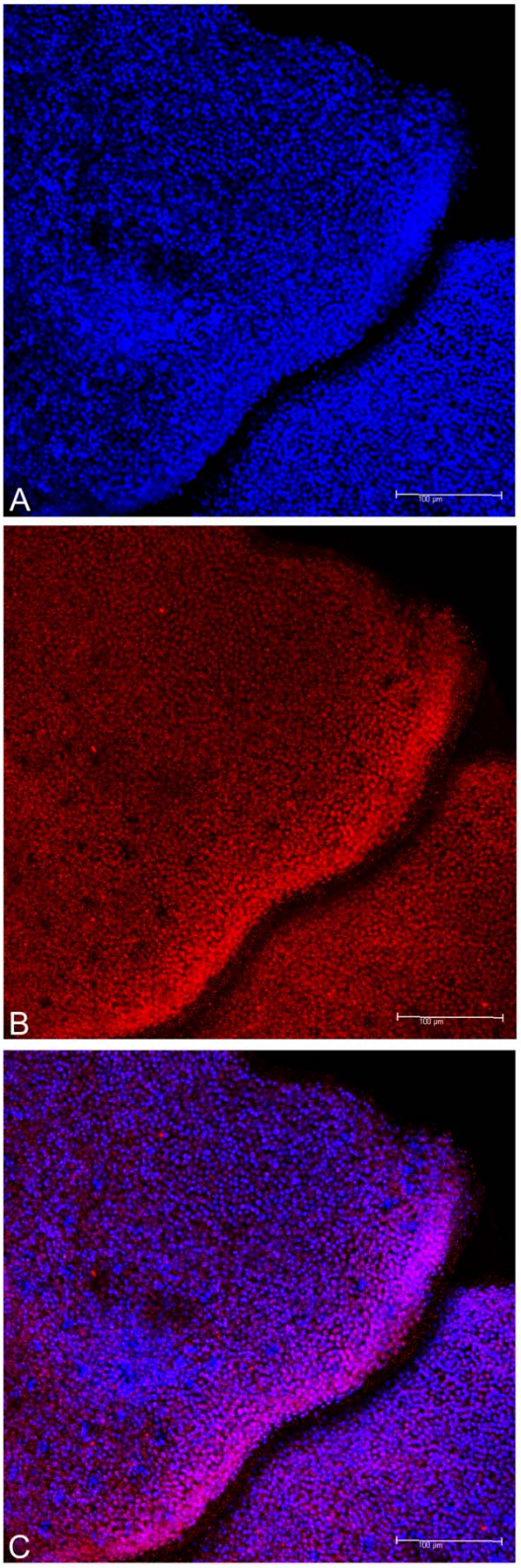


Figura 16: Imunohistoquímica em pernas posteriores de pré-pupas de operárias de *A. mellifera*, detalhe da tíbia e do basitarso. **A**: DAPI; **B**: anticorpo FP6.87 (anti-UBX); **C**: sobreposição das imagens A e B. Região distal abaixo e à direita.

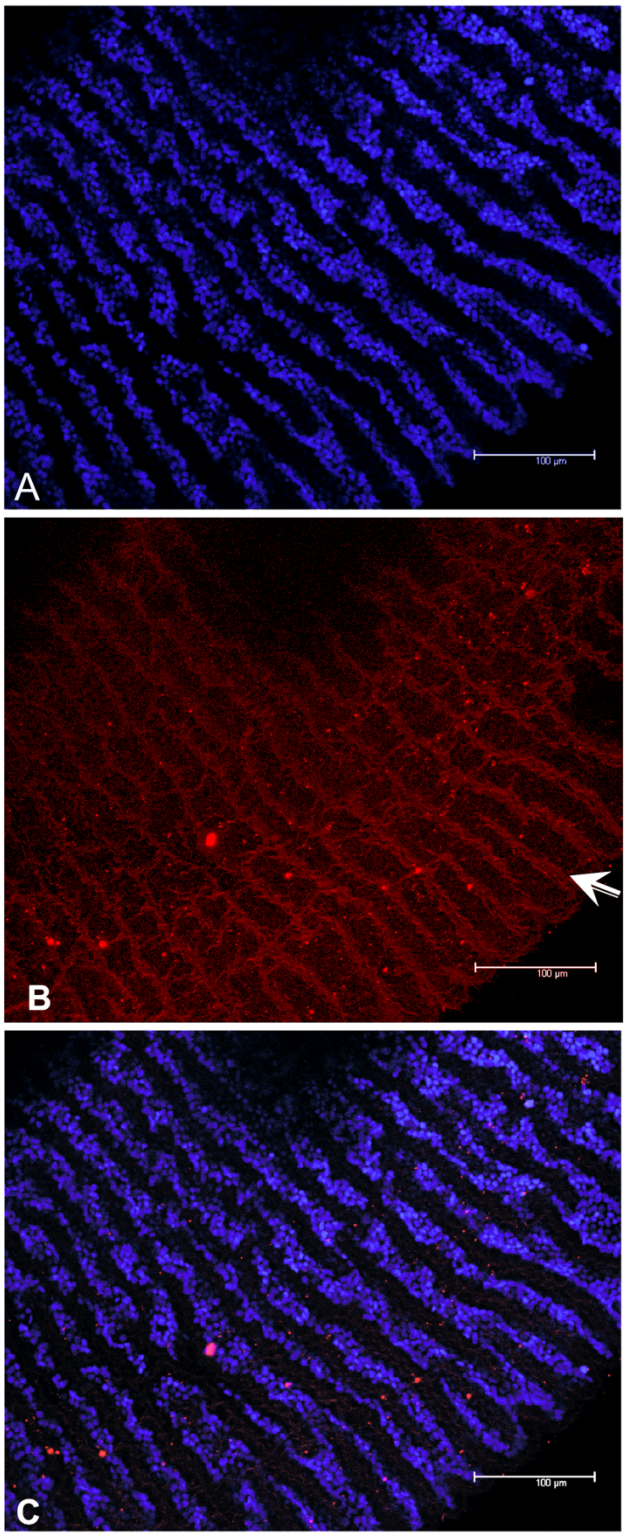


Figura 17: Imunohistoquímica em pernas posteriores de pré-pupas de rainhas de *A. mellifera*, detalhe da tíbia. **A**: DAPI; **B**: anticorpo FP6.87 (anti-UBX); **C**: sobreposição das imagens A e B. Região distal abaixo e à esquerda. Seta aponta localização de Ubx fora do núcleo.

4.6. Busca de regiões secretoras em Ubx

Apesar de Ubx ser um homeobox, ou seja, um fator de transcrição, nos experimentos de imunolocalização, foi encontrado fora dos núcleos celulares. Foram, então, feitas analises por buscas por peptídeo sinal na região no gene *ubx* para que se pudesse entender tal resultado. Assim,foi utilizado o programa SignalP, mas nenhum peptídeo sinal foi identificado em *ubx.*

Outro programa, o SecretomeP, que busca regiões que permitam que a proteína seja secretada, embora não haja um peptídeo sinal nela, foi também utilizado. Assim, com um valor de NN-score acima de 0,5 e nenhum peptídeo sinal identificado, a proteína foi classificada, pelo programa, como uma "proteína secretada não-clássica". Foram analisadas as mesmas seqüências de Ubx submetidas ao alinhamento com Clustal-X e Abd-A como um controle.

Assim, as seqüências de Ubx de insetos e também de *A. kaputensis* analisadas no presente trabalho apresentam valores acima de 0,5 e nenhum peptídeo sinal, podendo ser classificadas como "proteínas secretadas não-clássicas" e Abd-A apresenta valor menor que 0,5 e nenhum peptídeo sinal (Figura 18).

SecretomeP 1.0f predictions

# Name	NN-score	Odds	Weighted by prior	Warning
AgUBX	0.650	1.681	0.003	-
AkUBX	0.725	2.392	0.005	-
AmAbd-A	0.413	0.792	0.002	-
AmUBX	0.744	2.565	0.005	-
DmBUBX	0.583	1.389	0.003	-
JcUBX	0.776	2.939	0.006	-
NvUBX	0.578	1.353	0.003	-
TcUBX	0.545	1.220	0.002	-

Figura 18: Busca por "proteínas secretadas não-clássicas" nas seqüências de diferentes insetos, utilizando o programa SecretomeP. **NN-score**: valores acima de 0,5 indicam que a proteína pode ser secretada do núcleo. **Warning**: presença ou ausência de peptídeo sinal. **Ag** - *Anopheles gambiae* (Diptera); **Ak** - *Akanthokara kaputensis* (Onicophora); **Am** – *Apis mellifera* (Hymenoptera); **Dm** - *Drosophila melanogaster* (Diptera);.**Jn** - *Junonia coenia* (Lepidoptera); **Nv** - *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera); e **Tc** - *Tribolium castaneum* (Coleoptera). AmAbd-A foi usada como controle.

5. Discussão

O desenvolvimento diferencial a partir de um mesmo genótipo tendo como conseqüências a formação de dois morfos diferentes que possuem divisão reprodutiva e de trabalho dentro de espécies eussociais tem como um dos modelos de estudo as abelhas *Apis mellifera*. Neste trabalho, buscou-se entender os mecanismos que levam ao desenvolvimento diferencial do terceiro par de pernas das castas de abelhas. Como base para esta abordagem, foram utilizados, inicialmente, genes diferencialmente expressos em operárias e rainhas, descritos em estudos prévios realizados em nosso laboratório (Barchuk *et al.*, 2007), bem como, outros com funções relacionadas ao desenvolvimento de pernas de insetos, encontrados na literatura.

As estruturas importantes para a coleta de pólen e própolis localizadas no terceiro par de pernas das operárias são formadas por arranjo diferencial de cerdas (Snodgrass, 1956). Sabe-se que a diferenciação das pernas em abelhas se dá entre o quarto e o quinto estágio larval de desenvolvimento (Dedej *et al.*, 1998) e que as cerdas, bem como as estruturas casta-específicas destes apêndices, já estão formadas no estágio de pupa de olho marrom. Assim, foram feitas análises de expressão de genes que, em outros insetos, são relacionados ao desenvolvimento de pernas, de cerdas e de resposta a sinais hormonais durante o desenvolvimento das pernas de abelhas entre o estágio L4 e Pw.

5.1. Sobre a expressão de atx-2, crc, RfaBp, gug e dac durante o desenvolvimento de pernas posteriores em castas de abelhas melíferas

A proteína do gene *atx-2*, em *Drosophila*, no desenvolvimento dos apêndices, age como um organizador dos monômeros de actina, formando filamentos e na ausência dessa atividade da Atx-2

as cerdas são bifurcadas e retorcidas (Satterfiel *et al.*, 2002). As cerdas são arranjadas inicialmente em pacotes paralelos de feixes de actina que se organizam em unidades repetidas (Tilney *et al.*, 1996). Esses pacotes são transitórios até que haja a deposição da cutícula sobre eles e então são desfeitos (Satterfield *et al.*, 2002). Inicialmente, pensou-se que este gene fosse essencial no desenvolvimento diferencial das pernas de abelhas, já que demonstrou ser diferencialmente expresso em corpos inteiros de larvas de operárias e rainhas em análises de *microarrays* (Barchuk *et al.* 2007). Porém, neste trabalho mostrou-se que *atx-2* não é diferencialmente expresso nos tecidos que darão origem às pernas posteriores, embora rainhas apresentem maior quantidade de transcritos. Talvez isso se deva ao fato de que ambas as castas apresentem cerdas nas pernas, no entanto, o número destas é relativamente menor nas operárias já que a corbícula é formada essencialmente por uma região desprovida de cerdas. Operárias e rainhas apresentam o mesmo perfil de expressão gênica de *atx-2* nos discos imaginais das pernas posteriores, o que indica que possivelmente este gene esteja sob o controle dos mesmos fatores, independente do resto do corpo onde esse gene parece ser regulado diferentemente nas castas.

O produto protéico do gene *atx-2*, no entanto, apresenta um domínio de ligação a poliribossomos e à proteína de ligação à cauda poli(A) dos mRNAs, um elemento regulador da tradução. Estudos em *Drosophila* mostram que Atx-2 ativa ou inibe a tradução de genes-alvo (Satterfield & Pallanck, 2006), além de ter funções na formação dos olhos (Satterfiel *et al.*, 2002). Assim, a expressão gênica diferencial encontrada para *atx-2* nos experimentos prévios (Barchuk *et al.*, 2007), pode estar associada às demais funções do gene em outros tecidos de abelhas e não à formação das pernas.

Os discos imaginais das pernas se distendem logo após o término da fase de defecação, como parte da metamorfose. Em *Drosophila*, a muda metamórfica é controlada por pulsos de ecdisona (Riddiford, 1993), os quais parecem requerer a atividade do gene *crc* (Hewes *et al.*, 2000). Genes de resposta a ecdisteróides e Crc ativam a expressão de *Ecdysis triggering hormone* (ETH) por

ligação ao seu promotor (Gauthier & Hewes, 2006), o qual inicia cascatas de sinais hormonais gerados por peptideos e neuropeptídeos que levam ao declínio dos níveis de ecdisona (Ewer & Reynolds, 2002). Na ausência de Crc, os níveis de ETH são reduzidos e os organismos apresentam anomalias na ecdise. Altos títulos de ecdisona levam à formação do pupário e mutantes *crc*$^{-}$ apresentam defeitos na formação do pupário e conseqüentemente, na pupação. De forma semelhante a diversos genes de resposta a ecdisona, mutantes *crc*$^{-}$ apresentam problemas na elongação dos discos imaginais (Hewes *et al*., 2000). Em abelhas, a maior expressão de *crc*, nos discos imaginais das pernas de operárias e rainhas, acontece momentos antes da elongação dos mesmos, o que pode ser resposta ao pico de ecdisona na fase L5PP1. Os níveis de ecdisteróides aumentam precocemente em rainhas, o mesmo acontece com os transcritos de *crc*, mas em pupa de olho branco os mesmos níveis são detectados nas duas castas (Figura 19).

Altos níveis do ortólogo a *crc* em vertebrados, *ATF-4*, são encontrados em momentos de *stress* celular como privação de aminoácidos (Jousse *et al*., 2003). Quando comparadas às rainhas, as operárias recebem menos aminoácidos em sua alimentação larval, menos geléia real, o que pode também alterar a taxa de transcrição de *crc*, em outros órgãos que não as pernas, tornando-o mais expresso em corpo todo de operárias do que em rainhas.

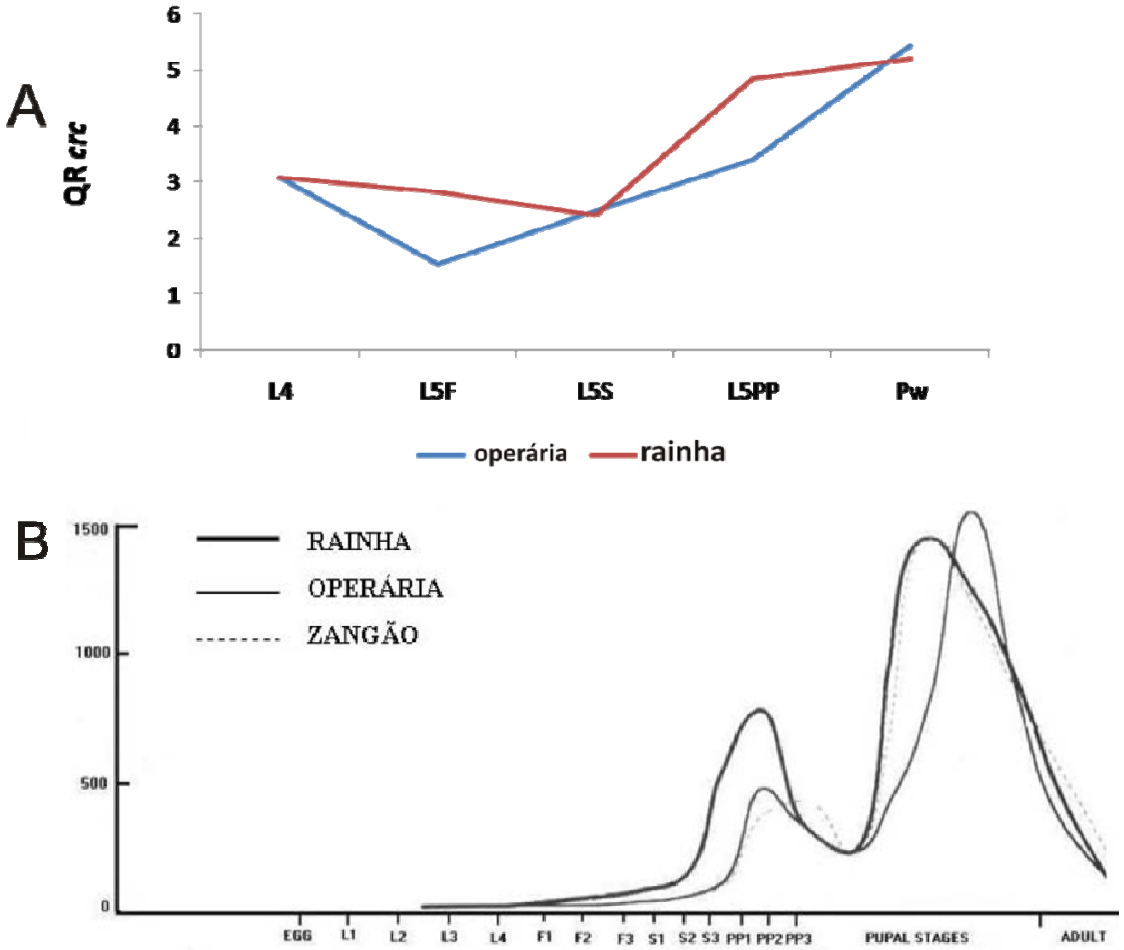


Figura 19: Comparação entre os perfis de expressão de *cryptocephal* nos discos imaginais das pernas posteriores e os títulos de ecdisteróides circulantes na hemolinfa ao longo do desenvolvimento de operárias e rainhas de *A. mellifera*. **A**: Perfil de expressão do gene *cryptocephal* durante o desenvolvimento das pernas posteriores de operárias e rainhas de *A. mellifera*, por RT-PCR em Tempo Real. As linhas azuis correspondem aos perfis de expressão gênica em operárias e as linhas vermelhas a rainhas. **QR**: quantificação relativa dos transcritos **B:** Títulos de ecdisteróides ao longo do desenvolvimento e na emergência de operárias, rainhas e zangões de *A. mellifera* (modificado de Rachinsky *et al*., 1990, Feldlaufer *et al.,* 1985 e Pinto *et al*., 2002). Os valores devem ser considerados relativos, já que os dados foram organizados através de trabalhos empregando diferentes metodologias. Fases: **L2-3-4** (larva de segundo, terceiro e quarto 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).

Os genes de resposta ao HJ, hormônio essencial na diferenciação de castas em abelhas, também devem ser considerados. *RfaBp*, por exemplo, foi encontrado diferencialmente expresso entre as castas e reprimido por HJ, tanto durante o desenvolvimento larval, quanto em abelhas adultas (Barchuk *et al*., 2007; Whitfield *et al*., 2006). Barchuk e colaboradores (2007), acreditam que juntamente com *crc* e *usp*, *RfaBp* inicie importantes funções na regulação das maiores mudanças fenotípicas durante o desenvolvimento das abelhas. Entretanto, assim como *crc*, *RfaBp* não foi encontrado diferencialmente expresso entre as castas durante o desenvolvimento das pernas. Porém, o perfil de expressão deste último parece ser regulado da mesma maneira em ambas castas, tendo os níveis de transcritos aumentados na ausência de HJ no início do estágio pupal (Figura 20).

Além destes sinais extrínsecos hormonais, cada região e segmento das pernas são regulados também por sinais intrínsecos, como os produtos de *gug*, *dac* e *dll*. Gug controla a identidade das células proximais das pernas. Células carregando mutações *gug*$^{-}$, localizadas na parte posterior ou lateral das pernas de *Drosophila* induzem maior quantidade de cerdas quando comparadas ao tipo selvagem (Erkner *et al.*, 2002). Desta maneira, seria esperado que rainhas tivessem maiores níveis de transcritos de *gug* durante o desenvolvimento das pernas do que operárias, já que possuem maior quantidade de cerdas nas pernas, apesar de resultados prévios indicarem maior expressão em corpo todo de operárias (Barchuk *et al*., 2007). Contudo, não há diferenças na quantidade de transcritos entre operárias e rainhas, o que indica que a quantidade de cerdas nas pernas das abelhas não é controlada por *gug* e sim por outros fatores.

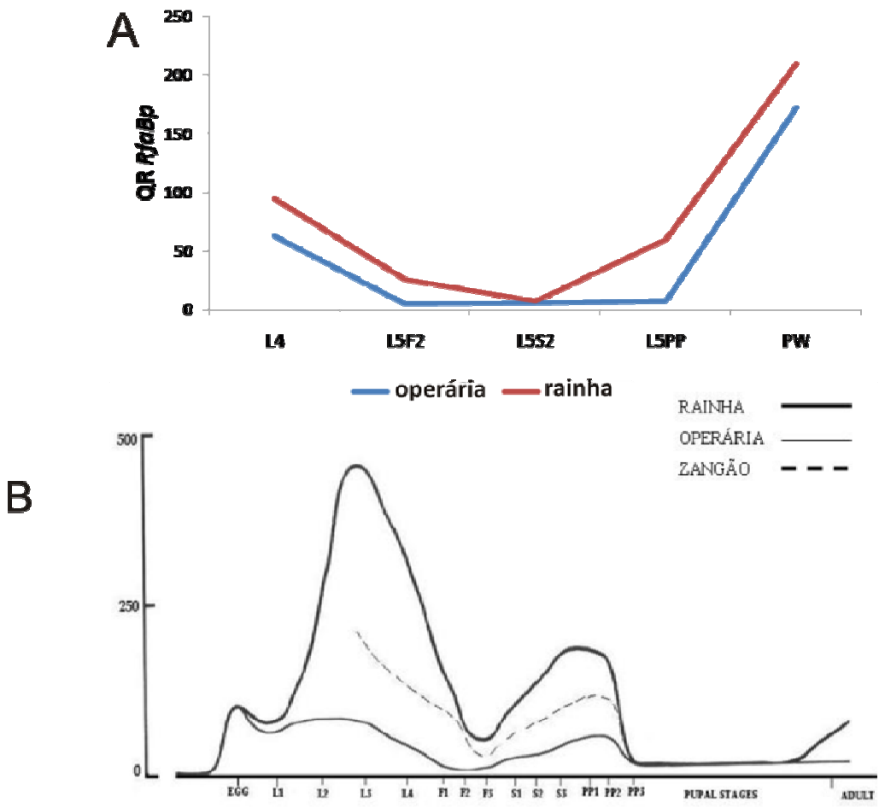


Figura 20: Comparação entre os perfis de expressão de *Retinoic and fat acid Binding Protein* nos discos imaginais das pernas posteriores e os títulos de Hormônio Juvenil circulantes na hemolinfa ao longo do desenvolvimento de operárias e rainhas de *A. mellifera*. **A**: Perfil de expressão do gene *Retinoic and fat acid Binding Protein* durante o desenvolvimento das pernas posteriores de operárias e rainhas de *A. mellifera*, por RT-PCR em Tempo Real. As linhas azuis correspondem aos perfis de expressão gênica em operárias e as linhas vermelhas a rainhas. **QR**: quantificação relativa dos transcritos **B**: Títulos de Hormônio Juvenil ao longo do desenvolvimento e na emergência de operárias, rainhas e zangões de *A. mellifera* até a emergência das abelhas (modificado de Rembold, 1987; Rachinsky et al., 1990). Os valores devem ser considerados relativos, pois os dados foram organizados através de trabalhos empregando diferentes metodologias. Fases do desenvolvimento larva: **L2-3-4** (larva de segundo, terceiro e quarto 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); **QR**: quantificação relativa.

Outro gene previamente encontrado como preferencialmente expresso em operárias pelas análises de *microarrays* (Barchuk, *et al*. 2007) e relacionado ao desenvolvimento das pernas foi *dac*. Em *Drosophila*, Dac regula o desenvolvimento dos segmentos intermediários das pernas (fêmur, tíbia e tarso proximal), bem como o desenvolvimento dos olhos e corpos cogumelares (Mardon *et al*., 1994; Noveen *et al.*, 2000). Em abelhas a corbícula se localiza na tíbia, domínio de expressão de *dac* em operárias Pw. Entretanto, *dac* não foi encontrado como diferencialmente expresso durante o desenvolvimento de pernas posteriores de abelhas, o que indica que a formação da corbícula deve ser independente de *dac* e dependente de outros fatores.

Estruturas como os corpos cogumelares, no entanto, são maiores em operárias recém-emergidas que em rainhas (Lucht-Bertram, 1962; Michener, 1974) e estas estruturas estão envolvidas com diversas formas de aprendizado como aquelas desenvolvidas durante a vida adulta de operárias (Davis, 2001; Gerber *et al.,* 2004; Liu *et al*., 1999; Mizunami *et al.,* 1993). Desta forma, a maior expressão de *dac* encontrada em corpo todo de larvas de operárias por Barchuk e colaboradores (2007) pode estar relacionada ao desenvolvimento diferencial.

5.2. Sobre o controle da expressão de dll por Ubx durante o desenvolvimento de pernas posteriores em castas de abelhas

A identidade dos segmentos distais das pernas e a localização das mesmas apenas no tórax dos insetos é dada pela expressão de *Dll* (Abu-Shaar & Mann, 1998; Wu & Cohen, 1999; Cohen *et al.*, 1993). Análises de expressão gênica de *dll* nos segmentos das pernas de operárias Pw indicam uma função conservada durante a evolução para a expressão de *dll* nos segmentos distais, sendo mais expresso no tarso e basitarso em relação aos outros segmentos de abelhas bem como de outros insetos (revisado por Angelini & Kaufman, 2005). Em *Drosophila*, *dll* é expresso também na porção

distal da tíbia (Wu & Cohen, 1999) o que justifica a expressão encontrada neste segmento em abelhas por análises de qRT-PCR.

Nos insetos, a localização da expressão de *dll* e, conseqüentemente, a localização das pernas apenas no tórax é dada pela expressão das proteínas HOX Ubx e Abd-A. Contudo, a expressão de Ubx no segmento A1 de insetos hemimetábolos e Coleoptera (Bennett *et al*., 1999) leva à formação de pleuropódios (pernas derivadas) e não à inibição da formação de apêndices, como pode ser visto nos insetos holometábolos como Diptera e Lepidoptera (Vachon *et al.*,1992; revisado por Angelini & Kaufman, 2005). Essa repressão de *dll* por Ubx é direta por ligação ao promotor de *dll* e dependente de interação com Extradenticle (Exd) (Figura 21-A) (Grenier & Carroll, 2000).

Em abelhas, comparando os perfis de expressão de *ubx* e *dll*, tanto em operárias quanto em rainhas, nota-se uma diminuição de transcritos de *dll* e um aumento dos de *ubx* ao longo do desenvolvimento (Figura 21-B). As imunolocalizações de Ubx nas pernas de operárias Pw mostram maior concentração desta proteína na tíbia, enquanto os transcritos de *dll* aparecem em menores quantidades na tíbia que no basitarso em abelhas da mesma fase. O sítio de ligação de Ubx e Exd em *Drosophila* foi descrito por Ekker e colaboradores (1991) e estudos preliminares *in silico* (dados não mostrados aqui), indicam que o promotor de *dll* em *A. mellifera* possui o sítio para ligação de Ubx, indicando, indiretamente, que pode haver uma regulação da expressão de *dll* por Ubx ao longo do desenvolvimento e nos segmentos das pernas de abelhas. De qualquer maneira, para confirmar o controle da expressão de *dll* por Ubx, são necessários mais estudos, tais como hibridação *in situ* de *dll* juntamente com imunolocalização de Ubx ou ainda *knock-down* de *ubx*.

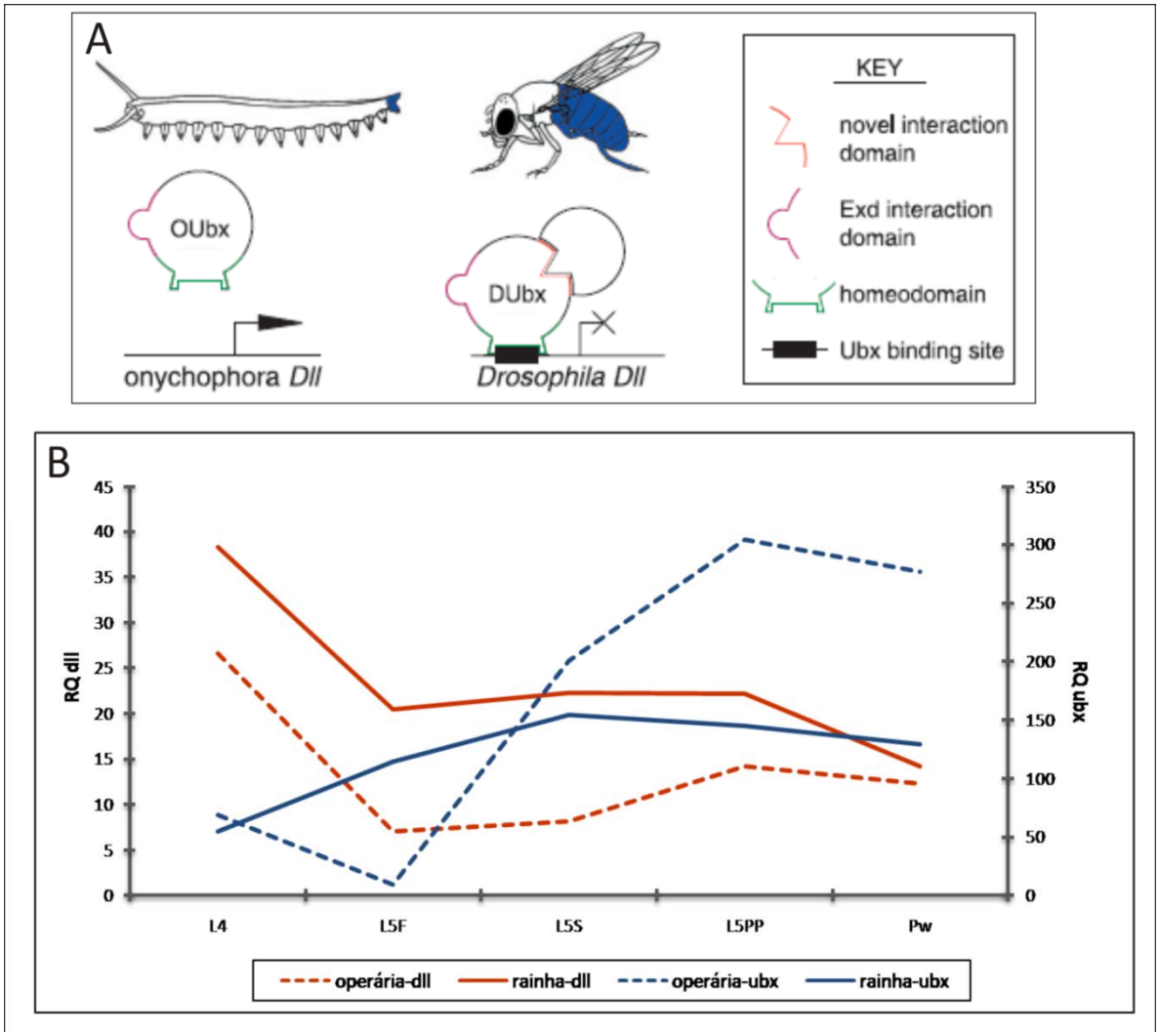


Figura 21: Inibição de *distal-less* (*dll*) por Ultrabithorax (Ubx). **A**: Evolução da função de Ubx, que em *Drosophila* se liga ao promotor de *dll* impedindo a transcrição, por ligação a um sítio de ligação na região promotora de *dll* – modificado de Grenier e Carroll, 2000. **B**: Expressão de *ubx* e *dll* ao longo do desenvolvimento das pernas posteriores de operárias e rainhas de *A. mellifera*, mostrando a diminuição da expressão de *dll* (eixo y da esquerda) com o aumento da expressão de *ubx* (eixo y da direita), sugerindo uma inibição de *dll* por Ubx.

Outro gene Hox da mesma família de *ubx* e de função semelhante na regulação de *dll* no desenvolvimento embrionário de insetos é *abd-A*, que parece ser regulado, em operárias e rainhas, pelos mesmos fatores durante o desenvolvimento diferencial de pernas, entretanto, na fase de pupa de olho branco se torna muito mais expresso em operárias.

5.3. A função de Ubx na determinação do desenvolvimento diferencial das pernas posteriores de A. mellifera

Em Ortoptera, a expressão tardia de Ubx e Abd-A nas pernas posteriores, chamadas de *jumping legs*, está associada ao crescimento diferencial destas (Mahfooz *et al.*, 2004). A identidade e o comprimento das pernas metatorácicas de *Drosophila* também são dados por Ubx (Akam, 1983; White & Wilcox, 1984; Stern, 2003). Contrariamente, o crescimento diferencial de asas em relação aos halteres de *Drosophila* é dado pela expressão de Ubx nos halteres, restringindo de maneira indireta a expressão de *decapentaplegic* (*dpp*) (molécula relacionada ao *transforming growth factor β* - TGFβ - em insetos) (Crickmore & Mann, 2006). Entretanto, as abelhas *A. mellifera*, tanto operárias quanto rainhas, apresentam o par posterior de pernas relativamente maior que os outros dois, porém a diferenciação de pernas entre as castas se dá por modificação da morfologia, ou seja, pela formação da corbícula e outras estruturas características de operárias. Na região onde a corbícula se forma há uma cerda solitária na porção distal da tíbia, a qual parece ser mecanossensorial devido ao tipo de inserção da cerda ao soquete, enquanto no basitarso há cerdas mais grossas e curtas que aquelas presentes na corbícula de operárias e nas pernas posteriores de rainhas, como podem ser vistas nas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.

A formação das cerdas encontradas no basitarso das pernas mesotorácicas de *Drosophila* é influenciada pela expressão ectópica de Ubx, que as torna mais grossas e longas, como as presentes

nas pernas metatorácicas (Rozowski & Akam, 2002). Em *A. mellifera*, nas pernas posteriores de PP, há a expressão de Ubx na tíbia apenas de operárias e no basitarso de ambas. Entretanto, no basitarso de operárias, de maneira diferente que o observado em rainhas, há aglomerados de células que não expressam Ubx, cujo arranjo lembra ao da escova-de-polén, que futuramente estará localizada neste segmento da perna. Tal fato sugere que o arranjo e a localização de cerdas nesta estrutura, característica de pernas de operárias, sejam determinados pela ausência de Ubx nesta fase do desenvolvimento.

As tíbias das pernas mesotorácicas e metatorácicas de *Drosophila* apresentam cerdas mecanossensoriais características de cada uma. O par de pernas mesotorácico apresenta uma cerda apical e uma pré-apical, ambas compridas e grossas, enquanto o par de pernas posterior apresenta apenas a cerda pré-apical, a qual é bem mais fina que a da outra perna. Durante o desenvolvimento, Ubx é expresso em ambos os discos imaginais, apesar de ser consistentemente mais expresso no par de pernas metatorácicas (Brower, 1987). Da mesma forma, em abelhas, há a formação de estruturas casta-específicas nas pernas e maior expressão de *ubx* nos discos imaginais e nas pernas de pupas de operárias.

Rozowski e Akam (2002) estudaram o desenvolvimento diferencial destas cerdas mecanossensoriais de *Drosophila* sob a influência de Ubx. Com a expressão ectópica de Ubx no par de pernas mesotorácicas a cerda apical não é modificada, entretanto a cerda pré-apical se torna semelhante àquela encontrada na perna posterior. Da mesma forma, a remoção de Ubx da perna metatorácica leva a formação de cerda pré-apical característica do segundo par de pernas.

Além disto, espécies irmãs de *Drosophila* (*D. melanogaster* e *D. simulans*) apresentam uma região denominada “vale nu” na perna posterior, onde não há tricomas, enquanto *D. virilis* (evolutivamente mais distante) não apresenta essa região sem tricomas. Análises de hibridação *in situ* mostram maior expressão de Ubx na região onde não há a presença de tricomas nas espécies relacionadas e nenhuma diferença de expressão na perna posterior de *D. virilis*, indicando que a

presença mais tardia de Ubx no desenvolvimento inibiria a formação de tricomas nas pernas (Stern, 1998).

Na tíbia das pernas metatorácicas de abelhas, como dito anteriormente, há a localização diferencial de cerdas entre as castas, que nas operárias, caracteriza a corbícula. Observações sobre a localização de transcritos de *ubx* por qRT-PCR e imunolocalização de Ubx, nas pernas posteriores de operárias Pw de *A. mellifera*, indicam transcrição de *ubx* em todos os segmentos, mas tradução e localização da proteína, apenas nos núcleos da tíbia. Também na tíbia das pernas posteriores, mas de pré-pupas de operárias, há alguns núcleos nos quais não se localiza Ubx ou há menos desta proteína, revelando um controle local da distribuição desta.

Sugere-se que a interação de genes Hox (p.e., Ubx) com elementos regulatórios do complexo Achaeta Scute (AS-C), em *Drosophila*, seja responsável pela alocação de cerdas sensoriais individuais segmento-específico (Gerhart & Kirschner, 1997; Rozowski & Akam, 2002). Estas cerdas são formadas por distintas identidades moleculares derivadas de uma fina modelagem das pernas durante o final do estágio larval e início do estágio pupal do desenvolvimento, baseadas nas diferentes morfologias da ramificação do neurônio associado a elas (Murphey *et al*., 1989; Rozowski & Akam, 2002). As interações entre os genes homeóticos e o desenvolvimento dos órgãos sensoriais deve ter evoluído independentemente em muitas ocasiões, afetando diferentes passos moleculares, nos quais foram fixadas diferentes interações entre Ubx e as vias de desenvolvimento de cerdas individuais, não afetando outras características morfológicas (Rozowski & Akam, 2002).

Em abelhas, a expressão tardia de Ubx nas pernas posteriores de operárias pode ser responsável pela regulação espaço-temporal do desenvolvimento destas cerdas sensoriais. Assim, os dados apresentados no presente trabalho indicam que a expressão tardia de Ubx forma um campo morfogenético durante o desenvolvimento das pernas posteriores de operárias de *A. mellifera*, o que localiza diferencialmente as cerdas sensoriais na tíbia, caracterizando, como dito acima, a corbícula.

5.4. A localização de Ubx fora do núcleo em pernas de pré-pupas de rainhas de A. mellifera

A proteína Ubx não foi localizada nos núcleos das células da tíbia de rainhas, mas sim em regiões entre os agrupamentos destes. Entretanto, há alguns controles que precisam ser feitos para que se possa afirmar se esta marcação obtida com o anticorpo FP6.87 é Ubx ou Abd-A.

Em análises de seqüências protéicas preditas de Ubx notam-se quatro regiões de inserção em *A. mellifera*, em relação às seqüências de Ubx de outros insetos (Figura 22), estas compartilhadas com *N. vitripennis*, sendo que duas delas se localizam dentro dos domínios conservados de Ubx descritos apenas para os insetos. Análises utilizando-se o SecretomeP (programa que analisa a probabilidade de proteínas classicamente conhecidas como não secretadas, serem secretadas), prediz que Ubx de *A. mellifera*, bem como de outros insetos, mas não Abd-A de *A. mellifera*, pode ser secretado. Coerentemente, análises utilizando SignalP indicam que Ubx de *A. mellifera* não apresenta peptídeo sinal, podendo ser uma proteína secretada "não-clássica".

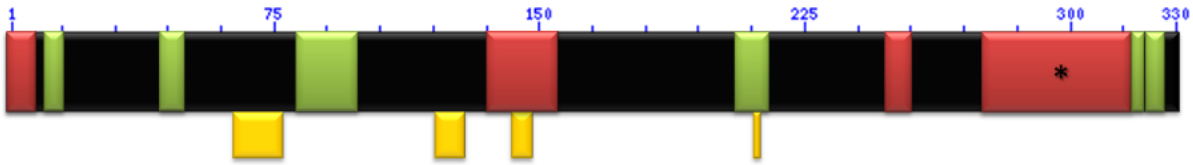
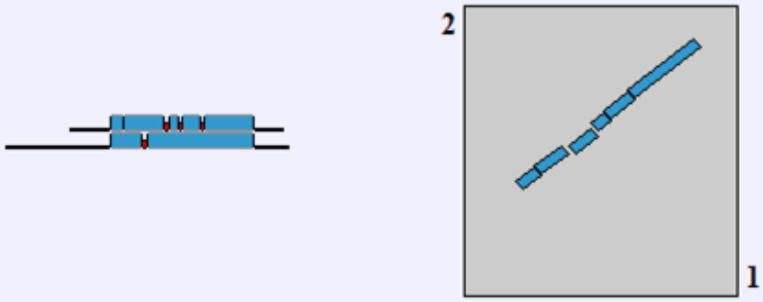


Figura 22: Representação esquemática dos domínios de Ultrabithorax de *A. mellifera* descritos por Galant e Carroll, 2002. Em preto, a seqüência protéica; os números indicam a posição dos aminoácidos na proteína; em vermelho, domínios conservados entre Onycophora e Insecta; em verde, domínios característicos de Insecta; em amarelo, inserções presentes na proteína Ultrabithorax de *A. mellifera*. O asterisco indica o domínio Homeobox.

Sabe-se que Engrailed 2 de galinhas, outro membro das proteínas Hox, pode ser exportado do núcleo e secretado após exercer sua função, assim como os HoxC8 de camundongo, ortológo de Ubx em vertebrados, e HoxB4 de galinha. Essas proteínas Hox possuem um domínio chamado cEN2-NES, que permite que as mesmas sejam exportadas do núcleo e secretadas da célula (Maizel *et al.*, 1999). Desta forma, Engrailed 2 pode ser transportado entre as células, processo o qual é regulado por uma cinase (CK2) (Maizel *et al.*, 1999; Maizel *et al.*, 2002). Assim, alinhando as seqüências preditas de Ubx de *A. mellifera* e seu ortólogo HoxC8 em camundongo, nota-se uma alta identidade entre ambas na região do domínio cEN2-NEs (Figura 23). Somando-se este àquele resultado de SecretomeP, então Ubx de *A. mellifera* poderia ser exportada do núcleo e secretada, sendo visto fora do núcleo apenas na tíbia de rainhas PP, onde não exerceria mais nenhuma função.

Sequence 1: mHOXC8
Length = 242 (1 .. 242)

Sequence 2: AmUbx
Length = 330 (1 .. 330)



NOTE:Bitscore and expect value are calculated based on the size of the nr database.

```
 Score =  105 bits (263),  Expect = 4e-21
 Identities = 72/168 (42%), Positives = 90/168 (53%), Gaps = 19/168 (11%)

Query  52   ASHHVQDFFHHGTSGI-SNSGYQQNPCSLSCHGDASKFYGYEALPRQSLYGAQQEASVVQ  110
            A+  V+D +   TSG  S S     P + +  G     YG        L G    +S
Sbjct  129  AAAAVKDVWQSATSGANSQSNSVVRPSACTPEGTRVGSYG-------GLVGGDPASSPGN  181

Query  111  YPDCKS------SANTNSSEGQG---HLNQNSSPSLMFPWMRPHAPG--RRSGRQTYSRY  159
                +S      + + NSS  Q     L+Q  +    +PWM        RR GRQTY+RY
Sbjct  182  NSSSRSLTSSWNTCSLNSSASQPVATQLHQQPTNHTFYPWMAIAGANGMRRRGRQTYTRY  241

Query  160  QTLELEKEFLFNPYLTRKRRIEVSHALGLTERQVKIWFQNRRMKWKKE  207
            QTLELEKEF  N YLTR+RRIE++H+L LTERQ+KIWFQNRRMK KKE
Sbjct  242  QTLELEKEFHTNHYLTRRRRIEMAHSLCLTERQIKIWFQNRRMKLKKE  289
```

Figura 23: Alinhamento da proteína Ultrabithorax de *A. mellifera* e seu ortólogo HoxC8 em camundongo. O quadrado vermelho indica a região descrita por Maizel e colaboradores (1999) como domínio cEN2-NEs de HoxC8, que torna essa proteína capaz de ser exportada do núcleo, região de alta identidade entre Ultrabithorax de *A. mellifera* (AmUbx) e HoxC8 de camundongo (mHoxC8).

5.5. Controles extrínsecos do desenvolvimento das pernas posteriores em abelhas

Mesmo nos dias de hoje, pouco se sabe sobre os mecanismos extrínsecos que regulam o desenvolvimento das pernas em insetos, menos ainda em abelhas. Sabe-se que em *Drosophila* a eversão dos discos é dependente de pulsos de ecdisona, como foi dito anteriormente (Riddiford, 1993), que em *Manduca sexta* a capacidade de eversão dos discos imaginais das asas (chamados *early-formed discs*, assim como os de *Drosophila* e *A. mellifera*) deve-se aos *insulin-like peptides*, os quais inibem a ação do HJ sobre os discos, permitindo o crescimento morfogenético destes, independente de ecdisona (Koyama *et al*., 2008). Em abelhas, sabe-se que a inibição de TOR, por *rapamycin* oferecido na alimentação de rainhas no quarto ou quinto estágio do desenvolvimento, leva à formação de pernas de operárias e o aparecimento das chamadas intercastas (Patel *et al.*, 2007).

É conhecido que o HJ influencia no crescimento e desenvolvimento dos discos imaginais. Na presença de HJ os discos apresentam apenas crescimento isomórfico, ou seja, aumento do número de células, enquanto na ausência deste hormônio, os discos apresentam o crescimento morfogenético (eversão) (revisado por Truman & Riddiford, 2007), podendo depender de ecdisona (*Drosophila*) ou não (*M. sexta*) (Riddiford, 1993; Koyama *et al*., 2008).

Em *M. sexta*, larvas impedidas de se alimentar durante o último estágio larval do desenvolvimento, não evertem os discos imaginais das asas, entretanto, larvas alatectomizadas e em inanição, os discos se desenvolvem normalmente, mostrando uma influencia do HJ na eversão dos mesmos (Truman, *et al*., 2006). No entanto, larvas alimentadas apenas com açúcar iniciam a transcrição de fatores de competência para se tornarem pupa, mas não se desenvolvem, ao passo que, se essas larvas forem alimentadas com açúcar e aminoácidos, então, se tornarão pupas. Mas, se são alimentadas apenas com aminoácidos não chegam nem a expressar os fatores de competência (Koyama *et al*., 2008). Do mesmo jeito, a injeção de *wortmannin* (inibidor da via de sinalização de

insulina), conduz à expressão dos fatores de competência, enquanto, injeções de *rapamycin* (inibidor de TOR – ligado à resposta à quantidade de aminoácidos) levam ao desenvolvimento normal das asas (Koyama *et al*., 2008).

Em abelhas, os níveis de transcritos de *TOR* são maiores em rainhas L3 e semelhantes entre as castas no quinto estágio do desenvolvimento larval (Patel *et al*., 2007; Barchuk *et al*., 2007). Contudo, os níveis da proteína TOR no corpo todo no quinto estágio larval influenciam o desenvolvimento diferencial das pernas posteriores (Patel *et al*., 2007). Os níveis de transcritos de *insulin-like peptide 1* (*ILP-1*) são maiores em rainhas L4 e L5F1, enquanto outros genes da via de insulina avaliados em abelhas não são diferencialmente expressos entre as castas no momento da diferenciação das pernas posteriores de abelhas (Wheeler *et al*., 2006). Uma vez que as vias de TOR e insulina/IGF estão ligadas por Akt (ou proteína cinase B-PKB) e FOXO (Forkhead box, Class O), além de outras proteínas efetoras, deve haver um controle da expressão de Ubx, através destas vias e através de TOR, em colaboração com ILP-1 (revisado por Mirth & Riddiford, 2007).

Por fim, é possível pensar em um modelo de regulação casta-específica do desenvolvimento diferencial das pernas posteriores de *A. mellifera*. Este seria inicialmente regulado pela alimentação diferencial. A alimentação das operárias, baseada em pólen, mel e pouca quantidade de geléia real, leva a uma menor expressão de *TOR* durante o terceiro estágio do desenvolvimento larval, que induz a baixa expressão de *ILP-1* no início do quinto estágio, permitindo a expressão de *ubx* nas pernas posteriores de pré-pupas, caracterizando as pernas de operárias.

A proteína Ubx forma dois domínios morfogenéticos nas pernas posteriores de operárias, um na tíbia ao final do desenvolvimento larval e início do desenvolvimento pupal, regulando a localização de cerdas sensoriais, formando a corbícula; e um segundo, dado pela ausência de Ubx em determinadas células do basitarso ao final do desenvolvimento larval, formando a escova-de-pólen (Figura 24). O contrário é esperado para rainhas; a alimentação destas, que disponibiliza uma maior quantidade de aminoácidos, ativa a transcrição de *TOR* no início do desenvolvimento diferencial das

castas, levando a inibição da transcrição de Ubx nas tíbias das pernas posteriores de pré-pupas impedindo a formação das estruturas presentes nas pernas de operárias.

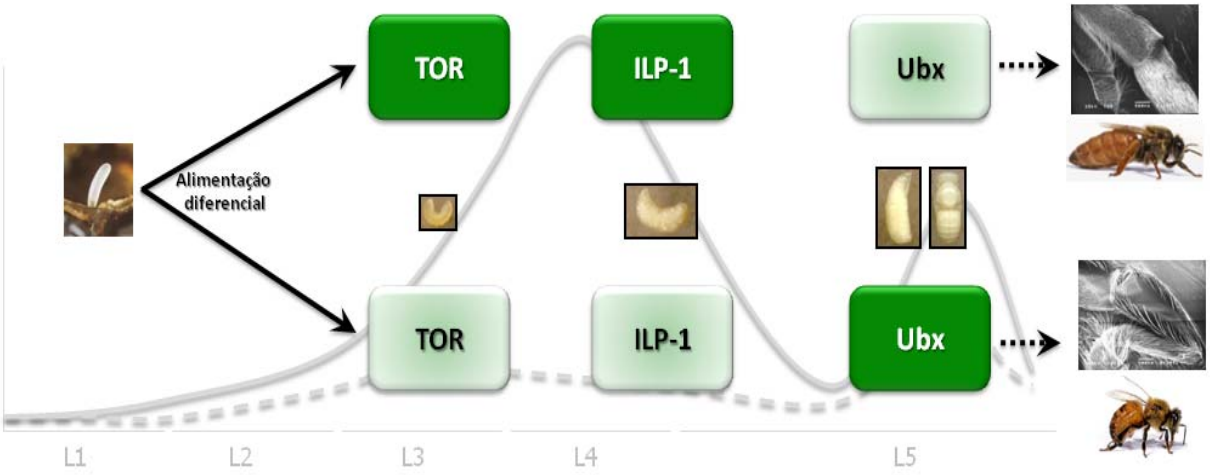


Figura 24: Representação esquemática do modelo proposto para a diferenciação de pernas posteriores em *A. mellifera*. Acima genes expressos em rainhas; abaixo, operárias; tons verde claro representam menor expressão em relação à outra casta; tons verde escuro, maior expressão; ao fundo, compilação de dados de títulos de Hormônio Juvenil em operárias e rainhas ao longo do desenvolvimento (Hartfelder e Emlen, 2005); **TOR**: *Target of Rapamycin*; **ILP-1**: *insuline-like peptide-1*; ***ubx***: *ultrabithorax*; **L1-5**: primeiro ao quinto estágios larvais; as fotos representam as fases onde os genes indicados são diferencialmente expressos (L3, L4-L5F1 e L5PP e Pw).

6. Conclusões e considerações finais

A partir dos dados apresentados no presente trabalho, conclui-se que:

- ✓ As proteínas, Abd-A, Atx-2, Crc, Dac, Dll, Gug, RFABP e Ubx de *A. mellifera* possuem os domínios conservados característicos destas famílias;

- ✓ A expressão dos genes *atx-2*, *crc*, *dac*, *dll*, *gug* e *RFaBP* durante o desenvolvimento das pernas posteriores de abelhas sugerem que estes não estão envolvidos na diferenciação da morfologia específica de cada casta;

- ✓ A maior expressão de *dac* na região da tíbia das pernas posteriores de pupas de olho branco de operárias de *A. mellifera* indica um domínio de expressão deste gene nesta região;

- ✓ *ubx e abd-A* são mais expressos em pernas posteriores de pré-pupas e pupas de olho branco de operárias, o que juntamente com a localização de suas proteínas em pernas de pré-pupas de operárias indica a participação destes genes na regulação da formação de estruturas casta-específicas.

O presente trabalho, contudo, deixa algumas questões abertas, como por exemplo, as diferenças observadas na superfície das tíbias das pernas posteriores de operárias e rainhas; as proteínas que interagem com Ubx durante o desenvolvimento das cerdas e a localização de neurônios e o tipo de ramificação dos mesmos encontrados na base das cerdas da corbícula.

7. Referências Bibliográficas

ABOUHEIF E, WRAY GA. 2002. Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants. *Science* **297** 249–252.

ABU-SHAAR M & MANN R. 1998. Generation of multiple antagonistic domains along the proximal axis during *Drosophila* leg development. *Development* **125** 3821-3830.

AKAM ME. 1983. The location of *Ultrabithorax* transcripts in *Drosophila* tissue sections. *The EMBO Journal* **11**(2) 2075-2084.

ANGELINI DR & KAUFMAN TC. 2005. Insect appendages and comparative ontogenetics. *Developmental Biology* **286**(1) 57-77.

BARCHUK AR, CRISTINO AS, KUCHARSKI R, SIMÕES ZLP, MALESZKA R. 2007. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Developmental Biology* **7** 70.

BENNETT RL, BROWN SJ, DENELL RE. 1999. Molecular and genetic analysis of the *Tribolium Ultrabithorax* ortholog, *Ultrathorax*. *Development Genes and Evolution* **209**(10) 608-619.

BLANK M & ANDREWS NC. 1997. The Maf transcriptions factors: regulators of differentiation. *Trends in Biochemical Sciences* **22**(11) 437-441.

BLOCH G, WHEELER DE, ROBINSON GE. 2001. Endocrine influences on the organization of insect societies. In: Hormones, brain and behavior (Eds. Pfaff DW, Arnold AP, Ettgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT). *Elsevier USA*, 195-235.

BOLELI IC, SIMÕES ZLP, HARTFELDER K. 1998. The stomatogastric nervous system of the honey bee (*Apis mellifera*) in a critical phase of caste development. *Journal of Morphology* **236**(2) 139-149.

BOWSHER JH, WRAY GA, ABOUHEIF E. 2007. Growth and Patterning are Evolutionarily Dissociated in the Vestigial Wing Discs of Workers of the Red Imported Fire Ant, *Solenopsis Invicta*. *Journal of Experimental Zoology (MOL DEV EVOL)* **308B** 769–776.

BROGIOLO W, STOCKER H, IKEYA T, RINTELEN F, FERNANDEZ R, HAFEN E. 2001. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current Biology* **11**(4) 213-21.

BROWER DL. 1987. *Ultrabithorax* gene expression in *Drosophila* imaginal discs and larval nervous system. *Development* **101**(1) 83–92.

BRYANT PJ. 2001. Growth factors controlling imaginal disc growth in *Drosophila*. *Novartis Found Symposium* **237** 182-194.

CAMPOS LAO. 1975. Determinação de casta no gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae), Papel do Hormônio Juvenil. *Mestrado, FMRP – USP*. 44p.

CASARES F & MANN RS. 1998. Control of antenal versus leg development in Drosophila. *Nature* **392** 723-726.

COHEN S, BRONNER M, KUTTNER F, JURGENS G, JACKEL H. 1989. *Distal-less* encodes a homeodomain protein required for limb formation in *Drosophila*. *Nature* **338** 432-434.

COHEN SM & JURGENS G. 1989. Proximal-distal pattern formation in *Drosophila*: cell autonomous requirement for *Distal-less* gene activity in limb development. *The EMBO Journal* **8**(7) 2045-2055.

COHEN SM. 1993. Imaginal disc development. In: The Development of *Drosophila melanogaster*. (Eds. Bate M & Martinez-Arias A) *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York* 747-841.

CONDIC ML, FRISTOM D, FRISTOM JW. 1991. Apical cell shape changes during *Drosophila* imaginal leg disc elongation: A novel morphogenetic mechanism. *Development* **111**(1) 23-33.

CRICKMORE MA & MANN RS. 2006. Hox control of organ size by regulation of morphogen production and mobility. *Science* **313** 63–68.

DAVIS RL. 2001. Mushroom bodies, $Ca2^{+}$ oscillations, and the memory gene amnesiac. *Neuron* **30** (3) 653-656.

DEDEJ 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*). *Journal of Apicultural Research* **37**(3) 183-190.

DUBOULE D**.** 1994. Guidebook to the Homeobox Genes. *A Sambrook and Tooze publication at Oxford University Press*.

EKKER SC, YOUNG KE, VON KESSLER D, BEACHY PA. 1991. Optimal DNA sequence recognition by the Ultrabithorax homeodomain of *Drosophila*. *The EMBO Journal* **10**(5) 1179–1186.

EMLEN DJ & ALLEN CE. 2004. Genotype to phenotype: physiological control of trait size and scaling in insects. *Integrative& Comparative Biology* **43**(5) 617-634.

EMLEN DJ & NIJHOUT HF. 2001. Hormonal control of male horn length dimorphism in *Onthophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae) a second critical period of sensitivity to juvenile hormone. *Journal of Insect Phisiology* **47**(9)1045-1054.

EMLEN DJ, SZAFRAN Q, CORLEY LS, DWORKIN I. (2006). Insulin signaling and limb-patterning: candidate pathways for the origin and evolutionary diversification of beetle 'horns'. *Heredity* **97**(3) 179-191.

ERICKSON EH, CARLSON SD, GARMENT MB. 1986. A scanning electron microscope Atlas of the honey bee. *The Iowa State University Press, Ames, Iowa*.

ERKNER A, ROURE A, CHARROUX B, DELAAGE M, HOLWAY N, CORÉ N, VOLA C, ANGELATS C, PAGÈS F, FASANO L, KERRIDGE S. 2002. Grunge, related to human Atrophin-like proteins, has multiple functions in *Drosophila* development. *Development* **129**(5) 1119-1129.

ESTRADA B & SANCHES-HERRERO E. 2001. The Hox gene Abdominal-B antagonizes appendage development in the genital disc of *Drosophila*. *Development* **128**(3) 331-339.

EVANS JD & WHEELER DE. 2001. Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. *BioEssays* **23**(1) 62-68.

EWER J & REYNOLDS SE. 2002. Neuropeptide control of molting in insects. In Hormones, Brain and Behavior in Invertebrates. (ed. D. W. Pfaff, A. P. Arnold, A. M. Etgen, S. E. Fahrbach and R. T. Rubin) *New York: Academic Press* 1-92.

FELDLAUFER MF, HERBERT JREW, SVOBODA JA, THOMPSON MJ, LUSBY WR. 1985. Makisterone A: The major ecdysteroid from pupa of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem*istry **15** 597-600.

FRISCHER LE, HAGEN FS, GARBER RL. 1986. An inversion that disrupts the *Antennapedia* gene causes abnormal structure and localization of RNAs. *Cell* **47** 1017–1023.

FREE JB. 1980. A organização social das abelhas (Apis). EPUD: *Ed. Da Universidade de São Paulo, São Paulo*.

FRISTROM D & FRISTOM JW. 1993. The metamorphic development of the adult epidermis. In: The Development of *Drosophila melanogaster*. (Eds. Bate M & Martinez-Arias A) *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York* 843-897.

GALANT R & CARROLL SB. 2002. Evolution of a transcriptional repression domain in an insect Hox protein. *Nature* **415** 910-913.

GAUTHIER SA & HEWES RS. 2006. Transcriptional regulation of neuropeptide and peptide hormone expression by the *Drosophila* dimmed and *cryptocephal* genes. *The Journal of Experimental Biology* **209** 1803-1815.

GEHRING W. 1966. Bildung eines vollständigen Mittelbeines mit Stenopleura in der Antennenregion bei der Mutante Nasobemia (Ns) von *Drosophila melanogaster*. *Archiv der Julius Klaus-Stiftung für Vererbungsforschung, Sozialanthropologie und Rassenhygiene* **41** 44-54.

GERBER B, TANIMOTO H, HEISENBERG M. 2004. An engram found? Evaluating the evidence from fruit flies. *Current Opinion in Neurobiology* **14** 737-744.

GERHART J & KIRSCHNER M. 1997. Cells, embryos, and evolution. *Blackwell Science, Malden, MA*

GOBERDHAN DC & WILSON C. 2002. Insulin receptor mediates organ over-growth in *Drosophila* is not restricted by body size. *Development Genes and Evolution* **212**(4) 196-202.

GORFINKIEL N, SANCHEZ L, GUERRERO I. 1999. *Drosophila* terminalia as an appendage-like structure. *Mechanisms of Development* **86**(1-2) 113-123.

GRENIER JK & CARROLL SB. 2000. Functional evolution of the Ultrabithorax protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97** 704–709.

HEWES RS, SCHAEFER AM, TAGHERT PH. 2000. The *cryptocephal* gene (ATF4) encodes multiple basic-leucine zipper proteins controlling molting and metamorphosis in *Drosophila*. *Genetics* **155** 1711-1723.

HIPFNER DR & COHEN SM. 1999. New growth factors for imaginal discs. *Bioessays* 21(9) 718-720.

JOUSSE C, AVEROUS J, BRUHAT A, CARRARO V, MORDIER S, FAFOURNOUX P. 2004. Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313** 447-452.

KELSH R, WEINZIERL ROJ, WHITE RAH, AKAM M. 1994. Homeotic gene expression in the locust *Schistocerca*: an antibody that detects conserved epitopes in Ultrabithorax and Abdominal-A proteins. *Developmental Genetics* **15**(1) 19-31.

KERR WE, AKAHIRA Y, CAMARGO CA. 1975. Sex determination in bees. 4: Genetic control of juvenile hormone production in *Melipona quadrifasciata* (Apidae). *Genetics* **81** 749-756.

KOJIMA T. 2004. The mechanism of *Drosophila* leg development along proximodistal axis. *Development, Growth & Differentiation* **46**(2) 115-129.

KOYAMA T, SYROPYATOVA MO, RIDDIFORD LM. 2008. Insulin/IGF signaling regulates the change in commitment in imaginal discs and primordia by overriding the effect of juvenile hormone. *Developmental Biology* **324**(2) 258-265

LECUIT T & COHEN S M. 1997. Proximal-distal axis formation in the Drosophila leg. *Nature* **388** 139-145.

LEWIS EB. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276** 565–570.

LIU L, WOLF R, ERNST R, HEISENBERG M. 1999. Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. *Nature* **400** 753-756.

LUCHT-BERTRAM E. 1962. Das Postembryonale Wachstum von Hirnteilen bei *Apis mellifera* L. und Myrmeleon europaeus L. Zeitschrift fuer *Morphologie* und Oekologie der *Tiere* **50** 543-575.

MAHFOOZ N, TURCHYN N, MIHAJLOVIC M, HRYCAJ S, POPADIĆ A. 2007. *Ubx* Regulates Differential Enlargement and Diversification of Insect Hind Legs. *PLoS ONE* **2**(9) e866.

MAHFOOZ NS, LI H, POPADIC A. 2004. Differential expression patterns of the hox gene are associated with differential growth of insect hind legs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**(14) 4877–4882.

MAIZEL A, BENSAUDE O, PROCHIANTZ A, JOLIOT A. 1999. A short region of its homeodomain is necessary for engrailed nuclear export and secretion. *Development* **126**(14) 3183-90.

MAIZEL A, TASSETTO M, FILHOL O, COCHET C, PROCHIANTZ A, JOLIOT A. 2002. Engrailed homeoprotein secretion is a regulated process. *Development* **129** 3545-3553.

MANN RS & CASARES F. 2002. Developmental biology: signalling legacies. *Nature* **418** 737-739.

MARDON G, SOLOMON NM, RUBIN GM. 1994. *dachshund* encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* **120**(12) 3473-3486.

MICHELETTE ER & SOARES AEE. 1993. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **24** 431-440.

MICHENER CD. 1969. Comparative social behavior of bees**.** *Annual Review of Entomology* **14** 299-342.

MICHENER, C.D. (1974). The social behavior of the bees: a comparative study. *Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press.*

MIRTH CK, RIDDIFORD LM. 2007. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *BioEssays* **29**(4) 344–355.

MIZUNAMI M, WEIBRECHT JM, STRAUSFELD NJ. 1993. A new role for the insect mushroom bodies: place memory and motor control. In: Biological Neural Networks in Invertebrate Neuroethology and Robotics. (Eds. Beer RD, Ritzman RE, McKenna T) *Academic Press, Incorporation* 199-225.

MOCZEK AP & NIJHOUT HF. 2002. Development mechanism of threshold evolution en a polyphenic beetle. *Evolution & Development* **4** 252-264.

MURPHEY RK, POSSIDENTE DR, VANDERVORST P, GHYSEN A. 1989. Compartments and the topography of leg afferent projections in *Drosophila. The Journal of Neuroscience* **9** 3209-3217.

NG H, PULST SM, HUYNH DP. 2007. Ataxin-2 mediated cell death is dependent on domains downstream of the polyQ repeat. *Experimental Neurology* **208**(2) 207-215.

NIJHOUT HF & WHEELER DE. 1982. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. *Quarterly Review of Biology* **57** 109-133.

NOVEEN A, DANIEL A, HARTENSTEIN V. 2000. Early development of the *Drosophila* mushroom body: the roles of *eyeless* and *dachshund*. *Development* **127**(16) 3475-3488.

PAI C-Y, KUO T, JAW T, KURANT E, CHEN C, BESSARAB D, SALZBERG A SUN Y. 1998. The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, Extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes & Development* **12** 435-436.

PANGANIBAN G. 2000. *Distal-less* function during *Drosophila* appendage and sense organ development. *Developmental Dynamics* **218**(4) 554-562.

PATEL A, FONDRK MK, KAFTANOGLU O, EMORE C, HUNT G, FREDERICK K, AMDAM GV. 2007. The Making of a Queen: TOR Pathway Is a Key Player in Diphenic Caste Development. *PLoS ONE* **2**(6) e509

PATEL NH. 1994. Imaging neuronal subsets and other cell types in whole-mount Drosophila embryos and larvae using antibody probes. In: Methods in Cell (Ed. Fryber E) *Biology Goldstein LSB, New York: Academic Press* **44** 446-487.

PFAFFL MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29** e45.

PINTO LZ, HARTFELDER K, GENTILE-BITONDI MM, PAULINO-SIMÕES ZL. 2002. Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *Journal of Insect Physiology* **48** 783-790.

PULST SM, NECHIPORUK A, NECHIPORUK T, GISPERT S, CHEN XN, LOPES-CENDES I, PEARLMAN S, STARKMAN S, OROZCO-DIAZ G, LUNKES A, DEJONG P, ROULEAU GA, AUBURGER G, KORENBERG JR, FIGUEROA C, SAHBA S. 1996. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genetics* **14**(3) 269-276.

RACHINSKY A & HARTFELDER K. 1990. *Corpora allata* activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titer in honeybee larvae (*Apis mellifera carnica*). *Journal of Insect Physiology* **66** 189-194.

RACHINSKY A, STRAMBI C, STRAMBI A, HARFELDER K. 1990. Caste and metamorphosis: hemolimph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honey bee larvae. *Gen. Comp. Endocrinol* **79** 31-38.

REMBOLD H, KREMER J-P, ULRICH GM. 1980. Characterization of the postembryonic stages of the female castes of the honeybee, *Apis mellifera* L.. *Apidologie* **11** 29-38.

REMBOLD H. 1987. Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry* **17** 1003-1006.

RIDDIFORD LM. 1993. Hormones and *Drosophila* development. In: The Development of *Drosophila melanogaster*. (Eds. Bate M & Martinez-Arias A) *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York* 899-940.

RIECKHOF GE, CASARES F, RYOO HD, ABU-SHAAR M, MANN RS. 1997. Nuclear translocation of Extradenticle requires *homothorax*, which encodes an Extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* **91**(2) 171-183.

ROZOWSKI M & AKAM M. 2002. Hox gene control of segment-specific bristle patterns in *Drosophila*. *Genes & Development* **16**(9) 1150–1162.

RUTHERFORD K, PARKHILL J, CROOK J, HORSNELL T, RICE P, RAJANDREAM MA, BARRELL B. 2000. Artemis: Sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**(10) 944-945.

SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **74**(12) 5463-5467.

SATO T. 1984. A new homeotic mutation affecting antenna and legs. *Drosophila Information Service* **60** 180-182.

SATTERFFIELD TF, JACKSON SM, PALLANCK LJ. 2002. A *Drosophila* homolog of the ploylglutamine disease gene SCA2 is a dosage-sensitive regulator of actin filament formation. *Genetics* **162**(4) 1687-1702.

SATTERFIELD T & PALLANCK LJ. 2006. Ataxin-2 and its Drosophila homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Human Molecular Genetics* **15**(16) 2523-2532.

SCHNEUWLY S, KLEMENZ R, GEHRING WJ. 1987. Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene *Antennapedia*. *Nature* **325** 816-818.

SIDONG PDS, CHU J, PANGANIBAN G. 2001. Proximodistal domain specification and interactions in development *Drosophila* appendages. *Development* **128**(12) 2365-2372.

SNODGRASS RE. 1956. Anatomy of the honey bee. *Cornell University Press, USA*.

SNODGRASS RE & ERICKSON EH. 2000. The anatomy of the honey bee. In: The Hive and the Honey Bee. 5º ed (ed J. M. Graham). *Dadant & Sons, Hamilton, Illinois* 103-167.

STERN DL & EMLEN DJ. 1999. The developmental basis for allometry in insects. *Development* **126**(6) 1091-1101.

STERN DL. 1998. A role of *Ultrabithorax* in morphological differences between *Drosophila* species. *Nature* **396** 463-466.

STERN DL. 2003. The Hox gene Ultrabithorax modulates the shape and size of the third leg of Drosophila by influencing diverse mechanisms. Developmental Biology **256**(2) 355-366.

STRUHL G. 1981. A homeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature* **292** 635-638.

SUNKEL CE & WHITTLE JRS. 1987. *Brista*: a gene involved in the specification and differentiation of distal cephalic and thoracic structures in *Drosophila melanogaster*. *Development Genes and Evolution* **196**(2) 124-132.

TANAKA ED & HARTFELDER K. 2004. The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. *Arthropod structure & development* **33**(4) 431-42.

TILNEY LG, CONNELLY P, SMITH S, GUILD M. 1996. F-actin bundles in *Drosophila* bristles are assembled modules composed of short filaments. *The Journal of Cell Biology* **135**(5) 1291-1308.

TOMOYASU Y, WHEELER SR, DENELL RE. 2005. *Ultrabithorax* is required for membranous wing identity in the beetle *Tribolium castaneum*. *Nature* **433** 643–647

TRUMAN JW & RIDDIFORD LM. 2007. The morphostatic actions of juvenile hormone. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37** 761–770.

TRUMAN JW, HIRUMA K, ALLEE JP, MACWHINNIE SGB, CHAMPLIN DT, RIDDIFORD LM. 2006. Juvenile hormone is required to couple imaginal disc formation with nutrition in insects. *Science* **312** 1385–1388.

VACHON G, COHEN B, PFEIFLE C, MCGUFFIN ME, BOTAS J, COHEN S. 1992. Homeotic genes of the bithorax complex repress limb development in the abdomen of the *Drosophila* embryo through the target gene *Distalless*. *Cell* **71**(3) 437-450.

VELTHUIS HHW & VELTHUIS-KLUPPELL FM. 1975. Caste differences in a stingless bee, *Melipona quadrifasciata* Lep., influenced by juvenile hormone application. *Proc Kon Ned Akad Wt*, C **78** 81-94.

WEATHERBEE SD, NIJHOUT HF, GRUNERT LW, HALDER G, GALANT R, SELEGUE J, CARROLL S. 1999. *Ultrabithorax* function in butterfly wings and the evolution of insect wing patterns. *Current Biology* **9** 109–115.

WEIHE U, MILÁN M, COHEN SM. 2005. *Drosophila* limb development. Comprehens *Molecular Insect Science* 305-347 (Chapter 1.9).

WHEELER DE, BUCK N, EVANS JD. 2006. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* **15**(5) 597-602.

WHEELER DE. 1986. Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. *American Naturalist* **128** 13-34.

WHITE RAH & WILCOX M. 1984. Protein products of the bithorax complex in *Drosophila*. *Cell* **39**(2) 163-172.

WHITFIELD CW, BEN-SHAHAR Y, BRILLET C, LEONCINI I, CRAUSER D, LECONTE Y, RODRIGUEZ-ZAS S, ROBINSON GE. 2006. Genomic dissection of behavioral maturation in the honey bee**.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**(44) 16068-16075.

WINSTON ML. 1987. The biology of the Honey Bee. *Harvard University Press, Cambridge, MA*.

WIRTZ P & BEETSMA J. 1972. Induction of caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera* L.) by juvenile hormone. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **15**(4) 517-520.

WU J & COHEN SM. 1999. Proximodistal axis formation in the *Drosophila* leg: subdivision into proximal and distal domains by Homothorax and Distal-less. *Development* **126**(1) 109-117.