Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**A via de sinalização insulínica (IIS) na diferenciação de
castas em *Apis mellifera***

Sergio Vicente de Azevedo

Ribeirão Preto

-2007-

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

**A via de sinalização insulínica (IIS) na diferenciação de
castas em *Apis mellifera***

Sergio Vicente de Azevedo

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de MESTRE
em CIÊNCIAS.

Área de concentração: GENÉTICA

Orientador: Prof. Dr. Klaus Hartfelder

Ribeirão Preto

-2007-

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.

AZEVEDO, SERGIO VICENTE

A via de sinalização insulínica (IIS) na diferenciação de castas em *Apis mellifera*. Sergio Vicente de Azevedo; orientador: Klaus Harfelder – São Paulo, 2007.

91p.: 39 il.

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

1. *Apis mellifera*. 2. Via de sinalização IIS. 3. Receptor de insulina. 4. Diferenciação de casta. 5. Insetos sociais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Sergio Vicente de Azevedo

A via de sinalização insulínica na
diferenciação de castas em *Apis mellifera*

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de MESTRE
em CIÊNCIAS.

Área de concentração: GENÉTICA.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Profº(a) Drº (a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Profº(a) Drº(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Profº (a) Drº (a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

**“O conhecimento de nossas
fraquezas nos fortalece”**

Sócrates

Dedico

À minha família e aos meus amigos, que me abastecem de amor e segurança para continuar trilhando meu caminho. Em especial à minha mãe **Perciliana**, ao meu pai **Silvio**, ao meu mano **Silvinho** e sua esposa **Josi** (minha maninha), ao meu mano **Eduardo** e à minha tia **Nilza**, que foi sinônimo de valentia durante toda a sua passagem na terra.

Amo vocês.

Agradecimentos

- Deus, pelas dificuldades e facilidades colocadas diante meu caminho;
- Ao Prof. Dr. Klaus Hartfelder, quem orienta minha carreira científica desde minha graduação. É uma honra ser seu orientado;
- À FAPESP, seu suporte financeiro foi fundamental para a realização de meu mestrado e consequentemente desse trabalho;
- À minha “irmãzinha” Vanessa da Silva Silveira, uma amiga leal, que ficou comigo até altas horas finalizando esse trabalho;
- À Daniela Pereira Garçon “Baixinha”, pelo que vivemos juntos e pela amizade que perdura;
- À Marcela Aparecida Framartino Bezerra Laure, sem a sua destreza em dissecar eu não teria conseguido isolar alguns tecidos;
- Ao Luiz Roberto Aguiar, que me auxílio na obtenção do material biológico desse trabalho;
- Aos meus parceiros, do Bloco A da genética, Érica, Carlos Lobo, Anete, Karina, Roberto Barchuk, Vera Figueiredo, Alexandre Cristino, Adriana Mendes, Paulo Emílio, Vanessa Bugalho, Marina , Amanda, Weider, Thiago, Ana Durvalina, Aline Mackert, Juliana, Mônica, David, Ana Bonetti, Lilíane, Umberto Moreno, Omar, Ivan, Michele, Rodrigo, Rogério e a todos aqueles que fazem parte do meu convívio;
- Aos meus pais Silvio e Perciliana que sempre me apoiaram nas minhas decisões, mesmo que não concordassem;
- Aos meus irmãos Silvio e Eduardo, “valeu pela firmeza!!”;

Agradecimentos

- À minha “sister in law” Josi, pela irmã que ela é;
- Aos professores Ademilson Espencer, Lionel Gonçalvez, Zilá L. P Simões e Márcia Bitondi que sempre se mostraram disponíveis a ajudar;
- À minha tia Azair e tio Brasil pelos exemplos que são.
- À minha tia Aureny e tio Jair, por toda a retaguarda que vocês dão à família.
- À minha nova parceira de laboratório, Fernanda Carvalho Humann pelo auxílio prestado nesse trabalho;
- Às secretárias do departamento de genética: Susi e Maria Aparecida;
- Ao departamento de genética por me acolher esses anos todos;
- A todas as pessoas que passaram e passam pela minha vida todos os dias, vocês fazem parte da história e do que eu sou;

Muito obrigado a todos!

Resumo

Azevedo, S.V. A via de sinalização insulínica (IIS) na diferenciação de castas em *Apis mellifera*. 91p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.

O polifenismo facultativo, observado entre rainhas e operárias em insetos altamente eussociais tem como estímulo inicial uma alimentação diferencial na fase larval que afeta tanto o desenvolvimento geral das larvas quanto a diferenciação de órgãos e sistemas, principalmente o sistema reprodutor das fêmeas. A via de sinalização por insulina (IIS) é uma das principais vias que integra o desenvolvimento geral de animais com as suas condições nutricionais. O objetivo desse trabalho foi verificar possíveis relações entre a via de sinalização por insulina e a diferenciação das castas em abelhas *Apis mellifera*. A partir de análises do genoma de *Apis mellifera* anotamos genes integrantes desta via e verificamos que há dois genes codificadores para receptores de insulina, *InR1* e *InR2*. Os perfis de transcrição desses dois genes obtidos por RT-PCR quantitativa, em larvas de rainhas e operárias durante o período de troca de alimentação, demonstraram que há diferenças consideráveis nos padrões temporais e nos níveis dos transcritos para os receptores de insulina, *InR1* (GB15492) e *InR2* (GB18331), dentro de cada casta, como também entre as duas castas. Em rainhas verificamos uma interessante variação na transcrição de *InR1*, que no terceiro instar larval foi cerca de cinco vezes maior que a transcrição de *InR2* e no quarto instar seguiu em níveis semelhantes ao de *InR2*. Essa variação de *InR1* pode estar relacionada ao teor de proteínas da geléia real oferecida às larvas de rainhas no terceiro instar, que é maior do que teor

de proteínas da geléia real oferecida a partir do quarto instar larval. Para as amostras de larvas de operárias observamos que os níveis dos transcritos dos dois receptores, *InR1* e *InR2*, foram baixos no terceiro estágio larval e aumentaram, de maneira semelhante, até o início do quinto estágio larval, o que pode ter sido devido a algum composto existente na geléia de operária que estimule a transcrição dos genes para os receptores de insulina. Foram feitas análises complementares dos níveis de transcrição dos genes *InR1* e *InR2*, em amostras de ovários, tanto de operárias quanto de rainhas, e em amostras de operárias adultas cultivadas em diferentes tipos de alimentações. Essas análises complementares evidenciaram que a transcrição dos genes para os receptores de insulina em *Apis mellifera* foi diferente nos ovários de ambas as castas, quando comparada às amostras de corpo inteiro, e que em operárias o transcrito do *InR1* foi dominante ao longo de quase toda a vida adulta, sendo superado pelo transcrito *InR2* apenas por volta de 13 e 15 dias.. Além disso, uma relação positiva entre o conteúdo de proteína e a transcrição de *InR1* foi observada quando analisamos a sua transcrição em amostras de operárias adultas alimentadas com *bee bread*, uma dieta rica em proteína. Os resultados obtidos nesse trabalho, juntamente com os de Wheeler e colaboradores (2006), Seehus e colaboradores (2006), e Patel e colaboradores (2007), constituem as primeiras informações da via IIS em *Apis mellifera*, e servirão de base na busca da relação entre a dieta e os sinais downstream envolvidos na determinação de casta e diferenciação.

Palavras chaves: *Apis mellifera*, via de sinalização IIS, receptor de insulina, diferenciação de casta, insetos sociais.

Abstract

Azevedo, S.V. A via de sinalização insulínica (IIS) na diferenciação de castas em *Apis mellifera*. 91p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.

The initial stimulus that generates the facultative queen/worker polyphenism in highly social insects is a differential alimentation in the larval stages. It affects the general development of the larvae, as well as the differentiation of organs and systems, especially of the female reproductive system. The insulin signaling pathway (IIS) is one of the main pathways that integrates the general development of animals with their respective nutritional conditions. The aim of this work was to investigate the relationship between IIS and caste differentiation in the honey bee *Apis mellifera*. Using the available *Apis mellifera* genome information we annotated genes belonging to this pathway. We noted that there are two genes encoding putative insulin receptors, *InR1* and *InR2*. The transcriptional profiles of these genes were obtained by quantitative RT-PCR of queen and workers larvae, giving special attention the period during which the larval diet changes. These results revealed considerable differences in the temporal patterns and levels of the transcripts of two the insulin receptor genes, *InR1* (GB15492) and *InR2* (GB18331) between the two castes and during their respective larval development. For queens we noted an interesting modulation in *InR1* transcription: in the third larval instar it was about five fold higher than the transcription of *InR2*, but in the fourth instar both receptors were transcribed at similar levels. This variation in *InR1* expression may be related to the protein content of royal jelly offered to the queen larvae in third instar, that is higher than the protein content of the royal jelly offered to fourth larvae instar. For the worker larvae

samples we observed that transcripts levels of the two receptors, *InR1* and *InR2*, were low in the third larval stage and increased in parallel until the onset of the fifth larval stage. This may have been due to some compound in the worker jelly which stimulates the transcription of both genes coding for insulin receptors. Complementary analysis of transcription levels of *InR1* and *InR2* were performed on ovaries of queen and worker larvae, and on adult workers maintained on different diets. These complementary analyses highlighted that transcription of the InR genes in the larval ovaries of *Apis mellifera* was differed from the whole body samples. In adult workers the expression of *InR1* was dominant over *InR2* during most of the adult life cycle, an inversion was only seen in 13 to 15 days old bees. Furthermore, a positive relationship between protein content and *InR1* transcription was observed when analyzing its transcription in adult workers fed with *bee bread*, a protein-rich diet. The results of this work, in conjunction with those of Wheeler *et al.* (2007), Seehus *et al.* (2006) and Patel *et al.* (2007), are the first information on the IIS pathway in honey bees and they represent the basis for an in-depth pursuit on the relationship between diet and downstream signalling involved in caste determination and differentiation.

Key words: *Apis mellifera*, IIS signaling, *insulin receptor*, caste differentiation, social insects.

1. Introdução 1	
1.1 Apis mellifera: um organismo modelo para insetos sociais.....	1
1.2 Desenvolvimento de castas em abelhas melíferas	3
1.3 O Hormônio Juvenil e Ecdisteróides no processo de diferenciação de castas ..	7
1.4 A via de sinalização insulina/receptor de insulina (IIS)	8
2. Objetivos	15
3 Material e métodos	16
3.1 Abelhas.....	16
3.1.1 Operárias	16
3.1.2 Rainhas.....	17
3.2 Dissecção do material biológico.....	18
3.3 Extração do RNA total e síntese do cDNA.....	19
3.4 Operárias recém emergidas mantidas sob diferentes tipos de alimentação	20
3.5 Tratamento com análogo do hormônio juvenil, pyriproxifen (PPN).....	21
3.6 Desenho de primers.....	22
3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	23
3.7.1 PCR quantitativa (Real Time PCR)	23
3.7.2 PCR semi-quantitativa.....	24
3.8 Preparo das células quimiocompetentes	26
3.9 Clonagem e sequenciamento	26
3.10 Análise in silico	28
3.11 3' RACE do gene InR-2 (GB18331).....	29
4. Resultados	30
4.1 Identificação de genes candidatos da via IIS no genoma de Apis mellifera.....	30
4.1.1 Validação da transcrição de alguns genes integrantes da via IIS	32
4.1.2 Anotação dos genes envolvidos na via IIS.....	33
4.1.2.1 Gene codificador do receptor de insulina 1 (GB15492).....	33
4.1.2.2 Gene codificador do receptor de insulina 2 (GB18331).....	35
4.1.2.3 Gene codificador do substrato do receptor de insulina (Chico)	39
4.1.2.4 Gene codificador da quinase ribossomal S6K.....	43
4.1.2.5 Gene codificador do supressor de tumor TSC1.....	45
4.1.2.6 Gene codificador de uma proteína alvo de rapamicina (TOR).....	46
4.2 Perfil de transcrição dos genes envolvidos na via IIS em Apis mellifera	48
4.2.1 RT-PCR semiquantitativa do gene codificador de InR2 (GB18331).....	48

4.2.2 RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) dos genes <i>InR1</i> (GB15492) e <i>InR2</i> (GB18331).....	49
4.2.2.1 Transcrição dos genes codificadores dos receptores de insulina <i>InR1</i> e <i>InR2</i> em larvas de rainhas e operárias.....	50
4.2.2.2 Transcrição dos genes codificadores dos receptores de insulina <i>InR1</i> e <i>InR2</i> nos ovários de rainhas e operárias	52
4.2.2.3 Efeito de tratamento com pyriproxifen sobre a transcrição dos genes <i>InR1</i> e <i>InR2</i> em larvas de operárias	54
4.2.2.4 Efeito da dieta sobre a transcrição dos genes <i>InR1</i> e <i>InR2</i> em operárias adultas	55
4.3 3'RACE do gene <i>InR2</i> (GB18331)	59
5 Discussão.....	61
5.1 Os receptores de insulina de <i>Apis mellifera</i>	62
5.1.1 Expressão dos receptores de insulina na fase larval	63
5.1.2 Expressão dos receptores de insulina no ovário larval	67
5.1.3. Efeito de hormônio juvenil sobre a transcrição de <i>InR1</i> e <i>InR2</i>	70
5.1.4. Efeitos da dieta sobre a expressão dos receptores de insulina	71
5.2 Análise da cauda 3' do gene <i>InR2</i>	73
5.3 Anotação e sequenciamento outros componentes da via IIS	74
5.3.1 O substrato do receptor de insulina Chico de <i>Apis mellifera</i>	74
5.3.2 A quinase ribossomal S6K de <i>Apis mellifera</i>	75
5.3.3 O gene supressor de tumor TSC-1 de <i>Apis mellifera</i>	76
5.3.4 O gene codificador para uma proteína alvo de rapamicina (TOR) em <i>Apis mellifera</i>	76
5.4 Considerações finais.....	77
6 Conclusão	80
7. Bibliografia.....	82

1. Introdução

1.1 *Apis mellifera*: um organismo modelo para insetos sociais

Grupos eussociais na ordem Hymenoptera são definidos pela sobreposição de gerações (estrutura matri-filial) em um mesmo ninho e, principalmente, pela presença de castas fenotipicamente distintas. Esta diferenciação morfológica-anatômica das castas garante uma alta eficiência na divisão do trabalho dentro de uma colônia. Na subfamília Apinae (*sensu* Michener 2000) apenas duas tribos, os Apini e os Meliponini, apresentam estas características e são as únicas que podem ser classificadas como abelhas altamente eussociais. Pela sua importância econômica e como um modelo de polifenismo facultativo a espécie *Apis mellifera* tem recebido muita atenção de pesquisadores, tanto em pesquisas básicas como aplicadas, não causando surpresa a inclusão deste inseto na lista dos organismos a terem o seu genoma completamente seqüenciado. O *Honey Bee Genome Sequencing Project* (HBGSP) foi iniciado em 2003 e atualmente encontra-se disponível, no site <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>, a versão 4.0 da anotação do genoma da abelha melífera. O sequenciamento completo do genoma e a anotação de famílias gênicas, foram anunciados em publicação recente: *The Honey Bee Genome Sequencing Consortium* 2006.

Em uma colônia de *Apis mellifera* são encontrados três tipos de indivíduos: zangões, rainhas e operárias (Figura 1). Cada um destes organismos possui funções específicas que levam à manutenção da colônia. Os zangões são machos gerados a partir de ovos não fecundados, portanto haplóides, cuja única função é o acasalamento com a rainha. As fêmeas, as quais são todas diplóides oriundas de ovos fecundados, são as responsáveis pela divisão de trabalho na colônia. As duas

castas fêmeas, rainha e operária, embora passem pelos mesmos estágios de desenvolvimento (Figura 2), apresentam diferenças nas taxas de crescimento (Figura 3) e tempo de desenvolvimento larval. Na fase adulta as duas castas são distintas no que diz respeito a sua morfologia, anatomia, fisiologia, longevidade e no seu comportamento (Page & Peng 2001), o que garante grande eficiência na execução das suas respectivas tarefas: reprodutivas (rainha) e manutenção da colônia (operárias). A rainha requer apenas 15 dias para desenvolver-se a partir do ovo em adulto (Nunes-Silva *et al.* 2006) e pode viver por mais de um ano (Page & Peng 2001), além do mais, a rainha é a única a acasalar-se com zangões e depositar, além de ovos haplóides, ovos diplóides. A rainha também exerce forte influência (através de seus feromônios) sobre o comportamento e fisiologia das operárias. Por outro lado, as operárias requerem 20 dias para se desenvolverem a partir do ovo em adultos (Nunes-Silva *et al.* 2006). Após a emergência como adultas elas passam progressivamente por mudanças comportamentais e fisiológicas correlacionadas com a idade. As operárias mais jovens cuidam da limpeza e alimentação das crias, as com idades intermediárias constroem células,,processam o alimento e guardam a entrada da colméia, enquanto que as abelhas mais velhas forrageiam em busca de alimento, água e material para construção da colméia (Page & Peng 2001). As operárias de abelhas *Apis mellifera* vivem em torno de três a seis semanas (Page & Peng 2001) e, podem também, efetuar postura de ovos não fecundados em condições especiais (Michener 1974, Robinson *et al.* 1992, Ratnieks 1993, Barron *et al.* 2001, Makert *et al.* 2006).

1.2 Desenvolvimento de castas em abelhas melíferas

As diferenças morfológicas e fisiológicas das castas fêmeas surgem durante o desenvolvimento pós-embriônico, no qual larvas fêmeas originalmente bipotentes podem se desenvolver em rainhas ou operárias. A diferenciação de casta depende de estímulos específicos que iniciam esse processo durante o período sensível que, de acordo com experimentos de transferências de larvas, varia para os diferentes campos morfogenéticos do corpo (Wilde & Beetsma 1982, Dedej *et al.* 1998). A direção do desenvolvimento é determinada durante os primeiros três dias e meio de vida larval por fatores externos, especialmente a nutrição (Rembold & Hanser 1964; Weaver 1957). As larvas de rainhas são cultivadas em células especiais denominadas realeiras, maiores e dispostas verticalmente na colméia (Figura 4), e nutridas continuamente, ao longo de seus cinco estágios larvais, com uma abundância de geléia real (GR). A geléia real é uma secreção glandular produzida pelas operárias nutridoras e depositada nas células larvais enquanto os alvéolos se encontram abertos e, até mesmo, após o início da fase de tecelagem elas ainda se alimentam, pois os alvéolos de rainhas ainda contêm certa quantidade de alimento que é consumido pelas larvas (Haydak 1970). Embora a composição da geléia real não varie muito ao longo da vida larval da rainha, ela apresenta algumas variações com relação a alguns tipos de nutrientes. Larvas de rainha de até três dias de vida são alimentadas em maior proporção com uma secreção branca enquanto aquelas com quatro dias ou mais recebem em maior quantidade substâncias claras (Haydak 1970). As substâncias brancas e claras da geléia real variam quanto à sua composição, sendo que os conteúdos claros possuem uma concentração de proteína de 110,5mg/g e os conteúdos brancos possuem uma concentração de 140,5 mg/g (Haydak 1970). Por outro lado, as larvas de operárias, que são

cultivadas nas células padrão da colméia (Figura 4), são alimentadas com GR, em menores quantidades, até o 3º estágio larval, quando o seu tipo de alimentação é alterado para geléia de operária (GO), uma mistura de secreções glandulares suplementadas com pólen e néctar (Rembold 1987). Para as larvas de operárias o período de alimentação encerra-se quando inicia a fase de tecelagem do casulo, enquanto que para as rainhas ainda há alimento nesse período (Haydak 1943).

A alimentação diferenciada em qualidade e quantidade, entre as larvas de operária e rainhas, gera ambientes distintos dentro dos organismos de cada casta, causando respostas específicas que serão projetadas nos diferentes fenótipos das fêmeas adultas. Assim, o ambiente externo no qual a larva se encontra gera alterações no ambiente interno da larva, levando às respostas neuroendócrinas e, finalmente, à diferenciação celular e tecidual em consequência de expressão gênica diferencial. Historicamente, o desenvolvimento conceitual destes processos regulatórios do desenvolvimento das castas de abelhas, pode ser verificado nas seguintes revisões: Wilde (1976) descreve como o ambiente nutritivo da larva providencia sinais externos que afetam os processos neuroendócrinos, além de engatilhar a indução morfogênética das castas junto com a via neuroendócrina, o que resulta em um polifenismo de castas, proveniente de um elevado grau de plasticidade do desenvolvimento. Hartfelder e Engels (1998) detalham como o polifenismo que se estabelece a partir da mudança de alimentação entre rainhas e operárias, resulta em uma resposta diferenciada do sistema endócrino, especialmente nos títulos do hormônio juvenil (HJ) e ecdisteróides (Ecd). E por fim, Evans e Wheeler (2000) observaram que larvas destinadas a serem rainhas ou operárias diferem consideravelmente nos seus perfis transcricionais.

Figura 1: A) Zangão, haplóide, de *Apis mellifera* (Foto obtida na internet, www.uni-bayreuth.de/~toek1/fortner/index.htm) B) Fêmeas, diplóides, de *Apis mellifera*: a única rainha, com o abdômen mais desenvolvido, se encontra ao centro e as operárias, menores, estão ao redor. (Foto Wilson 2006)

Figura 2: Estágios do desenvolvimento de operárias de *Apis mellifera*. Ambas as castas passam pelos mesmos estágios de desenvolvimento, desde ovo (1-3) até a emergência como adulta (20). .

Figura 3: Curva de crescimento de rainhas (azul) e operárias (vermelho), demonstrando que mesmo após a tecagem do casulo (LS) ainda ocorre o crescimento das larvas de rainhas. (Rembold 1988).

Figura 4: Região da colméia contendo uma célula disposta verticalmente onde ocorre o desenvolvimento de uma rainha. Esta, realeira, está rodeada por células padrão da colméia contendo larvas de operárias.

1.3 O Hormônio Juvenil e Ecdisteróides no processo de diferenciação de castas

A expressão de fenótipos alternativos em insetos depende de fatores ambientais que se traduzem em respostas específicas do sistema endócrino, principalmente nos títulos de HJ e Ecd (para revisão ver, Dingle & Winchell 1997; Hartfelder 2000a; Hartfelder 2000b; Hartfelder & Emlen 2005),

Há muito tempo, atribui-se que a diferença entre as castas nos insetos sociais seja controlada pelo hormônio juvenil (HJ). Experimentos feitos com aplicações ectópicas de HJ na década de setenta indicaram um proeminente papel para o HJ no desenvolvimento de castas e estabeleceram uma janela crítica para sua ação no quarto e no início do quinto instar (Rembold *et al.* 1974, Dietz *et al.* 1979 e Hartfelder & Emlen 2005). Diferenças nos títulos de HJ foram verificadas através de radioimunoensaios (Figura 5) (Rembold 1987; Rachinsky *et al.* 1990). As diferenças observadas entre os títulos do HJ em operárias e rainhas reforçam o papel desse hormônio como principal modulador da diferenciação de castas. Esta visão é compatível com o fato do hormônio juvenil funcionar em insetos como um importante fator regulador da embriogênese, no desenvolvimento larval e adulto, na metamorfose, reprodução, diapausa, migração, polimorfismo e metabolismo (Nijhout 1994, Roe & Venkatesh 1990, De-Kort & Granger 1996, Hammock 1985, Truman & Riddiford 2002)

Comparado ao HJ, existem poucos trabalhos a respeito do envolvimento dos ecdisteróides na diferenciação de castas. No entanto, análises dos títulos de ecdisteróides (Rachinsky *et al.* 1990) e da atividade da glândula protorácica (Hartfelder 1993) revelaram diferenças casta-específicas na fase larval, considerando-se portanto que outros hormônios além do HJ estejam envolvidos na regulação do desenvolvimento de castas. Além do mais, Hartfelder e colaboradores

(1995) observaram um papel regulador dos ecdisteróides na síntese de algumas proteínas do ovário.

Figura 5: Título do HJ e ecdisteróides no desenvolvimento pré-imaginal de operárias e rainhas de *Apis mellifera* (Rembold 1987; Rachinsky *et al.* 1990).

1.4 A via de sinalização insulina/receptor de insulina (IIS)

A origem de polifenismos (tanto genéticos como facultativos) tem sido atribuída à integração de mecanismos que atuam como interruptores (*switch mechanisms*) durante a morfogênese do respectivo organismo (Nijhout 1999). Há anos, considera-se que a expressão de fenótipos alternativos em insetos depende de fatores ambientais, os quais se traduzem em respostas específicas do sistema endócrino, principalmente nos títulos de HJ e de ecdisteróides (Ecd) (para revisão ver, Dingle & Winchell 1997; Hartfelder 2000a; Hartfelder 2000b; Hartfelder & Emlen 2005). No entanto, nem todas as respostas gênicas observadas podem ser

explicadas com relação a esses dois hormônios, o que sugere o envolvimento de outras vias de sinalização nas respostas da diferenciação de castas. Recentes descobertas, de conexões entre a sinalização por insulina e os clássicos hormônios de insetos (HJ e Ecd) na regulação da metamorfose em *Drosophila* (Colombani et al., 2005; Mirth et al., 2005), permitem sugerir uma ligação similar entre a expressão diferencial de genes relacionados ao metabolismo no desenvolvimento de castas com a sinalização endócrina que controla a metamorfose. Essa interação pode gerar alterações nos respectivos campos morfogênicos das larvas (crescimento diferencial, morte celular programada, etc.).

O módulo de sinalização insulina-receptor de insulina (IIS) representa um dos mais antigos e mais bem conservados sistemas de sinalização no controle do crescimento de metazoários e está relacionado ao crescimento e proliferação celular, assim como na regulação do envelhecimento, metabolismo energético e fertilidade (Brogiolo et al. 2001; Oldham & Hafen 2003; Stern 2003). De um modo geral, este módulo reage a alterações em concentrações de nutrientes, principalmente açúcares e aminoácidos, e as traduz em uma resposta adequada de acordo com o tecido e fase da vida do organismo. A via de sinalização IIS, altamente conservada na evolução, constitui um exemplo de mecanismo regulador chave, o qual permite que os organismos se adaptem às mudanças de nutrientes (Puig & Tijan 2005, 2006).

A insulina e os peptídeos similares à insulina são moléculas de sinalização peptídicas, que devido à sua composição protéica, necessitam de um receptor de membrana, o receptor de insulina (IR), para a propagação do sinal. Os receptores para insulina e fatores de crescimento como insulina (IGF) são receptores tirosina-quinase. Eles formam homodímeros de uma proteína com subunidades α

(extracelular que se liga ao ligante insulina e/ou peptídeos como insulina) e β (intracelular com atividade tirosina-quinase), que são unidas por pontes dissulfídicas (Ruan *et al.* 1995). Diferentes dos outros receptores tirosina-quinase, que são induzidos a se dimerizarem na presença do ligante, os receptores de insulina já existem na superfície celular em forma de dímeros mesmo antes de interação com o ligante(s). A ligação do ligante induz uma mudança conformacional que induz a ligação de ATP e à autofosforilação (Kim & Accili 2002). A mudança conformacional, seguida da autofosforilação gera uma cascata de eventos que, entre outros, ativa a proteína substrato do receptor de insulina (IRS), resultando na ativação da quinase PI3K. Uma vez ativada, a quinase PI3K catalisa a fosforilação do inositol bi-fosfato (PIP₂), aumentando a produção de inositol tri-fosfato (PIP₃), o qual funciona como um segundo mensageiro ativando as quinases PDK e AKT (Radimerski *et al.* 2003; Goberdhan & Wilson 2003; Puig & Tijan 2005). A ativação da quinase AKT influencia a expressão gênica através de fatores de transcrição da família FOXO e dos genes supressores de tumor TSC. A fosforilação de FOXO leva à sua retenção no citoplasma e, portanto, uma diminuição na síntese de RNA de genes alvo-específicos que afetam o ciclo celular (Alvarez *et al.* 2001) e apoptose (Brunet *et al.* 1999). A ativação de AKT inibe os genes supressores de tumor, do complexo *tuberous escleroses* (TSC), que agem juntamente com a via TOR (*target of rapamycin*) e com a quinase S6K na regulação do crescimento celular (Oldhan & Hafen 2003). A ativação da sinalização via PDK, por sua vez, controla as atividades de várias outras quinases, incluindo AKT e S6K. (Goberdhan & Wilson 2003). A quinase ribossomal S6K é um regulador upstream de TOR e da proteína efetora 4E-BP1, e a integração dessas três proteínas controla o crescimento e o tamanho celular (Goberdhan & Wilson 2003, Dufner & Thomas 1999).

De maneira geral, quando um inseto se alimenta, os nutrientes são absorvidos pelo intestino médio e, subsequentemente, circulam pela hemolinfa criando um *pool* nutricional. Os diferentes componentes desse *pool* nutricional, quando absorvidos pelas células, ativam vias sensíveis a esse tipo de informação, nas quais estão incluídas as vias IIS e TOR (Figura 6). Além de serem absorvidos por órgãos em crescimento, os componentes nutricionais podem também ser metabolizados por células do corpo gorduroso, o principal órgão de estoque de insetos e comparável ao fígado dos vertebrados. Esses nutrientes, por si só, não causam o crescimento diferencial de órgãos, mas afetam os títulos de diferentes hormônios e em decorrência destes, permitem o crescimento diferencial de órgãos (Stern & Emlen 1999).

Estudos em insetos mostraram que a insulina e peptídeos similares à insulina são produzidos por células neurosecretoras do cérebro em resposta a alimentação (Wu & Brown 2006). Os peptídeos insulínicos são compostos de duas cadeias peptídicas, A e B, unidas por pontes dissulfídicas. Estas duas cadeias são sintetizadas como parte de um produto gênico maior chamado de pré-proinsulina que está ligado a um peptídeo sinal. Durante a secreção da pré-proinsulina o peptídeo sinal é removido por clivagem proteolítica originando a proinsulina. A proinsulina é convertida no peptídeo final, insulina ou peptídeo como insulina, pela excisão proteolítica da cadeia C. O peptídeo final é constituído do peptídeo A-B ligados covalentemente por duas ligações dissulfídicas inter-cadeias e uma ligação dissulfídica intra-cadeia (Wu & Brown 2006).

A sinalização através dos peptídeos como insulina, em particular a insulina, parece ser a via determinante do direcionamento de crescimento de órgãos, uma vez que o crescimento de órgãos responde quantitativamente ao nível de insulina

em circulação produzida por essas células (Stern 2003). A via IIS age, portanto, no sentido de informar as células o quanto dos nutrientes disponíveis elas podem absorver e quanto de crescimento elas podem suportar (Stern, 2003), e assim define o tamanho final do corpo dos insetos.

Figura 6: Esquema resumido da sinalização IIS baseado nas informações de *Drosophila melanogaster*. Em verde estão as moléculas que ativam outras moléculas, enquanto que em vermelho estão reguladores negativos da via. Em azul estão os alvos da via TOR, que constitui uma via paralela que converge com a via IIS formando a via IIS/TOR. Em amarelo estão os fatores de transcrição da família FOXO. A via foi esquematizada com base nos trabalhos de Dufner & Thomas 1999, Alvarez *et al.* 2001, Goberdhan & Wilson 2003, Oldham & Hafen 2003; Stern 2003, Tatar *et al.* 2003, Bateman & Neil 2004.

Este módulo de sinalização exerce o mesmo papel em organismos filogeneticamente distintos e, portanto, pode representar um componente importante também na diferenciação das castas de abelhas e nas suas funções no ciclo de vida adulta. Estudos recentes, principalmente em *Drosophila melanogaster*, têm apontado a via receptor de insulina/TOR como módulo importante que ajusta taxas de crescimento às condições de nutrientes disponíveis ao organismo (Oldham & Hafen 2003; Bateman & Neil 2004). A via IIS/TOR regula o envelhecimento em nematóides, moscas e roedores (Tatar *et al.* 2003) e desempenha importante papel no controle da duração do crescimento, taxa de crescimento e indução da metamorfose (Mirth *et al.* 2005; Colombani *et al.* 2005). Tais dados podem direcionar também os estudos em *Apis mellifera* sobre as diferenças no tempo de desenvolvimento das larvas e na longevidade das abelhas adultas operárias e rainhas.

Há pouco tempo, a via de sinalização IIS/TOR vem ocupando lugar de destaque no cenário de determinação de castas como um dos principais componentes de sinalização envolvidos na diferenciação de castas em *Apis mellifera*. Wheeler e colaboradores (2006), estudando a via IIS como candidata para estreitar as relações entre a dieta e os sinais *downstream* da determinação de castas, verificaram a transcrição de dois peptídeos similares a insulina (*AmILP-1* e *AmILP-2*). , sendo que a transcrição de *AmILP-1* foi maior no segundo instar larval de rainhas assim como a transcrição, em níveis mais altos, de um receptor de insulina (*AmInR-2*), enquanto nas operárias os níveis de transcrição dos genes para *AmILP-1* e *AmInR-2* foram baixos (Figura 7). Em um modelo, Seehuus e colaboradores (2006) sugeriram uma relação entre a via de sinalização IIS com as cascatas de sinalização do desenvolvimento, reprodução e longevidade ao longo da

evolução dos insetos sociais. Colocando este modelo em teste, Patel e colaboradores (2007) evidenciaram que larvas destinadas a se tornarem rainhas apresentaram características de operárias quando expostas ao inibidor de TOR, a rapamicina, indicando assim um papel importante para a via de sinalização IIS/TOR no desenvolvimento das castas. Dessa maneira, ao que tudo indica, a via IIS pode estar fortemente relacionada a vários dos principais eventos determinantes das diferenças existentes entre as castas em *Apis mellifera* e em insetos sociais em geral (Seehuus *et al.* 2006; Wheeler *et al.* 2006; The Honeybee Genome Sequencing Consortium 2006; Patel *et al.* 2007).

Figura 7: A) Expressão de *AmILP-1*, um peptídeo insulínico que é altamente expresso em larvas de rainhas. B) Expressão de *AmILP-2*, um segundo peptídeo insulínico. C) Expressão de *InR-2* em larvas de *Apis mellifera* (Wheeler *et al.* 2006).

2. Objetivos

Estudos recentes em *Apis mellifera* e, principalmente, em *Drosophila melanogaster*, têm apontado a rede de sinalização insulínica (IIS) / TOR (target of rapamycin) como módulo importante que ajusta taxas de crescimento às condições de nutrientes disponíveis ao organismo. O módulo de sinalização IIS/TOR exerce o mesmo papel em organismos filogeneticamente bastante distintos podendo, portanto, representar um componente importante também na diferenciação das castas de abelhas e nas suas funções no ciclo de vida adulta.

Como objetivos específicos foram definidos os seguintes:

- a) Identificar alguns dos principais genes constituintes da via IIS presentes no genoma de *Apis mellifera* utilizando a informação genômica recentemente disponível;
- b) Validar pontos críticos da predição in silico dos ortólogos do receptor de insulina em *Apis mellifera* (AmlR) por clonagem e sequenciamento de fragmentos amplificados;
- c) Investigar por RT-PCR quantitativa e semiquantitativa o perfil temporal da expressão de componentes chaves da via IIS no desenvolvimento larval, especialmente dos receptores de insulina;
- d) Investigar a possível interação entre os hormônios morfogenéticos (HJ e ecdisteróides) com a via IIS.

3 Material e métodos

3.1 Abelhas

O estudo foi realizado utilizando-se diferentes núcleos de abelhas africanizadas *Apis mellifera* do apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP).

Tanto para a obtenção de operárias quanto de rainhas foi realizado um procedimento inicial com a finalidade de controlar as idades larvais. Neste, a rainha foi aprisionada por cerca de 6 horas, sob uma tela de exclusão, em uma região do favo adequada para postura. Este procedimento possibilitou a obtenção de larvas e pupas com aproximadamente a mesma idade.

3.1.1 Operárias

Para a coleta de operárias de *Apis mellifera* nos estágios de desenvolvimento pós-embrionário, favos contendo as crias nos diferentes estágios larvais (L₂, L₃, L₄, L₅F₁, L₅F₂, L₅F₃, L₅S₁, L₅S₂ e L₅S₃), pré-pupais e pupais foram selecionados e levados a uma sala própria, onde as larvas, pré-pupas e pupas foram retiradas das células com o auxílio de uma colher suíça ou pinça e colocadas sobre placas de Petri forradas com papel de filtro. As larvas foram classificadas nos diferentes estágios larvais de acordo com o seu peso corporal e o tamanho da sua cápsula cefálica (Michellete & Soares 1993). As pré-pupas foram classificadas de acordo com características morfológicas de cada fase como: a formação da constrição torácica, a falta de movimentação, a posição da larva na célula entre outras, e as pupas foram classificadas de acordo com a pigmentação dos olhos e cutícula (Michellete & Soares 1993).

Após a identificação de cada estágio as operárias foram colocadas em tubos estéreis de 2ml contendo 1ml de TRIzol® (Invitrogen) onde foram homogeneizadas com o auxílio de uma ponteira de micro-pipeta e guardadas no freezer -80°C para a extração de RNA (Item 3.3). Do estágio L2 foram colocadas aproximadamente vinte larvas por tubo; do estágio L3 por volta de dez larvas por tubo; do estágio L4 cerca de cinco larvas por tubo e do estágio L5 até pupa de olho escuro, dois indivíduos por tubo.

A fim de obter abelhas operárias adultas recém emergidas para o experimento com diferentes tipos de alimentação (Item 3.4) e para a obtenção de operárias adultas com diferentes idades, um quadro com abelhas em vias de emergirem foi mantido em uma gaiola na incubadora por um período de 12 a 16 horas e as abelhas que emergiram durante esse tempo foram coletadas. Estas abelhas foram marcadas com tinta, inodora e atóxica, na região dorsal do tórax e devolvidas na colméia ou transferidas para caixas em experimentos com diferentes tipos da alimentação. As abelhas mantidas sob diferentes dietas foram coletadas entre 1 e 11 dias de vida adulta, enquanto que as mantidas na colméia foram coletadas até 24 dias. As abelhas foram anestesiadas sob gelo, tiveram seus intestinos retirados e, então, foram colocadas em tubos contendo 1ml de TRIzol® para extração de RNA (Item 3.3).

3.1.2 Rainhas

As rainhas foram obtidas por transferência para realeiras artificiais de larvas L₁, obtidas por postura controlada. As larvas foram transferidas com o auxílio de uma colher suíça para realeiras contendo geléia real e, posteriormente, levadas para colméias de recria. Uma colméia de recria corresponde a duas caixas do tipo

Langstroth dispostas uma sobre a outra e separadas por uma tela excludora da rainha, que impede a passagem da mesma para o compartimento superior onde são introduzidas as barras contendo as realeiras. As fases de desenvolvimento larval, pré-pupal e pupal foram classificadas da mesma maneira como as operárias (Item 3.1.1), mas seguindo a descrição de Rembold e colaboradores (1980).

Após a identificação de cada estágio as rainhas foram colocadas em tubos estéreis de 2ml contendo 1ml de TRIzol® (Invitrogen) onde foram homogeneizadas com o auxílio de uma ponteira, estéril, de micro-pipeta e guardadas no freezer -80°C para a extração de RNA. Do estágio L3 foram colocadas aproximadamente dez larvas por tubo, do estágio L4 cerca de cinco larvas por tubo e do estágio L5 até pupa de olho escuro dois indivíduos por tubo.

3.2 Dissecção do material biológico

Para obtenção dos ovários, larvas de rainhas e operárias em diferentes estágios (L4, L5F3, L5S1, L5S3 e PP1) obtidas de acordo com os itens 3.1, foram dissecadas em solução salina 0,9% estéril. As mesmas foram mergulhadas em solução salina sob uma placa de Petri de vidro, preenchida com parafina sólida, e fixadas com alfinete entomológico de maneira que a região dorsal ficou para cima. Com o auxílio de pinças de ponta fina as abelhas foram abertas em extensão antero-posterior, na região do abdômen, e os ovários de operárias e rainhas foram retirados, colocados em 500 µl de reagente TRIzol® (Invitrogen) e estocados no freezer (-80°C) até o momento da extração do RNA. Todos os materiais utilizados foram lavados e esterilizados. Os números de pares de ovários coletados para cada fase variaram entre oito e doze pares.

3.3 Extração do RNA total e síntese do cDNA

Os materiais biológicos mantidos em TRIzol® (Invitrogen) no freezer -80°C (corpo inteiro e ovários de rainhas e operárias) para extração do RNA foram retirados e deixados na bancada para descongelarem. Posteriormente, os mesmos foram centrifugados por 10 minutos à 4°C e 12.000g e os procedimentos de extração seguiram o protocolo do fabricante para a extração com TRIzol® (Invitrogen). O RNA obtido foi ressuspendido em água deionizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% para evitar degradação. A concentração e qualidade das amostras foram estimadas em espectrofotômetro. As leituras foram feitas a 260nm e 280nm, considerando-se RNA de pureza adequada quando a relação 260/280nm atingiu valores entre 1,4 -1,7.

Anteriormente à síntese do cDNA (DNA complementar ao RNA mensageiro), o RNA foi tratado com DNase (*RQ1 Rnase-Free Dnase*, Promega) por 1 hora a 37°C e em seguida a 65°C por 15 minutos, para desnaturar a enzima. Para obter a primeira fita de cDNA foram utilizados diferentes quantidades de RNA total: para as amostras de corpo inteiro de larvas de operárias e rainhas foram utilizados 2 μg , para as amostras de ovários de operárias e rainhas utilizamos 0,9 μg , para as amostras de larvas de operárias tratadas com PPN utilizamos 1 μg , para as amostras de operárias adultas e cultivadas em diferentes tipos de alimentos utilizamos 2,5 μg . A primeira fita de cDNA foi obtida em protocolo de síntese que utiliza Superscript II (Invitrogen) e *Oligo (dT)₁₂₋₁₈* (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. Por este método, apenas a primeira fita do cDNA é sintetizada através de transcrição reversa. A segunda fita é gerada por PCR com o uso de primers específicos.

As bibliotecas de cDNA, originadas a partir do RNA total foram normalizadas para os genes da actina de *Apis mellifera* (número de acesso ao Official_Gen_Set GB17681). Os primers utilizados para a amplificação da actina foram: ACT-forward (5'- TGC CAA CAC TGT CCT TTC TG- 3') e ACT-reverse (5'- AGA ATT GAC CCA CCA ATC CA-3') e a temperatura de anelamento foi 60°C (Nascimento et al, 2004). O produto de amplificação de 154 pb da actina foi visualizado em gel de agarose 1,2% e corado com brometo de etídio. Além do gene para actina, as amostras foram normalizadas, também, para o gene codificador da proteína ribossomal RP49 (GenBank accession number AF441189) Os primers utilizados foram RP49-F (CGT CAT ATG TTG CCA ACT GGT) e RP49-R (TTG AGC ACG TTC AAC AAT GG). O RP49 foi utilizado como normalizador das reações de PCR quantitativa (Item 3.7.1) enquanto que a actina foi utilizada como normalizador nas reações de PCR semi-quantitativa (Item 3.7.2).

3.4 Operárias recém emergidas mantidas sob diferentes tipos de alimentação

Para realização dos experimentos com diferentes tipos de alimentação foram coletadas amostras de geléia real, *bee bread* e mel. A geléia real foi coletada com o auxílio de uma colher suíça das realeiras utilizadas para a criação de rainhas, pois as operárias nutridoras depositam continuamente geléia real em realeiras contendo larvas, e armazenada em tubos de 2ml. O *bee bread* utilizado era constituído de 30% de pólen, que foi retirado diretamente dos favos com o auxílio de uma colher suíça, e 70% de xarope (açúcar dissolvido em água na concentração de 1:1 (p:v)). O mel utilizado foi mel puro de *Apis mellifera* comprado comercialmente. Todos os alimentos, com exceção do mel, que ficou à temperatura ambiente, foram estocados na geladeira e retirados minutos antes da alimentação.

Utilizamos três caixas (10X12X5 cm) com cerca de 30 abelhas operárias em cada uma, que foram mantidas sobre as respectivas dietas a partir do segundo dia da introdução. No primeiro dia de adulta, as operárias recém emergidas receberam como alimento suplementar um alimentador com geléia real, que de acordo com observações empíricas em nosso laboratório é essencial para ativação de algumas proteases no intestino de abelhas jovens. O abastecimento dos alimentadores e a limpeza das caixas, fezes e abelhas mortas, ocorreram diariamente. Além disso, cada caixa recebeu um alimentador com água para consumo *ad libitum*. A Figura 8, abaixo, representa o modelo da caixa utilizada no experimento. Como controle, abelhas recém emergidas foram marcadas e retornadas à colméia de origem.

As abelhas mantidas nas caixas sob diferentes dietas foram coletadas entre 1 e 11 dias, anestesiadas sob gelo, tiveram seus intestinos retirados e, então, foram colocadas em tubos contendo 1ml de TRIzol® para extração de RNA (Item 3.3).

Figura 8: Modelo de caixa utilizado para manutenção das abelhas operárias em diferentes tipos de alimentação.

3.5 Tratamento com análogo do hormônio juvenil, pyriproxifen (PPN)

Foram aplicados 0,5 μ l de solução PPN (10 mg de PPN por μ l de hexano) com o auxílio de uma micropipeta em larvas operárias de 3 dias, diretamente no

favo. Os respectivos alvéolos foram mapeados com a utilização de uma folha de acetato e canetas de retro-projetor. Após mapear as áreas tratadas com PPN e os controles [solvente (hexano) e sem tratamento] o quadro contendo as larvas foi retornado à colméia. As larvas foram coletadas e colocadas no Trizol® para extração do RNA (Item 3.3) 2, 6 e 24 horas após o tratamento.

3.6 Desenho de primers

Primers específicos para genes de interesse na sinalização pela via IIS foram desenhados utilizando-se de dois programas diferentes, a fim de garantir uma boa qualidade dos mesmos. Os programas utilizados foram o Primer3 disponível na rede http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi e o programa Gene Runner versão 3.05.

Os primers foram desenhados sob o genoma de *Apis mellifera* versão 3.0 e 4.0 disponíveis nos sites <http://zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab/index.html> e <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/> a partir das predições disponíveis no banco de dados Official_Gene_Set (<http://zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab/index.html>)

Foram desenhados primers para os genes codificadores do receptor de insulina *InR1* (número de acesso no Official_Gene_Set GB15492) e *InR2* (número de acesso no Official_Gene_Set GB18331); para o gene *chico*, codificador do substrato para o receptor de insulina (número de acesso no Official_Gene_Set GB11037); para a quinase da proteína ribossomal *S6K* (número de acesso no Official_Gene_Set GB19390), para o gene codificador de um alvo para rapamicina, *TOR* (número de acesso no Official_Gene_Set GB11213) e, por ultimo, para a

proteína Tuberous sclerosis –1 (Tsc1) (número de acesso no Official_Gene_Set GB12676-PA). Os primers desenhados seguem na tabela abaixo:

Tabela 1: Primers específicos para análise de expressão de genes integrantes da via IIS, identificados com os seus respectivos números de acesso no banco de dados Official_Gene_Set

Gene	Nº. de acesso no Official_Gene_Set	Nome do primer	Seqüência 5'- 3'	Temperatura de anelamento
<i>InR1</i>	GB15492	InR1-F	GGA TCT GGT GTG GGA CAG TT	60°C
		InR1-R	ATC CCC ACG TCG AGT ATC TG	60°C
<i>InR2</i>	GB18331	IR3-F	CCA ACT CCT TCA CGA TGT TC	60°C
		IR3-R	GTG TGC GAG AAG CAC TGT C	60°C
		IR2-F	CGT TGG TCA TCA TGG AGT TG	52°C
		IR2-R	TCC GGG CTG TGA TAG AAG C	52°C
<i>Chico</i>	GB11037	Chico-F	CAT TCA TGT ATC GTC CTC TGC	60°C
		Chico-R	GCA TCT GCA ATA GTA CGA TCG	60°C
<i>TSC-1</i>	GB12676	TSC1-F	CGA CCA TCT ACA CCG ATT CC	60°C
		TSC1-R	GTC CCA GAA TGC GTA CAA GC	60°C
<i>TOR</i>	GB11213	TOR-F	GGC TAT ATC CTT GGT CTT GG	60°C
		TOR-R	GCT CTG CTC TTG ATT ACT GC	60°C
<i>S6K</i>	GB19390	S6K-F	GAA AGG GTG GTT ATG GCA AG	60°C
		S6K-R	GGT CTA CGA TGA AAG GAT GC	60°C

3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As bibliotecas de cDNA sintetizadas a partir do RNA (Item 3.3) foram utilizadas como moldes para as reações de PCR quantitativas (Real Time) e semi-quantitativas.

3.7.1 *PCR quantitativa (Real Time PCR)*

Para a reação de amplificação em tempo real foi utilizado a metodologia SYBR® Green no sistema Real Time PCR 7500 (Applied Biosystems). Em cada reação utilizamos 10µl de SYBR Green (Applied Biosystems), 0,5µl de cada primer (10 pmol/µl) e 1µl da solução de cDNA diluída (utilizou-se diluições seriadas 1:10). Os valores de quantificação relativa foram calculados utilizando-se a metodologia de Pfaffl (2001).

Para amplificação dos transcritos dos genes codificando os receptores de insulina em *Apis mellifera* foram utilizados os primers InR1-F e InR1-R para o gene

InR1 (GB15492) (Item 3.6) e para o gene *InR2* (GB18331) utilizamos os primers desenhados por Wheeler e colaboradores (2006), *InR2-F* (5' GGG AAG AAC ATC GTG AAG GA 3') e *InR2-R* (5' CAT CAC GAG CAG CGT GTA CT 3'). As amplificações ocorreram conforme protocolo padrão do sistema Real Time PCR 7500 (Applied Biosystems). A eficiência dos primers foi verificada por RT-PCR quantitativa utilizando-se diluições seriadas, de cDNA 1:10, para cada par de primers. Os valores de regressão linear foram conferidos, sendo considerados eficientes os primers com coeficiente de correlação $r > 0,95$ e com o valor de E próximo de 2 [$E=10^{(-1/\text{slope})}$] (Pfaffl 2001). Para a confecção dos gráficos com os resultados da quantificação relativa entre os genes alvos e o normalizador RP49 foram calculados os valores da taxa = $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl 2001).

3.7.2 PCR semi-quantitativa

Para amplificação dos transcritos por PCR semi-quantitativa utilizamos as soluções Eppendorf Master Mix (2,5X) (Eppendorf) e Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (invitrogen) e os pares de primers: *InR-1*, *IR2*, *IR3*, *Chico*, *TSC-1*, *TOR*, *S6K* (Tabela 1).

A reação para a solução de master mix foi:

- Água deionizada e autoclavada	12µl
- Master Mix (2,5X; Eppendorf)	10µl
- Primer forward (10 µM)	1µl
- Primer reverse (10 µM)	1µl
- cDNA	1µl
	25µl (volume final)

A reação para Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (invitrogen) foi:

- Tampão High Fidelity 10X	2,5µl
- dNTP mix 10mM	0,5µl
- MgSO ₄ 50mM	1µl
- Primer-F	1µl
- Primer-R	1µl
- Água deionizada e autoclavada	17,85µl
- Platinum® <i>Taq</i> High Fidelity	0,015µl
- cDNA	1µl

25µl (volume final)

A máquina de PCR utilizada foi um termociclador PTC*200 (MJ Research) e o programa de amplificação foi:

- 1) 95° por 5 minutos
- 2) 95° por 30 segundos
- 3) temperatura de anelamento do primer (Item 3.6) por 30 segundos
- 4) 72°C por 1 minuto
- 5) go to 2 (entre 29 e 39 vezes)
- 6) 72°C por 10 minutos
- 7) 4°C por tempo indeterminado

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

3.8 Preparo das células quimiocompetentes

Células competentes foram obtidas a partir de células bacterianas *E.coli*, da linhagem DH5 α , seguindo o protocolo do manual de laboratório de Sambrook et al. (1989). Foram inoculados 5ml de meio LB (Luria Bertani) com células DH5 α (-80°) e crescidas à 37°C sob agitação (250 rpm) durante a noite. Para expansão, uma alíquota de 50 μ l do cultivo líquido foi inoculado em 50ml de meio LB e deixado para crescer à 37°C sob agitação de 250 rpm, até atingir uma DO (595nm) de aproximadamente 0,3 – 0,4. Após atingir a densidade ótica desejada a amostra foi aliqotada em tubos estéreis Corex e centrifugada a 6000rpm por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e o precipitado de um dos tubos ressuspendido em 5ml de CaCl₂ 0,1M. Após ressuspender o primeiro tubo, o conteúdo foi passado para o próximo tubo, para ressuspendê-lo, e assim por diante até o ultimo tubo. Após ressuspender todos os precipitados, a amostra foi centrifugada a 6000rpm por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado ressuspendido com 5ml de CaCl₂ 0,1M contendo 15% de glicerol. A solução contendo as células competentes foi aliqotada em tubos de crioproteção (250 μ l) e congelada à -80°C.

Todas as vidrarias e soluções utilizadas foram auto-clavadas à 120°C por 45 minutos.

3.9 Clonagem e sequenciamento

Os fragmentos obtidos por amplificação com os pares de primers IR2, IR3, InR-1, Chico e S6K. Foram analisadas em gel de agarose 1,2%. As bandas foram retiradas do gel e o DNA purificado com a utilização do kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel) ou o kit Perfectprep® Gel Cleanup (Eppendorf) seguindo o protocolo do

respectivo fabricante. A inserção em vetor pGEM-T (kit pGEM-T Easy Vector®, Promega) ou em vetor TOPO® (kit TOPO TA Cloning®, Invitrogen) também foi feita de acordo com o protocolo de cada fabricante. A transformação das células competentes ocorreu por choque térmico (30 minutos no gelo - um minuto à 42°C - gelo). Após a transformação as células foram incubadas à 37°C por cerca de duas horas em meio líquido LB sem penicilina. Após a incubação, as células foram plaqueadas em meio de cultura LB-ágar (1,5%) contendo Ampicilina (USB; 100µg/ml), X-Gal (5-Bromo-chloro-3 indolyl-B-D-Galactoside- USB; 4µg/ml), de maneira que apenas as células transformadas se desenvolveram no meio. As colônias transformadas contendo os fragmentos (colônias brancas) foram selecionadas e cultivadas, em tubos Falcon, overnight à 37°C, sob agitação, em meio LB líquido com ampicilina (40mg/ml).

Os vetores contendo os fragmentos foram retirados das células competentes utilizando-se o kit Fast Plasmid Mini® (Eppendorf) ou o kit GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) seguindo o protocolo de cada fabricante. Para verificar a presença do inserto o plasmídeo foi clivado com a enzima EcoRI (digestão de 8µl de DNA por 2 horas à 37°C) e analisado em gel de agarose 1,2% com tampão 1x TBE, corado com brometo de etídio.

Os clones que possuíam o inserto foram submetidos à reação de PCR com o mix Big dye terminator (Perkin Elmer) utilizando os primers universais M13 forward (5' CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3') ou M13 reverse.(5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'), seguindo o método de Sanger. O DNA resultante da PCR foi transferido para microtubos de 1,5 ml e precipitado por adição de 40µl de isopropanol 75% para cada volume de 10µl de reação. Após uma breve agitação os microtubos foram deixados 15 minutos à temperatura ambiente e em seguida foram

centrifugados à temperatura ambiente por 20 minutos a 14.000 rpm. Os sobrenadantes foram retirados e aos precipitados foram adicionados 250 µl de isopropanol 75%. As amostras foram agitadas rapidamente e centrifugadas por 5 minutos à 14.000 rpm. Os sobrenadantes foram retirados e todo o álcool foi evaporado em banho seco à 59°C. Após secar por completo o DNA foi ressuspendido em 12µl da solução Template Suppression Reagent (TSR) (ABI PRISM ®, Applied Biosciences). As amostras foram transferidas para tubos de sequenciamento. O seqüenciador utilizado foi um seqüenciador de capilar ABI 310 (Applied Biosciences). As seqüências obtidas foram submetidas a análises tipo BLAST contra os bancos de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Official_Gene_Set (<http://zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab/index.html>).

3.10 Análise in silico

O sequenciamento recente do genoma da abelha (<http://hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>), a disponibilidade de grande número de etiquetas de seqüências expressas e a disponibilidade de seqüências de outros organismos em bancos de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) torna a análise computacional (*in silico*) uma poderosa ferramenta no avanço das pesquisas com *Apis mellifera*. A fim de buscar genes codificadores de receptores de insulina de diversos organismos foi feito uma busca no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e as seqüências obtidas serviram de entrada para buscas TBLASTN contra genoma de *Apis mellifera* (assembly Amel 3.0 e 4.0) e genes preditos de *Apis mellifera* (GLEAN3 set) (http://zulu.fmrp.usp.br/beelab/bioinfo_blast). As ferramentas BLAST foram utilizadas, também, na verificação das seqüências obtidas por clonagem e

sequenciamento (Item 3.9) Outras ferramentas computacionais também foram utilizadas, como ClustalW (<http://align.genome.jp/>), o programa para anotação de genes Artemis (Sanger, Release 7) e os softwares GeneRunner 3.05 e Primer3 para desenhar primers (Item 3.6).

3.11 3' RACE do gene *InR-2* (GB18331)

A fim de esclarecer se a seqüência predita para o gene *InR2* (GB18331) de aproximadamente 7000pb não estaria superestimada na sua extremidade 3', devido o tamanho do ortólogo em *Drosophila* (Ruan *et al.* 1995), realizamos uma reação 3'RACE utilizando o primer IR2-F (5' CGT TGG TCA TCA TGG AGT TG 3') que ancora dentro do domínio tirosina quinase e um primer oligo(dT)₁₂₋₁₈. O fragmento predito para esta reação seria um produto de aproximadamente 3500pb.

Na reação de PCR utilizamos a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). O mix de reação consistiu de 16,5 µl H₂O deionizada bidestilada, 2,5 µl Tampão HiFi (Invitrogen), 1 µl MgSO₄ (50 mM), 1 µl dNTP (10mM), 1,5 µl de cada primer (10pmol/µl), 1 µl de cDNA e 0,3 µl de Taq Hi-Fi. O programa da amplificação consistiu dos seguintes passos: 95°C por 5 min; 50 ciclos - 95°C por 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 2 min - seguido por uma elongação final a 72°C por 10 min.

4. Resultados

4.1 Identificação de genes candidatos da via IIS no genoma de *Apis mellifera*

A fim de obter informações a respeito dos genes envolvidos na via do receptor de insulina, foi feita uma revisão bibliográfica sobre a via de insulina nos organismos metazoários. Os genes constituintes da via do receptor de insulina de *H. sapiens*, *M. musculus* e, principalmente, de *Drosophila melanogaster* serviram de base para uma busca no genoma de *Apis mellifera* e elaboração de uma tabela contendo os números de acesso ao banco de dados Oficial_Gene_Set (<http://zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab/index.html>), onde se encontram as predições gênicas de *Apis mellifera* (Tabela 2).

Dois genes candidatos para receptores de insulina em *Apis mellifera* (GB15492 e GB18331) foram identificados pelas ferramentas blastp e blastn, anotados com o auxílio da ferramenta computacional Artemis (versão 7.0) e tiveram primers específicos desenhados para cada um deles (Item 3.6 – tabela 1). Posteriormente foram seqüenciados parcialmente e tiveram seus perfis de transcrição investigados em alguns estágios do ciclo de vida da abelha (Item 4.2). Os genes codificadores para os receptores de insulina são denominados *InR1* (GB15492) e *InR2* (GB18331), que é a denominação atribuída por Dr. Miguel Corona, o anotador oficial do Consórcio de Genoma de Abelha designado para este grupo de genes.

Além dos dois genes codificadores para o receptor de insulina, foram identificados e analisados outros genes constituintes da via de sinalização IIS. Os genes *Chico* (GB11037), *TSC-1*(GB12676), *TOR* (GB11213) e *S6K* (GB19390)

foram anotados com o auxílio da ferramenta computacional Artemis, analisados com ferramentas BLASTs, tiveram primers específicos desenhados para cada uma deles (Item 3.6 – tabela 1) e sua transcrição verificada por RT-PCR (Item 4.1.1). Além disso, os genes *Chico* e *S6K* foram parcialmente seqüenciados juntamente com os genes para os receptores de insulina.

Tabela 2: Genes integrantes à via de sinalização insulínica. Do lado esquerdo da tabela está representado o organismo do qual a sequência de busca foi obtida, o nome do gene e o número de acesso no GenBank; do lado direito da tabela está representado o provável ortólogo de cada gene em *Apis mellifera* com o seu número de acesso (GB) no banco de dados Official_Gene_Set, assim como o valor de similaridade (E-value) entre os genes de *Apis mellifera* e o seu correspondente no organismo da coluna 1.

Organismo	Gene	GenBank number	Organismo	Official gene set	valor E
<i>D. melanogaster</i>	<i>InR</i>	A56081	<i>A. mellifera</i>	GB18331	0.0
<i>D. melanogaster</i>	<i>InR</i>	A56081	<i>A. mellifera</i>	GB15492	e^{-109}
<i>D. melanogaster</i>	<i>CHICO</i>	NM_164899	<i>A. mellifera</i>	GB11037	$5e^{-49}$
<i>D. melanogaster</i>	<i>FOXO isof. A</i>	NM_142073.3	<i>A. mellifera</i>	GB13873	$8e^{-34}$
<i>D. melanogaster</i>	<i>FOXO isof. B</i>	NP_996205.1	<i>A. mellifera</i>	GB13873	$2e^{-61}$
<i>D. melanogaster</i>	<i>FOXO isof. C</i>	NP_996204.1	<i>A. mellifera</i>	GB13873	$8e^{-62}$
<i>D. melanogaster</i>	<i>Tsc1</i>	NM_058067.2	<i>A. mellifera</i>	GB12676	e^{-77}
<i>D. melanogaster</i>	<i>S6K</i>	NM_079217.2	<i>A. mellifera</i>	GB19390	e^{-158}
<i>D. melanogaster</i>	<i>PTEN isof. B</i>	NP_477423.1	<i>A. mellifera</i>	GB14441	$6e^{-75}$
<i>D. melanogaster</i>	<i>TOR</i>	NM_080152.2	<i>A. mellifera</i>	GB11213	0.0
<i>D. melanogaster</i>	<i>TOR</i>	NM_080152.2	<i>A. mellifera</i>	GB18026	$8e^{-67}$
<i>D. melanogaster</i>	<i>TOR</i>	NM_080152.2	<i>A. mellifera</i>	GB10887	$7e^{-52}$
<i>D. melanogaster</i>	<i>TOR</i>	NM_080152.2	<i>A. mellifera</i>	GB16077	$5e^{-50}$
<i>D. melanogaster</i>	<i>TOR</i>	NM_080152.2	<i>A. mellifera</i>	GB11176	$5e^{-32}$
<i>H. sapiens</i>	<i>PTEN</i>	NM_000314	<i>A. mellifera</i>	GB14441	$3e^{-91}$
<i>Mus musculus</i>	<i>PDK1</i>	AAO17164	<i>A. mellifera</i>	GB15780	e^{-142}

4.1.1 Validação da transcrição de alguns genes integrantes da via IIS

Foram desenhados primers para os genes *InR1*, *InR2*, *Chico*, *TSC1*, *TOR* e *S6K* (Item 3.6) e a transcrição dos mesmos foi verificada por RT-PCR semiquantitativa (Figuras 9 e 10). Os primers utilizados para verificar a transcrição dos genes constituintes da via IIS foram: o par IR2-F e IR2-R para o gene *InR2* (amplificando um fragmento de ~ 600pb); o par InR1-F e InR1-R para o gene *InR1* (amplificando um fragmento de ~150pb); o par TOR-F e TOR-R para o gene *TOR* (amplificando um fragmento de ~ 370pb), o par TSC1-F e TSC1-R para o gene *TSC1* (amplificando um fragmento de ~ 700pb), o par Chico-F e Chico-R para o gene *CHICO* (amplificando um fragmento de ~ 640pb) e o par de primers S6K-F e S6K-R para o gene *S6K* (amplificando um fragmento de ~ 180pb) (Figura 9)

TOR TSC1 Chico S6K Actina M100pb

Figura 9: Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio. A RT-PCR com os primers específicos para os genes *TOR* (~370pb), *TSC1* (~700 pb), *CHICO* (~640pb), *S6K* (~180pb) ocorreu à 60°C, com 40 ciclos e o cDNA molde foi de rainha no quarto instar larval. Primer específico para actina (~150pb) foi utilizado como controle positivo da amostra.

Figura 10: Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio. A PCR com os primers específicos para os genes *InR1* (~150pb) e *InR2* (~600pb) ocorreu à 60°C, com 40 ciclos e o cDNA molde foi de rainha no quarto instar larval.

4.1.2 Anotação dos genes envolvidos na via IIS.

4.1.2.1 Gene codificador do receptor de insulina 1 (GB15492)

A anotação na plataforma Artemis (versão 7.0) evidenciou que o gene predito como GB15492, de 4.320 nt, possui seis exons (Figura 11A). Para verificar os domínios conservados presentes em sua proteína utilizamos a ferramenta RPSBLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) e verificamos a presença dos domínios L (ligante), do domínio Furina, do domínio Fibronectina-tipo3 e do domínio Tirosina Quinase (Figura 11B). Os dois domínios L assim como o domínio Furina (região rica em cisteína) fazem parte da estrutura extracelular onde se liga o hormônio insulina ou os fatores de crescimento similar à insulina ao domínio L (Garrett, *et al.* 1998). O domínio Fibronectina-tipo3 é um tipo de domínio encontrado em vários tipos de proteínas, tais como receptor de fatores de crescimento e receptores tirosino-quinase. O domínio Tirosina-quinase é o domínio intracelular responsável pela transmissão de sinal para os mensageiros intracelulares como o inositol tri-fosfato (IP3) após ativação da enzima inositol-tri-fosfato quinase (PI3K). Foram desenhados primers específicos para esse gene

(InR1-F e InR1-R), os quais amplificam um trecho de aproximadamente 151pb localizado no domínio tirosina quinase (Figuras 11A e 11B) que foi clonado e seqüenciado (Figura 11C).

Figura 11: Gene *InR1* de *Apis mellifera*. (A) O gene predito (GB15492) foi mapeado sobre o genoma (Amel versão 4.0) na plataforma Artemis (versão 7.0). Primers para validação da expressão por RT-PCR foram desenhados para um fragmento na região do domínio tirosina quinase, cobrindo parte do exon 6. (B) RPS-blast para detecção de domínios conservados. (C) Sequenciamento do fragmento de PCR de 151 pb amplificado pelos primers InR1-F e InR1-R (marcados em negrito) correspondente ao domínio tirosina quinase.

A fim de verificar a similaridade entre o gene *InR1* e o gene predito GB15492 foi feito análise BLASTN entre a seqüência do fragmento originado pelo par de primers InR1 e o banco de dados Official Gene Set, contendo os genes preditos do genoma de *Apis mellifera*. A similaridade obtida foi de 100% (Figura 12).

Figura 12: BLASTN do sequenciamento do produto de PCR obtido pelos primers InR1-F e InR1-R contra o banco de dados Official Gene Set (zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab). A identidade da sequência foi de 100% entre o fragmento sequenciado e o predito GB15492.

4.1.2.2 Gene codificador do receptor de insulina 2 (GB18331)

A anotação na plataforma Artemis (versão 7.0) evidenciou que o gene predito como GB18331, de 7.113 nt, possui treze exons (Figura 13A). Os domínios conservados foram verificados por RPSBLAST evidenciando que o gene predito GB18331 possui, além de todos os domínios descritos para o gene InR1 (Item 4.1.2.1), o domínio PDZ que pode ser responsável por interações com outras moléculas (Figura 13B).

Foram desenhados três pares de primers para o gene *InR2*, dois no domínio furina e um no domínio tirosina quinase (Figura 13A). O par de primers IR3 (Figura 13A) amplifica um trecho de aproximadamente 550pb localizado no domínio furina. O par de primers InR2 amplifica um fragmento de aproximadamente 150pb localizado no domínio furina, esses primers foram desenhados por Wheeler e colaboradores (2006) (Figuras 13A e 13B) e foram utilizados para quantificação

relativa (Item 4.2.2). O par de primers IR2 (Figura 13A) amplifica um fragmento de aproximadamente 625pb localizado no domínio tirosina (Figuras 13A e 13B). Os fragmentos obtidos com os pares de primers IR3 e IR2 foram clonados e sequenciados para validação experimental dos genes observados (Figura 13C). As seqüências dos fragmentos obtidas foram submetidas à análise BLASTN contra o banco de dados Official_Gene_Set . As similaridades observadas entre os fragmentos originados pelos pares de primers IR3 e IR2 foram, para ambos, de 98% com relação ao predito GB18331 (Figuras 14 e 15).

Figura 13: Gene *InR2* de *Apis mellifera*. (A) O gene predito (GB18331) foi mapeado sobre o genoma (Amel versão 4.0) na plataforma Artemis (versão 7.0). Primers para validação da expressão por RT-PCR foram desenhados para fragmento na região do domínio tirosino quinase (IR2) cobrindo parte dos exons 9 e 10 e para a região do domínio furina (IR3 e InR2) cobrindo parte dos exons 4 e 5. (B) RPS-blast para detecção de domínios conservados. (C) Sequenciamento do fragmento de PCR de 625 pb amplificado pelos primers IR2-F(marcado em verde) e IR2-R (não sequenciado) correspondente a uma região do domínio tirosina quinase. (D) Sequenciamento do fragmento de PCR de 550pb amplificado pelo primer IR3-F (em azul e sequenciado parcialmente) e IR3-R (em azul sequenciado completamente).

```

Query: 63      CGATGTTCTTCGCGCCCGGATCTCTGGATCTCGAGGCTGCCCTTATGTGCTGCGAGCCCC 122
              |||||
Sbjct: 1588    CGATGTTCTTCGCCCGCCCGGATCTCTGGATCTCGAGGCTGCCCTTATATGGGTGCGAGCCCC 1529

Query: 123     GAGCTTCTGCGCCGAGGCGATGCTGTCCACGTTGCGCGCCCGCGCACTCCTTCTGGCAG 182
              | |||||
Sbjct: 1528    GCAGCTTCTGCGCCGAGGCGATGCTGTCCACGTTGCGCGCCCGCGCACTCCTTCTGGCAG 1469

Query: 183     AGCCCTGCGCACTTCTTGCACGAGACCCCTCCCGTTGCACTCGTCTGCATGTAGCCGGCG 242
              |||||
Sbjct: 1468    AGCCCTGCGCACTTCTTGCACGAGACCCCTCCCGTTGCACTCGTCTGCATGTAGCCGGCG 1409

Query: 243     GCGACTGCATCAGCGAGCTCCCGTTGAAAGGCTTGTACGGGTAGTTCTTCACGTTCTTCA 302
              |||||
Sbjct: 1408    GCGACTGCATCAGCGAGCTCCCGTTGAAAGGCTTGTACGGGTAGTTCTTCACGTTCTTCA 1349

Query: 303     ACACCTCCTTGGGCTTCTCATCTGGAGGCACTCTCGCCTCGTCTATGCACGGGTGATTCA 362
              |||||
Sbjct: 1348    ACACCTCCTTGGGCTTCTCATCTGGAGGCACTCTCGCCTCGTCTATGCACGGGTGATTCA 1289

Query: 363     TGAAGTCCAGGCTCCCGTTGCGGCACCGTTCCCTGCACTCCGAGTGGCCCGTCACCAAGT 422
              |||||
Sbjct: 1288    TGAAGTCCAGGCTCCCGTTGCGGCACCGTTCCCTGCACTCCGAGTGGCCCGTCACCAAGT 1229

Query: 423     CCTTGCACACCGTACAGTCCGCGATTCTGCGCCCGCTGCACTGCCCAGGCACGACAGT 482
              |||||
Sbjct: 1228    CCTTGCACACCGTACAGTCCGCGATTCTGCGCCCGCTGCACTGCCCAGGCACGACAGT 1169

Query: 483     GGCAACAGTTCCAGCCCTCGTCCACAGCGGTGTTCTCGCACTTTCTGTCCGAGATTGGTT 542
              |||||
Sbjct: 1168    GGCAACAGTTCCAGCCCTCGTCCACAGCGGTGTTCTCGCACTTTCTGTCCGAGATTGGTT 1109

Query: 543     GGCAGTGTGCTGGTTCCAACAGAGGTATTCACTCTGCTTGGTCAGTCTTTGCCGACAGT 602
              |||||
Sbjct: 1108    GGCAGTGTGCTGGTTCCAACAGAGGTATTCACTCTGCTTGGTCAGTCTTTGCCGACAGT 1049

Query: 603     GCTTCTGCGACAC 615
              |||||
Sbjct: 1048    GCTTCTGCGACAC 1036

```

Figura 14: BLASTN do sequenciamento do produto de PCR obtido pelos primers IR3-F e IR3-R (query) contra o banco de dados Official Gene Set (zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab)(subject). A identidade da sequência foi de 98% entre o fragmento sequenciado e o predito GB18331. Em verde o primer IR3-F e em Azul a sequência parcial do primer IR3-R.

```

Query: 1      CGTTGGTCATCATCGAGTTG ATGGTGAACGGGGAC-TGAAGAGGTATCTGAGGAGCACAC 59
              |||
Sbjct: 3722   CGTTGGTCATCATCGAGTTGATGGTGAACGGGGACCTGAGAGGTATCTGAGGAGC-CAC 3780

Query: 60     AGGCCGTGCGAGAACATGTGGAAGCGCGCCCCCGAANTGGACAGGATTCTGCAGATGGCG 119
              |||
Sbjct: 3781   AGGCCGTGCGAGAACATGTGGAAGCGCGCCCCCGAANTGGACAGGATTCTGCAGATGGCG 3840

Query: 120    ATCGAGATCGCGGACGGGATGGCGTACCTGTCCACGAAGAAGTTGGTGCACAGGGACTTG 179
              |||
Sbjct: 3841   ATCGAGATCGCGGACGGGATGGCGTACCTGTCCACGAAGAAGTTGGTGCACAGGGACTTG 3900

Query: 180    GCGGCCCCGCAATTGCATGTGTGGCCGAGGATTGNTTGTGAAGGTGGGGGACTTTGGGATG 239
              |||
Sbjct: 3901   GCGGCCCCGTAATTGCATGTGTGGCCGAGGATTGACGGTGAAGGTGGGGGACTTTGGGATG 3960

Query: 240    ACCAGGGACATCTACGAGAGGGATTATTACAGGAAGGGGAGCAGGGGTCTGTTGCCCGTT 299
              |||
Sbjct: 3961   ACCAGGGACATCTACGAGAGGGATTATTACAGGAAGGGGAGCAGGGGTCTGTTGCCCGTC 4020

Query: 300    AGGTGGATGGGCGCCAGAGGTCTGAAGGACGGGGTGTTCAGCAGCTATTCCGACGTGTGG 359
              |||
Sbjct: 4021   AGGTGGATGGGCGCCAGAGGTCTGAAGGACGGGGTGTTCAGCAGCTATTCCGACGTGTGG 4080

Query: 360    AGCTACGGCGTCTGTTATGTGGGAAATGGTCACTTCCGCTCCAGCCTTATCAAGGTTTA 419
              |||
Sbjct: 4081   AGCTACGGCGTCTGTTATGTGGGAAATGGTCACTTCCGCTCCAGCCTTATCAAGGTTTA 4140

Query: 420    TCGAACGAGCAGGTGCTGAGATAAGTGTATCGAGGGAGGTGTGATGGGAACGGCCGGGAGA 479
              |||
Sbjct: 4141   TCGAACGAGCAGGTGCTGAGATAAGTGTATCGAGGGAGGTGTGATGG-AACGGCC-GGAGA 4198

Query: 480    ACTGTCCCGAGTTGCTGTACGAAGCTGTGAA 511
              |||
Sbjct: 4199   ACTGTCCCGAGTTGCTGTACG-AGCTGTGAA 4229

```

Figura 15: BLASTN do sequenciamento do produto de PCR obtido pelos primers IR2-F e IR2-R (query) contra o banco de dados Official Gene Set (zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab)(subject). A identidade da sequência foi de 98% entre o fragmento sequenciado e o predito GB18331. O primer IR2-F aparece em verde e o primer IR2-R não foi sequenciado.

4.1.2.3 Gene codificador do substrato do receptor de insulina (Chico)

A anotação na plataforma Artemis (versão 7.0) evidenciou que o suposto gene codificador para o substrato do receptor de insulina em *Apis mellifera* (Chico) possui 3681 nucleotídeos distribuídos em 10 exons (Figura 16A). A análise por RPSBLAST demonstrou a existência de dois domínios conservados: o domínio PH_IRS e o domínio IRS-PTB (Figura 16B). O domínio PH-IRS é encontrado apenas

em eucariotos, e está freqüentemente envolvido em endereçar proteínas para a membrana plasmática em resposta ao estímulo por insulina. Após o domínio PH-IRS é encontrado o domínio IRS-PTB em moléculas do substrato de receptor de insulina e liga-se à fosfotirosinas que estão em motivos NPXpY no receptor de insulina/IGFs. Foram desenhados primers específicos para esse gene (Chico-F e Chico-R), os quais amplificam um trecho de aproximadamente 650pb localizado em uma região onde não há nenhum domínio conservado (Figuras 16A e 16B). O fragmento obtido com o par de primers Chico-F e Chico-R foi clonado e seqüenciado para validação experimental do gene candidato (Figura 16C).

A seqüência do fragmento obtido foi submetida à análise BLASTN contra o banco de dados Official_Gene_Set . A similaridade entre o fragmento originado pelo par de primers Chico-F e Chico-R foi de 87% com relação ao predito GB18331 (Figura 17).

Figura 16: Gene do substrato do receptor de insulina (AmChico) de *Apis mellifera*, ortólogo ao gene codificador do substrato do receptor de insulina de *Drosophila* (dChico) (A) O gene predito (GB11037) foi mapeado sobre o genoma (Amel versão 4.0) na plataforma Artemis (versão 7.0). Primers para validação da expressão por RT-PCR foram desenhados para fragmento na região 3' cobrindo parte dos exons 9 e 10 (B) RPS-blast para detecção de domínios conservados. (C) Sequenciamento do fragmento de PCR de aproximadamente 620 pb amplificado pelos primers Chico-F(marcado em azul). O Chico-R não foi seqüenciado.

```

Query: 1      CATTCATGTATCGTCTCTGCTTCCATACNTNAAACCAAGNAATTACGTACTATTGAAGCC 60
             |||||
Sbjct: 2532   CATTCATGTATCGTCTCTGCTTCCATACATAAACC-CGTAATTAC-TAC-ATTGAAGCC 2588

Query: 61      CGGTGGAANAAGCGAGCAAGGACCATACATGACAATGGATGGNATAATGGAGGTTTGGTC 120
             |||||
Sbjct: 2589   -GGTGGAGGAGC-AG-AAGGACCATACATGAGAATGGATGGCTATAATGGAGGATTGGTC 2645

Query: 121     NCAATCCGGTGGTANCCCTAAGNTAATTTTCATCGCCCTATGCAAGAGAAGNGTGCATTC 180
             |||||
Sbjct: 2646   ACAATCCGGTAGTAGCCCTAAGTTAATTTTCATCGCCCTATGCAAGAGAAGTGTGCATTC 2705

Query: 181     GCAATGGNCCGCCAGGCAGCCACGAGAACAGCANCGGTGGATCTTCCACGGGGGNCNACCT 240
             | ||||
Sbjct: 2706   G-AATGGACCGCCAGG-AGCCACGAGAACAGCACCGGTCGATCTTCCACGGCGTCCACCT 2763

Query: 241     GCGGACTATGTTGATATNAATTTCAAGCCGAGAACAACTTTAGAACAGATTGGGTAAGA 300
             |||||
Sbjct: 2764   GCGGACTATGTTGATATGAATTTCAAGCCGAGAACAACTTTAGAACAGATTACATAA-A 2822

Query: 301     TATGAACATGAGCAAGTCGAGACATCGTAAACCAATGGCAACGGCTAAACGGGTAGTCGT 360
             |||||
Sbjct: 2823   TATGAACATGAGCAA-TGGAACATCGTAAACCAATGGCAACGGC-AAACGGGTAGTCGT 2880

Query: 361     AAGAGAGAGTCACGCTTCGCANCCAAGNTGGGATCCAGCGGNAANCTGCANCTATAAAA 420
             |||||
Sbjct: 2881   AAGAGAGAGTCACG-TTGCAGCCAA-TTGGATCCAGCGGGAAC-AAACCTATAAAA 2937

Query: 421     ACGCCNAGTTTCTTACCTTTAAGCGGAAGTCCGGATCGGAAAGTTNAGGAGCACNCCC 480
             |||||
Sbjct: 2938   ACGCCTAGTTTCTTACCTTTAAGCGGAAGTCCGGATCGGAAAGTTTAGCGAGTACACCC 2997

Query: 481     GNNTCGCTTCCCNAAAGAAATCCNANNGGTTCTCTGGGCACTATTTTCCCTTTCTCCTTG 540
             | |||
Sbjct: 2998   GCATCTCTCTCCCCGAGCAACTCCGACAGGTTCTCTGGGCACTATTTTCCCTTTCTCCTTG 3057

Query: 541     AACAGTCTNTCAATCGCCCGGAAAAATCTTTNAGGCATCNAANNAATACCGNTGANTGANN 600
             |||||
Sbjct: 3058   AACAGTCTCTCAATCGCCCGGAGAAATCATTTNAGGCATCAAAAGATACCGATGAATGAAA 3117

Query: 601     CCTTCAAAACCTGAATATGAACCTTAA 626
             |||||
Sbjct: 3118   CCTTCAGAACTGAATATGAACCTTAA 3143

CATTCATGTATCGTCTCTGCTTCCATACNTNAAACCAAGNAATTACGTACTATTGAAGCC

```

Figura 17: BLASTN do sequenciamento do produto de PCR obtido pelos primers Chico-F e Chico-R (query) contra o banco de dados Official Gene Set (zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab)(subject). A identidade da sequência foi de 87% entre o fragmento sequenciado e o predito GB11037.

4.1.2.4 Gene codificador da quinase ribossomal S6K

A anotação na plataforma Artemis (versão 7.0) evidenciou que o suposto gene codificador para a proteína da quinase ribossomal S6K de *Apis mellifera* possui 1400 nucleotídeos e 12 exons (Figura 18A). A análise de domínios conservados por RPSBLAST demonstrou que a proteína predita de *Apis mellifera* possui o domínio S_TKc, que é o domínio catalítico de proteína serina/treonina quinase e o domínio S_Tk_X, que é uma extensão do domínio S_Tk (Figura 18B). Foram desenhados primers específicos, S6k-F e S6K-R, para validação por RT-PCR de sua transcrição. O fragmento amplificado por esse par de primers foi clonado e seqüenciado (Figura 18-C). A similaridade entre o fragmento seqüenciado e o gene predito (GB11037) foi verificada via BLASTN contra o genoma de *Apis mellifera* e a similaridade obtida foi de 92% (Figura 19).

Figura 18: Gene da proteína quinase ribossomal S6K de *Apis mellifera*, (A) O gene predito (GB19390) foi mapeado sobre o genoma (Amel versão 4.0) na plataforma Artemis (versão 7.0). Primers para validação da expressão por RT-PCR foram desenhados, cobrindo parte dos exons 3 e 5 e por completo o exon 4. B) RPS-blast para detecção de domínios conservados. (C) Sequenciamento do fragmento de PCR de aproximadamente 180pb amplificado pelos primers S6K-F e S6K-R (marcados em verde).

Figura 19: BLASTN do sequenciamento do produto de PCR obtido pelos primers S6K-F e S6K-R (query) contra o banco de dados Official Gene Set (zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab) (subject). A identidade da sequência foi de 92% entre o fragmento sequenciado e o predito GB19390.

4.1.2.5 Gene codificador do supressor de tumor *TSC1*

O gene *TSC1* codifica uma proteína envolvida na via de sinalização da insulina e na via de sinalização TOR (Bateman & Neill 2004) modulando negativamente o controle dessas vias e, portanto sendo um importante componente da via IIS/TOR. Nesse trabalho nós o identificamos (Item 4.1) no genoma de *Apis mellifera*, o anotamos na plataforma Artemis (Versão 7.0) (Figura 20A) e, com a ferramenta computacional RPSBLAST, verificamos os domínios conservados contidos na proteína predita (GB12676) (Figura 20B). A anotação e análise por RPSBLAST evidenciaram que o transcrito do gene *TSC1* possui 14 éxons (Figura 20A) e é traduzido em uma proteína com o domínio Harmantina e o domínio ABC_SHC4_euk (Figura20B). Embora não tenha sido seqüenciado, a presença de seu transcrito foi validada através de RT-PCR com a utilização de primers específicos para esse gene em *Apis mellifera*, Tsc1-F e Tsc1-R (Item 4.1.1 Figura 9).

Figura 20: Gene da proteína supressora de tumor *TSC1* de *Apis mellifera*, (A) O gene predito (GB12676) foi mapeado sobre o genoma (Amel versão 4.0) na plataforma Artemis (versão 7.0). Primers para validação da expressão por RT-PCR foram desenhados, cobrindo parte dos éxons 7 e 10 e por completo os éxon 8 e 9. B) RPS-blast.para detecção de domínios conservados.

4.1.2.6 Gene codificador de uma proteína alvo de rapamicina (TOR)

Para o gene TOR de *Drosophila melanogaster* (GenBank accession number NM_080152) foi verificado em *Apis mellifera* a existência de seis preditos que são possíveis genes pertencente a família TOR (Item 4.1-Tabela 3). Dos seis preditos, escolhemos um para análise devido a maior similaridade com seu ortólogo em *D.melanogaster* (Item 4.1-Tabela3). O suposto gene para TOR em *Apis* (GB11213) teve sua sequência anotada e analisada por ferramenta BLAST. A anotação do predito na plataforma Artemis (Versão 7.0) e a verificação dos domínios conservados por RPSBLAST evidenciaram que o transcrito para o alvo de rapamicina de *Apis mellifera* com o número de acesso, ao banco de dados Official_Gene_Set, GB11213 apresenta seis éxons (Figura 21A). A proteína traduzida possui três domínios conservados característicos das proteínas alvos de

rapamicina (Figura 21B): um domínio PI3K relacionado (PI3Kc) e dois domínios adicionais FAT, um em posição C-terminal e o outro N-terminal em relação ao domínio PI3K (Figura 21). Embora o transcrito não tenha sido seqüenciado para o suposto alvo de rapamicina (GB11213), sua transcrição foi validada por RT-PCR com primers específicos desenhados para esse gene (TOR-F e TOR-R) (Item 4.1.1-Figura 9).

Figura 21: Gene codificador da proteína alvo de rapamicina (TOR) de *Apis mellifera*. O gene predito (GB11213) foi mapeado sobre o genoma (Amel versão 4.0) na plataforma Artemis (versão 7.0). Primers para validação da expressão por RT-PCR foram desenhados, cobrindo parte do éxon 4. B) RPS-blast para detecção de domínios conservados.

4.2 Perfil de transcrição dos genes envolvidos na via IIS em *Apis mellifera*

Entre os genes envolvidos na via IIS, apenas os genes codificadores para os receptores de insulina tiveram seus níveis de transcrição verificados, uma vez que eles são os responsáveis pela transdução do sinal do ambiente externo da célula, hemolinfa, para o ambiente interno da célula.

O gene para o receptor de insulina *InR-2* (GB18331) é estudado em *Apis mellifera*, e por isso foi o único a ter seu perfil de transcrição pré-traçado por RT-PCR semiquantitativa ao longo da fase de desenvolvimento pré-embrionário e posteriormente refinado por qRT-PCR. Já o gene *InR1* (GB15492), o qual teve sua transcrição validada primeiramente por nós, teve seu perfil ao longo dos estágios de desenvolvimento larval estabelecido diretamente por RT-PCR quantitativa.

Verificamos também os níveis de transcrição dos receptores de insulina de *Apis mellifera* nos ovários de operárias e rainhas, em amostras de operárias tratadas com HJ e em amostras de operárias adultas mantidas sob diferentes tipos de alimentação.

4.2.1 *RT-PCR semiquantitativa do gene codificador de *InR2* (GB18331)*

Para verificar a presença do transcrito *InR2* em todos os estágios do desenvolvimento pós embrionário de operárias e rainhas de *Apis mellifera* foi feita uma RT-PCR semiquantitativa com os primers específicos IR2-F e IR2-R.

Tanto em rainhas quanto em operárias os transcritos para o gene *InR2* foram detectados em todos os estágios do desenvolvimento pós-embrionário (Figuras 22A e 22B).

Figura22: Gel de agarose 1,2% das amostras de RT-PCR de operárias (A) e rainhas (B) obtidas com os primers específicos para o gene *InR2* (IR2-F e IR2-R) em 35 ciclos. O fragmento amplificado, *InR2*, corresponde ao transcrito do gene *InR-2* e possui aproximadamente 625pb. As amostras foram normalizadas para actina.

4.2.2 RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) dos genes *InR1* (GB15492) e *InR2* (GB18331).

A análise por RT-PCR quantitativa foi utilizada para verificar e quantificar os níveis de transcrição dos receptores de insulina de *Apis mellifera* em larvas de operárias e rainhas, nos ovários de operárias e rainhas, em amostras de operárias tratadas com HJ e em amostras de operárias adultas mantidas sob diferentes tipos de alimentação.

Os primers utilizados nas reações de qRT-PCR (Real time) tiveram suas eficiências verificadas de acordo com a metodologia de Pfaffl (2001). O par de primers *InR-1* apresentou os valores do coeficiente de regressão (R) de 0,998, de slope de -3,317 e E=2,0. Para o par de primers *InR2* apresentou os valores do coeficiente de regressão (R) de 0,998, de slope de -3,244 e E=2,0.

4.2.2.1 Transcrição dos genes codificadores dos receptores de insulina *InR1* e *InR2* em larvas de rainhas e operárias

As análises por RT-PCR quantitativa, realizadas com cDNA de larvas de operárias e rainhas de *Apis mellifera*, iniciaram com o período no qual ocorre a troca de alimentação (L3 para L4). Para as comparações entre os níveis de transcrição dos genes codificadores para *InR1* e *InR2* em ambas as castas, de operárias e rainhas, todos os valores ΔCT obtidos foram calibrados pelo valor ΔCT do gene *InR-1* da fase L3. Neste período de troca de alimento, notamos diferenças consideráveis entre as castas nos níveis de transcrição do receptor *InR-1* (GB15492), mas, níveis similares para *InR-2* (GB18331) (Figuras 23 e 24). Em rainhas na fase L3, o nível de transcrição do gene *InR1* era cerca de cinco a dez vezes maiores do que nos estágios que o sucedem (Figura 23), enquanto o nível de transcrição de *InR-2* (GB18331) inicia-se em um nível bem mais baixo que *InR-1* e, com o fim da fase de alimentação (L5F3 para L5S1), cai para níveis basais (Figura 23). Em operárias, os níveis de ambos os genes, *InR-1* e *InR-2* ficaram em nível basal em L3, seguido de um aumento quase paralelo para os dois genes até L5F1 (Figura 24). Diferentemente das rainhas, em operárias, ambos os genes permanecem com níveis de transcrições elevados, mesmo após o término da fase de alimentação (Figura 24).

Figura 23: Perfil de transcrição dos genes codificadores dos receptores de insulina (InR-1 e InR-2) em rainhas de *Apis mellifera* durante o período de desenvolvimento onde ocorre a troca de alimentação entre operárias e rainhas (3º instar) até o início da fase de tecelagem do casulo (L5F1). Os valores da expressão relativa foram calculados utilizando a metodologia Pfaffl (2001) e as amostras foram calibradas para *InR1* de rainha na fase L3. (ratio = 1).

Figura 24: Perfil de transcrição dos genes codificadores dos receptores de insulina (*InR1* e *InR2*) em operárias de *Apis mellifera* durante o período de desenvolvimento onde ocorre a troca de alimentação entre operárias e rainhas (3º instar) até o início da fase de tecelagem do casulo (L5F1). Os valores da expressão relativa foram calculados utilizando a metodologia Pfaffl (2001) e as amostras foram calibradas para *InR1* de Rainha na fase L3. (ratio = 1) afim de compará-las em uma mesma escala.

4.2.2.2 Transcrição dos genes codificadores dos receptores de insulina *InR1* e *InR2* nos ovários de rainhas e operárias

Os perfis transcricionais para estes genes foram obtidos através do RNA extraído do corpo total das larvas e posteriormente foram realizadas análises tecido-específicas da sua transcrição. Escolhemos para tais anos ovários, já que estes apresentam as maiores diferenças entre as castas.

Os perfis de transcrição dos genes *InR1* e *InR2* obtidos por qRT-PCR nos ovários de operária e rainhas nas fases larvais L4, L5F3; L5S1, L5S3 e PP1 (figuras 25 e 26) demonstram diferenças tanto no perfil temporal quanto nos níveis de transcrição. Em ambas as castas, a maior modulação nos níveis de transcrição foi observado para o receptor *InR2*. No ovário das rainhas notou-se um aumento agudo porém transiente na fase L5F3, que antecede imediatamente o início da fase de operculação, e um segundo aumento, em menor nível, na fase final da tecelagem do casulo (L5S3). Em seguida, no início da fase prépupal (PP1), observou-se um aumento na transcrição do gene *InR1* que, até este ponto, mostrou pouca modulação. Em ovários de operárias, a modulação mais marcante foi notada entre o quarto e quinto instar larval onde houve uma diminuição drástica nos níveis de transcrição de *InR2*. É importante ressaltar que para realizar estas comparações entre as castas, fases de desenvolvimento e os dois receptores, todos os valores ΔCT obtidos foram calibrados pelo valor ΔCT do gene *InR-2* da fase L4.

Figura 25: Perfil de transcrição dos genes codificadores dos receptores de insulina (InR-1 e InR-2) em ovário de rainhas de *Apis mellifera*. Foram selecionadas fases nas quais os ovários se encontram em diferentes estágios do desenvolvimento. Os valores da expressão relativa foram calculados utilizando a metodologia Pfaffl (2001) e as amostras foram calibradas para *InR2*, no estágio L4 de operária, afim de manter os dados em uma mesma escala.

Figura 26: Perfil de transcrição dos genes codificadores dos receptores de insulina (InR-1 e InR-2) em ovário de operárias de *Apis mellifera*. Foram selecionadas fases nas quais os ovários se encontram em diferentes estágios do desenvolvimento. Os valores da expressão relativa foram calculados utilizando a metodologia Pfaffl (2001) e as amostras foram calibradas para *InR2* de operária L4 (ratio = 1).

4.2.2.3 Efeito de tratamento com pyriproxifen sobre a transcrição dos genes *InR1* e *InR2* em larvas de operárias

Para investigar a possível interação entre a via de sinalização IIS e o hormônio juvenil tratamos as larvas de operárias no quarto instar larval com pyriproxifen, um análogo de HJ. Como controles, utilizamos amostras tratadas com o respectivo solvente (hexano) e sem tratamento algum. As larvas foram coletadas 6 e 24 horas após tratamento para extração de RNA e síntese de cDNA. A transcrição de *InR1* e *InR2* foi analisada por qRT-PCR.

No grupo com 6 horas após tratamento houve um aumento na transcrição de ambos os genes nas amostras tratadas com HJ, assim como nas amostras tratadas com o hexano. No entanto, quando os níveis de transcrição foram analisados nas amostras coletadas 24 horas após o tratamento, observamos que o efeito de tratamento com solvente tinha desaparecido e que somente as larvas tratadas com pyriproxifen mostraram níveis elevados de transcrição para os genes *InR1* e *InR2* com relação aos grupos controles (Figuras 27 e 28). Neste experimento utilizamos como calibradores os valores do ΔCT de cada gene (*InR1* e *InR2*) de larvas não tratadas e coletadas 2 horas após o tratamento com HJ.

Este resultado mostra um claro efeito de HJ sobre a transcrição dos dois genes, no entanto o resultado surpreende quando nos comparamos os valores obtidos neste experimento com os níveis de expressão dos dois receptores em rainhas, pois nesta fase de desenvolvimento (L4 para L5F1) as rainhas possuem títulos endógenos de HJ mais altos que operárias e de maneira contrastante elas apresentam níveis mais baixos na transcrição de *InR-1* e *InR-2*.

Figura 27: Transcrição de *InR1* em amostras de larvas de operárias com três dias, após eclosão, tratadas com o análogo do HJ, pyriproxifen (PPN). As amostras foram analisadas 6 horas e 24horas após o tratamento, sendo que os níveis observados em 6 horas pós-tratamento foram considerados efeitos da manipulação. As amostras foram calibradas com ΔCT para o *InR1* de larvas com 2horas sem tratamento (não ilustrado)

Figura 28: Transcrição de *InR-2* em amostras de larvas de operárias com três dias, após eclosão, tratadas com o análogo do HJ, pyriproxifen (PPN). As amostras foram analisadas 6 horas e 24horas após o tratamento, sendo que os níveis observados em 6 horas pós-tratamento foram considerados efeitos da manipulação. As amostras foram calibradas com ΔCT para o *InR2* de larvas com 2horas sem tratamento (não ilustrado)

4.2.2.4 Efeito da dieta sobre a transcrição dos genes *InR1* e *InR2* em operárias adultas

Abelhas operárias recém emergidas foram mantidas sob diferentes regimes de alimentação e foram coletadas em seguida para análises por qRT-PCR dos perfis de transcrição de *InR1* e *InR2* no quarto, sexto, oitavo e décimo primeiro dia do tratamento (Figura 29 e 30). Como calibrador de todas as amostras de operárias

(Figuras 29 e 30) foi utilizado o valor ΔCT do gene *InR1* de amostras de um dia mantidas na colméia (estágio não representado nos gráficos).

Analisando o perfil de transcrição do gene *InR1* (Figura 29) notamos que no quarto dia de tratamento os níveis de transcrição foram semelhantes nas abelhas alimentadas com mel e geléia real, enquanto que nas abelhas mantidas na colméia o nível era um pouco mais elevado. No sexto dia de tratamento houve um aumento no nível de transcrição do gene *InR1* para todos os tratamentos, sendo que as abelhas alimentadas com mel e as mantidas na colméia possuíam níveis de transcrição maiores e similares. No oitavo dia houve uma queda nos níveis de transcrição do gene *InR1*, especialmente, nas abelhas alimentadas exclusivamente com geléia real ou mel. No décimo primeiro dia notamos um aumento considerável na transcrição do gene *InR1* nas abelhas que receberam somente mel como alimento. Analisando o perfil de transcrição do gene codificador para InR-2 (Figura 30) verificamos uma similaridade geral entre a modulação da transcrição do transcrito InR-2 com a do transcrito InR-1 (Figura 29), a única diferença entre os dois receptores se manifestando no quarto dia do tratamento.

Figura 29: Transcrição de InR-1 em amostras de operárias adultas mantidas em diferentes regimes de alimentação. Como calibrador utilizamos o valor ΔCT do gene *InR1* de amostras de um dia mantidas na colméia (estágio não representado nos gráficos).

Figura 30: Transcrição de *InR-2* em amostras de operárias adultas mantidas em diferentes regimes de alimentação. Como calibrador utilizamos o valor ΔCT do gene *InR1* de amostras de um dia mantidas na colméia (estágio não representado nos gráficos).

Para verificar a influência de uma alimentação rica em proteína sobre a transcrição dos genes codificadores do receptor de insulina, abelhas operárias foram mantidas sob uma alimentação especialmente rica em proteína (*bee bread*). Os perfis de transcrições dos dois receptores *InR1* e *InR2* demonstraram resultados divergentes, sendo que o gene *InR1* teve um aumento na sua transcrição em relação ao controle (abelhas mantidas na colméia) no quarto e no oitavo dia (Figura 31), enquanto que o gene *InR2* teve uma leve diminuição na sua transcrição no quarto dia e se igualou no oitavo dia à transcrição observada nas abelhas mantidas na colméia (Figura 32), o que indica que a quantidade protéica no alimento representa um estímulo mais forte para a transcrição do gene *InR1* do que para o gene *InR2*. Como calibrador foi utilizado o ΔCT de amostras da colméia de 1dia (não representado no gráfico).

Figura 31: Transcrição de *InR1* em operárias mantidas na colméia e operárias mantida sob alimentação com bee bread (rico em proteínas). Como calibrador foi utilizado o Δ CT de amostras da colméia de 1 dia (não representado no gráfico).

Figura 32: Transcrição de *InR2* em operárias mantidas na colméia e operárias mantidas sob alimentação com bee bread (rico em proteínas). Como calibrador foi utilizado o Δ CT de amostras da colméia de 1 dia (não representado no gráfico).

Os padrões transcricionais dos genes *InR1* e *InR2* demonstraram que ambos os genes são modulados de maneira semelhante ao longo da vida adulta das operárias, diferindo apenas, no décimo terceiro dia e no décimo quinto dia. Quanto ao nível de *InR2*, este ultrapassou o nível de *InR1*, enquanto que durante todos os outros períodos o nível de transcrição do *InR1* foi levemente maior ou igual ao do *InR2* (Figura 33).

Figura 33: Transcrição de *InR1* e *InR2* em amostras de operárias adultas. As amostras foram calibradas para o Δ CT de *InR1* das amostras de um dia.

4.3 3'RACE do gene *InR2* (GB18331)

Durante a anotação dos genes da via IIS realizada pelo consórcio do sequenciamento do genoma da abelha (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) surgiram dúvidas quanto a predição da região 3' do gene *InR-2*. Esta predição resultou em uma cauda 3' de extensão similar a de *Drosophila melanogaster* (Ruan et al., 1995) que foi considerada excepcionalmente longa quando comparado aos ortólogos em outros organismos. Para verificar a predição desta região empregamos um protocolo 3'RACE utilizando como âncora um primer interno da região tirosina quinase (IR2-F) e um primer oligo(dT).

Após otimização das condições do protocolo RT-PCR conseguimos amplificar um produto com cerca de 3500pb, o que corresponderia ao tamanho predito para este fragmento do gene *InR2* (GB18331) (Figura 34A). Esse fragmento foi clonado em vetor pGEM T-Easy e a inserção dele foi verificada por digestão com EcoRI (Figura 34B). Embora ainda não tenha sido possível sequenciar o fragmento de aproximadamente 3500pb contendo a região 3' do gene *InR2*, o tamanho do

fragmento, por si só, é um forte indicador de que a predição, provavelmente, esteja correta.

Figura 34: 3'-RACE para confirmação da região 3' do gene InR2. A) Resultado de amplificação de fragmento de aproximadamente 3500 pb; B) Digestão com EcoRI mostrando inserção deste fragmento (InRxdT) em plasmídeo pGEM T-Easy.

5 Discussão

A diferenciação das castas em abelhas é um clássico caso de determinação nutricional de fenótipos alternativos: rainhas e operárias. Baseado na informação que a sinalização através da via IIS é importante na integração da nutrição e do metabolismo em uma grande variedade de organismos (Nijout 2003), nós identificamos, anotamos, validamos e sequenciamos parcialmente alguns dos genes envolvidos na via IIS da abelha melífera. Dentre os genes estudados nesse trabalho, estão os genes codificadores para os receptores de insulina *InR1* e *InR2*, para *Chico*, codificador do substrato do receptor de insulina, para a quinase da proteína ribossomal, S6K, para *TOR* e para a proteína Tuberous sclerosis–1 (*Tsc1*).

Os genes para os receptores de insulina *InR1* e *InR2* foram investigados de forma mais aprofundada, pois, além de serem anotados e parcialmente seqüenciados, tiveram seus perfis de transcrições verificados, no intuito de determinar se eles são diferencialmente regulados durante o desenvolvimento de operárias e rainhas. A investigação desse trabalho foi focada nos terceiro, quarto e quinto estágios larvais, período no qual diferenças nutricionais e hormonais podem afetar o desenvolvimento de castas.

Além do mais, também foi verificada a transcrição dos genes para os receptores de insulina em amostras de operárias tratadas com o análogo do hormônio juvenil, em ovários de operárias e rainhas (análise tecido-específica) e em operárias adultas mantidas sob regimes alimentares diferentes. Uma análise mais aprofundada demonstrou que o *InR2* possui uma região 3' estendida, a qual foi verificada por 3'RACE.

5.1 Os receptores de insulina de *Apis mellifera*

A via de sinalização por insulina (IIS) é uma das principais vias que integra o desenvolvimento geral de animais com as suas condições nutricionais. Com o sequenciamento completo do genoma de *Apis mellifera* foi possível anotar genes integrantes desta via, e notou-se que a abelha melífera possui no seu genoma dois genes codificadores de receptores de insulina, *InR1* (GB15492) e *InR2* (GB18331).

Os receptores para insulina e IGF são receptores tirosina-quinase. Eles são homodímeros de uma proteína com subunidades α (extracelular que se liga ao ligante insulínico) e β (intracelular com atividade tirosina-quinase), que são clivadas e unidas por pontes dissulfídicas. Em *Drosophila* há a ocorrência de apenas um único receptor de insulina no genoma, o qual se liga tanto à insulina quanto aos IGFs (Figura 35). Em *Apis mellifera* verificamos a ocorrência de dois genes codificadores para receptor de insulina, *InR1* (GB15492) e *InR2* (GB18331), o que nos leva a supor possíveis diferenças em suas funções, tal como ocorre em mamíferos onde também há dois receptores para a via insulina/IGF (Figura 35). Experimentos com ratos mutantes verificaram uma dicotomia na função fisiológica para o receptor de insulina e para o receptor de IGF, onde um deles está mais relacionado com a função metabólica e o outro com a função de crescimento e proliferação celular. (Kim & Accili 2002) (Figura 35).

Figura 35: Esquema do receptor de insulina/IGF: A) *Drosophila melanogaster*, onde um único receptor desempenha as funções relacionadas ao metabolismo e ao crescimento e proliferação celular. B) Mamíferos onde há dois receptores que desempenham funções distintas (Kim & Accili 2002). C) *A. mellifera* que apresenta dois receptores de insulina, mas suas funções ainda não estão determinadas. MP= membrana plasmática.

5.1.1 Expressão dos receptores de insulina na fase larval

As análises por RT-PCR quantitativa da transcrição dos genes *InR1* e *InR2* nas amostras de corpo inteiro, de larvas de rainhas e operárias, durante o período crítico da troca de alimentação para as duas castas, nos mostrou um interessante e complexo padrão de transcrição para ambos os genes (ver Figuras 23 e 24).

Em larvas de rainhas, onde não ocorre a troca de alimentação, isto é, as mesmas continuam recebendo GR, há uma nítida diferença entre os níveis de transcrição dos genes *InR1* e *InR2* no terceiro estágio larval, onde a transcrição do gene *InR1* foi cerca de dez vezes maior que a transcrição do *InR2*. Já na fase L4 de rainhas ocorreu um decréscimo na transcrição do gene *InR1*, que seguiu em níveis semelhantes ao do transcrito *InR2*, mas com um padrão de transcrição oposto, onde o pico de um correspondia ao vale do outro (Figura 23). Esse padrão de transcrição sugere a existência de um evento entre L3 e L4 que seja independente da troca de alimentação, uma vez que a mesma não ocorre em rainhas, ou que haja alguma mudança na composição da GR que possa explicar o perfil da transcrição de ambos os genes. Haydak (1970) afirma que larvas de rainha acima de três dias recebem uma geléia real (GR) com maior conteúdo da secreção branca das glândulas hipofaríngeas, enquanto as larvas com quatro ou mais dias recebem uma GR que contém maior porcentagem da secreção clara. O composto claro possui 110,5 mg/g de proteína enquanto que o composto branco possui 140,5 mg/g de proteína (Haydak 1970). O fato do gene *InR1* ser mais transcrito que *InR2* durante o estágio L3 de rainha, pode estar relacionado a essa maior concentração de proteína verificada no conteúdo da GR, corroborando com a observação em operárias adultas tratadas com *bee bread*, uma alimentação rica em proteína, onde observamos um aumento da transcrição apenas do gene *InR1* nas abelhas alimentadas com *bee bread* (ver Figuras 31 e 32). Essas observações evidenciam uma maior susceptibilidade na regulação da transcrição do gene *InR1* ao conteúdo de proteínas na alimentação. Quanto aos perfis de transcrição de *InR1* e *InR2*, em rainhas, apresentarem comportamentos opostos durante as fases subseqüentes a L3 até o início da fase de tecelagem do casulo (L5S1), quando os níveis se igualaram (Figura

23), leva-nos a crer que os dois genes são regulados de maneiras diferentes, e provavelmente correlacionados, pois o pico do perfil de transcrição de um gene corresponde ao vale do outro. O fato de *Drosophila melanogaster*, o modelo mais bem estudado para a via IIS em insetos, possuir apenas um receptor de insulina, e não dois como a abelha melífera, não ajuda a preencher algumas lacunas sobre essa regulação, pois faltam ainda informações sobre a maneira de ocorrência dessa regulação.

Em larvas de operárias, a troca de alimentação ocorre a partir do terceiro dia, na transição das fases larvais L3 para L4. A partir daí, elas deixam de receber GR e passam a receber geléia de operária (GO), uma mistura de secreções glandulares suplementadas com pólen e néctar. Verificamos que ocorre um aumento nos níveis dos transcritos de ambas as formas de receptor de insulina (ver Figura 24). Esse aumento pode dever-se a algum composto na GO que estimule a transcrição de ambos os genes.

Enquanto nos resultados apresentamos os perfis de transcrição dos dois receptores, separados para rainhas e operárias, olhamos estes perfis agora sob outro ângulo, o das diferenças relacionadas às castas, e comparamos os níveis de transcrição do gene *InR1* nas amostras de corpo inteiro de operárias e rainhas (Figura 36). Observamos que a partir do momento onde ocorreu a troca de alimentação entre rainhas e operárias, houve uma inversão nos perfis de transcrição. O perfil do transcrito *InR1*, que em L3 possuía um nível de transcrição maior em rainhas do que em operárias, passou a ser maior em operárias a partir de L4 até a última fase analisada (L5S1). Em operárias, os níveis de transcrição do gene *InR1* aumentam até o término da fase de alimentação, decaindo na fase de tecelagem do casulo (fase que encerra o período de alimentação em operárias). Tal resultado

pode dever-se a algum fator da GO que induziu a transcrição do gene *InR1* e que não está presente na GR, dessa maneira, quando cessou a alimentação da operária, também interrompeu a estimulação pelo suposto fator presente na GO.

Figura 36: Perfis de transcrição do gene *InR1* (GB15492), obtidos por RT-PCR quantitativa, em larvas de operárias e rainhas durante o período de desenvolvimento onde ocorre a troca de alimentação entre operárias e rainhas (3º instar) até o início da fase de tecelagem do casulo (L5S1). Como calibrador foi utilizado o Δ CT de rainhas L3.

Analisando a transcrição do gene *InR2* em amostras de corpo inteiro de larvas de operárias e rainhas, em uma mesma escala (Figura 37), observamos que os níveis de transcrição são baixos e similares durante o terceiro instar larval, corroborando com os dados de Wheeler e colaboradores (2006). No entanto, após o terceiro instar larval, inicia-se uma dicotomia entre os dois perfis. O nível dos transcritos *InR2* em operárias aumenta, principalmente a partir de L4, enquanto os níveis de transcrição do gene *InR2* em rainhas mantêm-se baixos, atingindo seus menores níveis em L5F3 e L5S1, quando ocorre o término da fase de alimentação e início da fase de tecelagem do casulo. Essa dicotomia observada, provavelmente deve-se à troca do alimento de operária, e reforça a nossa hipótese da presença de algum fator na geléia de operária que induz a transcrição do receptor de insulina.

Figura 37: Perfis de transcrição do gene *InR2* (GB18331), obtidos por RT-PCR quantitativa, em larvas de operárias e rainhas durante o período de desenvolvimento onde ocorre a troca de alimentação entre operárias e rainhas (3º instar) até o início da fase de tecelagem do casulo (L5S1). Como calibrador foi utilizado o Δ CT de rainhas L3.

5.1.2 Expressão dos receptores de insulina no ovário larval

As análises das amostras de corpo inteiro de larvas de operárias e rainhas nos mostraram que houve uma modulação diferente na transcrição dos dois receptores de maneira geral. No intuito de entender melhor a maneira como as transcrições dos dois receptores comportam-se de forma tecido-específica, e tentar relacionar os dois receptores com funções específicas como proliferação celular e metabolismo, foram analisadas, por qRT-PCR, amostras de ovários de rainhas e operárias (ver Figuras 25 e 26) em fases onde sabidamente há diferenças quanto ao seu desenvolvimento (L4, L5F3, L5S1, L5S3 e PP1). A diferenciação casta específica do ovário começa no último instar larval, quando há a formação de clusters por mitoses simultâneas e incompletas no ovário de rainha, enquanto nos ovários das operárias a característica predominante é a morte celular programada (Schmidt Capella & Hartfelder 1997; Reginato & Cruz-Landim 2003; Tanaka et al., 2006). Somente na fase pré-pupal, quando a cápsula do ovário desaparece, é que as

diferenças entre os ovários de rainha e operária se tornam mais visíveis (Reginato & Cruz-Landim 2003).

Olhando os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento dos ovários nas duas castas, é difícil estabelecer uma relação apenas com os dados disponíveis para os perfis de expressão dos genes *InR1* e *InR2*. No entanto, devido ao papel já conhecido da via IIS nos ovários de outros organismos, acreditamos que há um possível envolvimento desta via com o desenvolvimento dos ovários de operárias e rainhas de *Apis mellifera*. Drummond e Spradling (2001) verificaram que moscas mutantes para o gene *Chico* apresentavam deficiência no desenvolvimento do ovário. Richard e colaboradores (2005) verificaram que o gene *Chico*, substrato do receptor de insulina, é necessário para o progresso da vitelogênese em ovários de *Drosophila melanogaster*. Assim, afim de obter novas informações, exploramos os nossos resultados obtidos por RT-PCR quantitativa de maneira diferente, comparando os perfis de transcrição dos genes *InR1* e *InR2* entre as duas castas (Figuras 38 e 39). A transcrição do gene *InR1* em ovários de rainhas seguiu em níveis basais até a fase prépupal, quando ocorreu um expressivo aumento na transcrição do gene *InR1*, enquanto nos ovários de operárias houve um padrão de aumento mais gradual na transcrição do gene *InR1* até a fase PP1, sendo que os níveis dos transcritos *InR1* foram sempre maiores em operárias que em rainhas. (Figura 38). Para o gene codificador de *InR2* observamos que o mesmo foi expresso em altos níveis em ovários de operárias, com relação aos ovários de rainhas, apenas em L4, enquanto os níveis de transcrição de rainhas superaram os de operárias em L5F3 e L5S3, e nas outras fases ambos os níveis foram baixos ou com apenas pequenas variações (Figura 39).

Olhando os perfis de transcrição dos receptores de insulina de maneira comparativa entre as castas, verificamos que há diferenças nos padrões de transcrição dos dois genes e que, provavelmente, há o envolvimento de um, ou dos dois genes codificadores do receptor de insulina na diferenciação do ovário. Além dessas diferenças observadas por nós, estudos em *Drosophila* revelaram que a oogênese sofre influência dos níveis de nutrientes e que a sinalização via IIS desempenha um papel em detectar e controlar a taxa de crescimento em células do ovário (Drummond & Spradling. 2001).

Figura 38: Perfis de transcrição do gene *InR1* (GB15492), obtidos por RT-PCR quantitativa, em ovários de larvas de operárias e rainhas durante estágios nos quais os ovários se desenvolvem diferentemente em cada casta. Como calibrador foi utilizado o Δ CT de operárias L4.

Figura 39: Perfis de transcrição do gene *InR2* (GB18331), obtidos por RT-PCR quantitativa, em ovários de larvas de operárias e rainhas durante estágios nos quais os ovários se desenvolvem diferentemente em cada casta. Como calibrador foi utilizado o Δ CT de operárias L4.

5.1.3. Efeito de hormônio juvenil sobre a transcrição de *InR1* e *InR2*

Como há anos vêm se imaginando que a expressão de fenótipos alternativos em insetos depende de fatores ambientais, os quais se traduzem em respostas específicas do sistema endócrino (para revisão ver Goewie 1978; Dingle & Winchell 1997; Hartfelder 2000a; Hartfelder 2000b; Hartfelder & Emlen 2005), tratamos larvas de abelhas com três dias de vida com o análogo do hormônio juvenil PPN (pyriproxifen), e analisamos a transcrição de *InR1* e *InR2* seis e vinte e quatro horas após o tratamento (Figuras 27 e 28). Os resultados com seis horas de tratamento foram considerados efeito da manipulação, pois, pelo protocolo experimental, o quadro contendo as larvas tratadas teve que ficar fora da colméia, por pelo menos duas horas para garantir a evaporação completa do solvente. Já em vinte e quatro horas após o tratamento, observamos, para ambos os transcritos *InR1* e *InR2*, um aumento com relação às amostras controles. No entanto, a relação da aplicação de HJ com o aumento dos níveis de transcrição não pode ser aplicada como regra, pois ao comparar os títulos hormonais (Figura 5) aos perfis de transcrição dos genes *InR1* e *InR2*, não observamos essa relação direta entre os títulos hormonais e os

perfis de transcrição dos receptores de insulina em abelhas. O fato dos genes para os receptores de insulina responderem de uma maneira sob o tratamento com HJ, e de outra durante o desenvolvimento organismo, elucida ainda mais a suposta complexidade na regulação da transcrição dos genes codificadores para os receptores de insulina de *Apis mellifera*. Por outro lado, tal complexidade não seria surpreendente, uma vez que a via IIS está relacionada a processos distintos, como regulação do envelhecimento (Tatar *et al.*, 2001, 2003), regulação do crescimento e proliferação celular (Goberdhan & Wilson 2003), vitelogênese (Richard *et al.*, 2005) e desenvolvimento do ovário em moscas (Drummond & Spradling 2001), entre outros.

5.1.4. Efeitos da dieta sobre a expressão dos receptores de insulina

Em *Drosophila melanogaster*, um único receptor se liga em até sete peptídeos similares a insulina (ILPs), controlando o crescimento celular, proliferação e o metabolismo (Goberdhan & Wilson 2003). Já em *Apis mellifera*, Wheeler e colaboradores (2006) verificaram a presença de pelo menos dois peptídeos insulínicos em *Apis mellifera*, *AmILP-1* e *AmILP-2*, e a análise *in silico* do genoma revelou a ocorrência de dois genes putativos para o receptor de insulina (Tabela 2), confirmando as análises feitas por Miguel Corona, o anotador oficial do Consórcio de Genoma de Abelha designado para este grupo de genes, que denominou os dois receptores de *InR1* (GB15492) e de *InR2* (GB18331), nomenclatura adotada por nós nesse trabalho. A transcrição dos dois genes codificadores para os receptores de insulina em *Apis mellifera* foi validada por nós, via RT-PCR (Figura 10), elucidando a ocorrência dos mRNAs para as duas proteínas.

Assim como em *Apis mellifera*, mamíferos também possuem dois receptores, o receptor de insulina propriamente dito e o receptor para os fatores de crescimento

insulina-like (IGFs). Estudos em ratos mutantes apresentaram uma dicotomia funcional parcial, onde os receptores ativam distintas cascatas de sinalização, as envolvidas com o metabolismo e as levando ao crescimento celular, embora em muitos casos possa haver uma sobreposição de funções (Kim & Accili 2002). Em *Apis mellifera*, essa especificidade entre as diferentes funções e os receptores, ainda não foi profundamente estudada, sendo nossos resultados sobre os perfis de transcrição dos *InR1* e *InR2*, nas fases larvais, os primeiros a sugerirem uma provável especificidade funcional.

Na tentativa de estabelecer relações, semelhantes às observadas em mamíferos, para os putativos receptores de insulina em *Apis mellifera*, realizamos, paralelamente às análises nos ovários descritas acima (Item 5.1.3), experimentos com abelhas operárias adultas alimentadas com diferentes dietas, com a finalidade de tentar detectar se há envolvimento diferencial e, se houver, qual dos dois receptores estaria mais ligado ao estímulo nutricional. As análises por qRT-PCR da transcrição dos genes *InR1* e *InR2* (ver Figuras 29 e 30), demonstrou que os perfis são semelhantes para ambos os genes, sugerindo que o tipo de alimentação influencia na expressão de ambos os genes e que mecanismos intrínsecos, possivelmente ligados à idade das abelhas, possam modular o padrão de transcrição. Um ponto de destaque é o aumento na transcrição dos genes *InR1* e *InR2* nas operárias alimentadas com mel. Esse aumento pode estar relacionado à mudança de tarefas em operárias adultas, pois, ao se prepararem para a fase campeira, a sua alimentação muda e elas passam a se alimentar principalmente de carboidratos (Crailsheim & Stolberg 1989).

Uma análise complementar por qRT PCR, do padrão de transcrição dos genes *InR1* e *InR2* em operárias adultas, mantidas na colméia, durante os primeiros

vinte dias da vida adulta (Figura 33), mostrou que o nível de transcrição do gene *InR1* foi mais alto que o nível de transcrição do gene *InR2* durante quase toda a vida adulta da operária (ver Figura 33). Apenas durante o décimo terceiro e décimo quinto dia ocorreu uma inversão dos níveis, onde o nível de transcrição do gene *InR2* superou o nível de transcrição do gene *InR1*. Esse momento de alternância entre os níveis dos receptores pode estar relacionado com o polietismo etário.

Como nestes experimentos o nosso objetivo era apenas uma primeira investida para tentar relacionar a transcrição dos receptores de insulina com a sua idade, não fizemos análises adicionais sobre o comportamento destas abelhas, nem análises da transcrição dos genes ao longo da vida adulta de rainha. Nossos resultados revelaram efeitos da alimentação e da idade, possivelmente ligados ao polietismo etário, na transcrição dos dois receptores, merecendo investigação mais detalhada, uma vez que o desenvolvimento comportamental de operárias adultas está intrinsecamente relacionado com os títulos de HJ e de vitelogenina, que se integram em um circuito de regulação mútua (Amdam e Omholt 2002; Guidugli *et al.* 2005, Nelson *et al.* 2007).

5.2 Análise da cauda 3' do gene *InR2*

A análise *in silico* do gene codificador para o *InR2* (GB18331) (Figura 13), elucidou a existência de uma extensa seqüência na região 3' desse gene, onde não há nenhum domínio proteico conhecido. Por se tratar de um gene predito computacionalmente, considerou-se que pode ter ocorrido um erro na predição, devido à inclusão da longa extensão carboxil-terminal que ocorre no ortólogo de *Drosophila melanogaster*. Para *Drosophila*, suspeita-se que esta extensão esteja envolvida com uma importante função no papel de transdução de sinal,

possivelmente nas interações com outras proteínas (Ruan 1995). Para validar a respectiva predição para *Apis mellifera*, realizamos uma 3' RACE para o gene *InR2*, onde obtivemos um fragmento de aproximadamente 3500pb (Figura 34), que foi clonado e aguarda o seu sequenciamento. O fato da amplificação de um fragmento de 3500pb ter ocorrido, que era o tamanho previsto, leva-nos a crer que a predição está correta, e que realmente existe uma extensão da região 3' do gene *InR2* de *Apis mellifera*.

5.3 Anotação e sequenciamento outros componentes da via IIS

Além dos genes para os receptores de insulina, estudados mais a fundo nesse trabalho, há outros componentes na via IIS que foram investigados ao longo da realização desse projeto. Alguns genes envolvidos na via de sinalização IIS previamente identificados (Tabela 2) foram selecionados, anotados com o auxílio da ferramenta computacional Artemis, analisados com ferramentas BLASTs, tiveram primers desenhados especificamente para validação de cada um deles e, adicionalmente, alguns foram seqüenciados.

5.3.1 O substrato do receptor de insulina Chico de *Apis mellifera*

O gene codificador para o substrato do receptor de insulina de *Apis mellifera* (GB11037), ortólogo à proteína substrato do receptor de insulina (Chico) de *Drosophila melanogaster*, foi identificado, anotado, seqüenciado, os domínios conservados foram evidenciados, e sua transcrição validada por RT-PCR (Figuras 9 e 16). O sequenciamento feito por nós (Figura 16) e a análise BLASTN confirmou que o observado trata-se mesmo de um ortólogo para o Chico em *Apis mellifera*,

com uma similaridade de 87% em relação ao predito GB11037 (Figura 17). A similaridade entre o fragmento seqüenciado e o predito não foi maior devido a problemas no sequenciamento, embora a similaridade obtida já seja suficiente para afirmarmos que se trata do mesmo gene.

O substrato do receptor de insulina (Chico) age no sentido de propagar o sinal do receptor de insulina para a fosfoinositídeo quinase-3 (PI3K) (Yenush and White, 1997), e em *Drosophila* está envolvido no controle do tamanho, fertilidade da fêmea e metabolismo de lipídeos durante o desenvolvimento (Fernandez *et al* 1995; Chen *et al.* 1996, Bohni *et al* 1999, Brogiolo *et al.* 2001).

5.3.2 A quinase ribossomal S6K de *Apis mellifera*

Com relação à quinase ribossomal S6 (S6K) de *Drosophila melanogaster*, foi encontrado no genoma de *Apis mellifera* (Amel. 4.0) um gene ortólogo predito (Official_Gene_Set number accession GB19390-PA). A análise de domínios conservados por RPSBLAST demonstrou que a proteína predita de *Apis mellifera* possui o domínio S_TKc, que é o domínio catalítico de proteína serina/treonina quinase, e o domínio S_Tk_X, que é uma extensão do domínio S_Tk (Figura 18). A transcrição do gene predito S6K (GB19390-PA) em *Apis mellifera* (Figura 9) foi verificada com os primers S6K-F e S6K-R, e o fragmento obtido foi seqüenciado e analisado por ferramenta BLASTN (Figuras 18 e 19). A similaridade obtida entre o fragmento originado pelos primers S6K-F e S6K-R com o gene predito (GB19390) foi de 92%, o suficiente para concluirmos que se trata do mesmo gene.

A quinase S6K ativada aumenta a fosforilação da proteína ribossomal S6, a qual controla seletivamente a translação de mRNAs de proteínas ribossomais

através de um trato de oligopirimidina na região de início de transcrição 5' (5' TOP) (Thomas 2000). A tradução das proteínas ribossomais 5' TOP é necessária no controle do crescimento celular (Thomas 2000). Além disso, a sinalização dependente de nutriente via quinase S6K está envolvida, juntamente com a sinalização TOR, no desenvolvimento de ovos em mosquitos (Hansen *et al.* 2005).

5.3.3 O gene supressor de tumor TSC-1 de *Apis mellifera*

A análise *in silico* do gene ortólogo em *Apis mellifera* (Official_Gene_Set number accession GB12676-PA) para o gene *Tsc1* (Tuberous sclerosis) de *Drosophila melanogaster*, indicou que o mesmo codifica uma proteína com os domínios Harantina e o domínio ABC_SHC4_euk (Figura20). A proteína Tsc1 é um supressor de tumor envolvido na via de sinalização da insulina e na via de sinalização TOR (Bateman & Neill 2004). A proteína TSC-1 inibe a atividade da quinase S6k, e a sua ausência leva a uma ativação constitutiva de S6K (Radimerski *et al.* 2002). A análise por RT-PCR com os primers Tsc1-F e Tsc1-R demonstrou que ocorre a presença do transcrito em larva de *Apis mellifera* (Figura9).

5.3.4 O gene codificador para uma proteína alvo de rapamicina (TOR) em *Apis mellifera*

Para o gene o gene *TOR* de *Drosophila melanogaster* foi verificado, em *Apis mellifera*, a existência de cinco preditos que são possíveis membros da família TOR (Tabela 2). Dos cinco preditos, foi escolhido um provável ortólogo em *Apis mellifera* (Official_Gene_Set numbers accession GB11213) que possui maior similaridade com seu correspondente em *D. melanogaster* (Tabela 2). O gene *TOR* selecionado teve sua seqüência anotada e analisada por ferramentas BLASTs. A análise dos

domínios conservados por RPSBLAST evidenciou a presença de três domínios conservados característicos das proteínas alvos de rapamicina: um domínio PI3K relacionado (PI3Kc) e dois domínios FAT adicionais, um C-Terminal e outro N-Terminal em relação ao domínio PI3K.(Figura 21). As proteínas TOR são serina/treonina quinases, que pertencem à família de quinases relacionadas à quinase fosfoinositideo-3 (PIKK), e recebem a designação de TOR por serem alvo de rapamicina (target of rapamycin) (Oldham & Hafen 2003). Essas proteínas fazem parte de uma via de sinalização sensível à presença de aminoácidos que regula o crescimento, alterando a transcrição e tradução de genes em resposta a alterações nos nutrientes (Fafournoux *et.al.* 2000; Van Sluijters *et al.* 2000). TOR é conhecido por responder positivamente à presença de aminoácidos, e induzir um aumento na tradução através de ativação da quinase ribossomal S6 (S6K) (Dufner & Thomas 1999, Hansen 2005). A transcrição do suposto gene *TOR* em *Apis mellifera* foi verificada por RT-PCR com o par de primers específicos (Figura 9).

5.4 Considerações finais

A evolução da vida social nos insetos himenópteros provavelmente contou com modificações nos mecanismos de controle que afetaram a fecundidade, que em muitos insetos estão correlacionadas com o tamanho do corpo da fêmea (Patel *et al.* 2007). A relação entre o tamanho do corpo e fecundidade é afetada positivamente pela nutrição larval (Reiss 1989). A via de sinalização IIS, que é altamente conservada na evolução, constitui um exemplo de um mecanismo regulador chave que permite que organismos se adaptem à mudanças de nutrientes (Puig & Tijan 2005, 2006). Dessa forma, a via IIS provavelmente está envolvida no surgimento de castas reprodutivas (operárias e rainhas) a partir dos ancestrais dos organismos sociais (sem castas), onde a plasticidade no desenvolvimento que diz respeito a

escala de tamanho e fecundidade através da nutrição pode ter se adaptado a produzir descendentes com diferentes capacidades reprodutivas (Patel *et al.* 2007).

Além das características como tamanho, morfologia e fecundidade, as operárias e rainhas possuem diferenças quanto a taxas de crescimento e tempo de desenvolvimento larval e, no indivíduo adulto, longevidade. A via de sinalização IIS, por sua vez, está envolvida no controle de múltiplos processos celulares como a apoptose (Brunet *et al.* 1999), síntese de RNA de genes envolvidos no ciclo celular (Alvares *et al.* 2001), crescimento e tamanho celular (Goberdham & Wilson 2003; Dufner & Thomas 1999) e longevidade (Tatar *et al.* 2003). Assim, devido aos diferentes papéis desempenhados pela via IIS em características claramente distintas entre as duas castas de *Apis mellifera*, esse módulo de sinalização vem ocupando lugar como um provável integrador entre os diferentes tipos de alimentação e o desenvolvimento de castas específicas em *Apis mellifera*.

Nossos resultados demonstraram claramente que há diferenças entre os níveis de transcrição dos receptores de insulina *InR1* e *InR2*, tanto em uma mesma casta quanto entre as diferentes castas (operárias e rainhas), pois os níveis dos transcritos *InR1* e *InR2* em operárias, de uma maneira geral, foram maiores do que em rainhas e que em operárias adultas há um predomínio na transcrição do gene *InR1* ao longo da vida, mas que é marcado por alguns momentos onde o predomínio passa a ser do gene *InR2*. Além do mais, há o fato que o gene *InR1* se mostrou mais sensível a uma dieta rica em proteínas do que o gene *InR2* e que aparentemente existe algum fator, ainda desconhecido, na geléia de operária que mantêm os níveis de transcrição dos receptores de insulina maiores em larvas de operárias do que em larvas de rainhas.

Os resultados observados nesse trabalho, juntamente com os dados de Wheeler e colaboradores (2006), Seehus e colaboradores (2006), e Patel e colaboradores (2007) constituem as primeiras informações sob as relações entre a via IIS e as diferentes castas observadas em *Apis mellifera*. Embora muito ainda tenha que ser feito, no sentido de buscar a compreensão das relações moleculares da via IIS com os diferentes estímulos nutricionais aos quais as larvas das abelhas submetem-se, são possíveis análises comparativas entre o genoma de *Apis mellifera* e os genomas de diferentes invertebrados como *Caenorhabditis elegans*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Bombyx mori* e *Tribolium castaneum*, disponíveis no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/>). Essas análises comparativas serão úteis no sentido de buscar peculiaridades e semelhanças entre as vias de sinalização IIS dos diferentes organismos, como o fato de em *C. elegans* haver 37 genes codificando peptídeos insulínicos, enquanto em *D. melanogaster* tem 7 peptídeos insulínicos, sendo que em ambos os organismos há um único receptor de insulina (The Honeybee Genome Sequencing Consortium 2006). Por outro lado, em *Apis mellifera* há apenas dois genes codificadores de peptídeos insulínicos identificados (*AmILP-1* e *AmILP-2*), assim como, há dois receptores de insulina (*InR-1* e *InR-2*) (The Honeybee Genome Sequencing Consortium 2006). Dessa maneira, associando as análises genômicas com as metodologias disponíveis para *Apis mellifera*, será possível elucidar as relações genéticas e moleculares da via de sinalização IIS particular de *A. mellifera*, que resultam na distinção entre operárias e rainhas.

6 Conclusão

As análises realizadas e os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento desse trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- Ortólogos de importantes genes da via de sinalização IIS (*InR1*, *InR2*, *TOR*, *TSC1*, *S6K* e *Chico*) são transcritos em *Apis mellifera*, comprovando a conservação dessa via em organismos filogeneticamente distintos como *A. mellifera*, *D. melanogaster*, *H. sapiens* e *M. musculus*.
- Existem dois genes para os receptores de insulina, *InR1* e *InR2*, que são transcritos ao longo da vida da abelha *Apis mellifera* de maneira casta específica
- A transcrição dos genes codificadores para os receptores de insulina, *InR1* e *InR2*, apresenta perfis tecido-específicos, com relação às amostras de ovários quando comparadas às amostras de corpo inteiro para ambas as castas.
- Os níveis dos transcritos *InR1* e *InR2* são maiores em larvas de operárias do que em larvas de rainhas, fato que pode estar relacionado com a dieta das operárias.

- A transcrição de *InR1* apresentou uma modulação maior que a de *InR2* em resposta a dietas na fase adulta de operárias, indicando funcionalidades diferentes dos dois receptores.
- A regulação da expressão dos genes codificadores para os receptores de insulina *InR1* e *InR2* é complexa, sendo influenciada por fatores genéticos e ambientais.

7. Bibliografia

- Alvarez, B., Martinez, A.C., burgering, B.M., Carrera, A.C. (2001). Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals. *Nature* **413**, 744-747.
- Amdam, G. V. & Omholt, S. W. (2002). The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *Journal of theoretical biology* **216**. 209-228.
- Barron, A. B., Oldroyd, B.P., RAtnieks, F.L.W. (2001) Worker reproduction in honeybees (*Apis*) and the anarchic syndrome: a review. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **50**,199-208.
- Bateman, J.M. & McNeill, H (2004) Temporal control of differentiation by the insulin Receptor/Tor Pathway in *Drosophila*. *Cell* **119**, 87-96.
- Bohni, R., Riesgo.-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B.F., Beckingham, K., Hafen, E. (1999) Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* **97**, 865-875.
- 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**, 213-221.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K. C., Blenis, J., Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 854-868.
- Chen, C., Jack, J., Garofalo, R.S. (1996) The *Drosophila* insulin receptor is required for normal growth. *Endocrinology* **137**, 846-856.

- Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., Carré, C., Noselli, S., e Léopold, P. (2005) Antagonistic actions of Edysone and Insulin determine final size in *Drosophila*. *Science*, **310**, 667-670.
- Crailsheim, K. & Stolberg, E. (1989). Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* **35 (8)**, 595-602.
- Dedej, S., Hartfelder, K., Aumeier, A., 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*). *Journal of Apicultural Research* **37 (3)**, 198-190.
- De Kort, C.A.D. & Granger, N.A. (1996) Regulation of JH titers: The relevance of degradative enzymes and binding proteins. *Archives of insect biochemistry and Physiology* **33**, 1-26.
- Dietz, A., Herman, H.R., Blum, M.S. (1979) The role of exogenous JH I, JH II, JH III and anti-JH (precocene II) on queen induction of 4.5-day-old worker honeybee larvae. *Journal of Insect Physiology* **25**, 503-512.
- Dingle, H. & Winchell, R. (1997). Juvenile hormone as a mediator of plasticity in insect life histories. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **35**, 359-373.
- Dufner, A. & Thomas, G. (1999). Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Experimental Cell Research* **253**, 100-109.
- Drummond, D.B. & Spradling, A.C. (2001) Stem Cells and Their Progeny Respond to Nutritional Changes during *Drosophila* Oogenesis. *Developmental Biology* **231**, 265-278.

- Evans, J. D. & Wheeler, D. E. (2000). Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biology* **2** (1), 1-6.
- Fafournoux, P., Bruhat, A. Jousse, C. (2000) Amino acid regulation of gene expression. *Biochemical Journal* **351**, 1-12.
- Fernandez, R., Tabarini, D., Azpiazu, N., Frasch, M., Schlessinger, J. (1995) The *Drosophila* insulin receptor homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential. *EMBO Journal* **14**, 3373-3384.
- Garrett, T.P.J., McKern, N. M., Lou, M., Frenkel, M.J., Bentley, J.D., Lovrecz, G.O., Elleman, T.C., Cosgrove, L.J., Ward, C. W. (1998) Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor. *Nature* **394**, 395-399.
- Goberdhan, D.C.I. & Wilson, C. (2003) The functions of insulin signaling: size isn't everything, even in *Drosophila*. *Differentiation* **71**, 375-397
- Goewie, E. A. (1978) Regulation of caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera* L.) *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen – Nederland* **78** (15) 1-75
- Guidugli, K. R., Nascimento, A. M., Amdam, G.V., Barchuk, A. R., Omholt, S., Simões, Z. L. P., Hartfelder, K. (2005). Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *Federation of European Biochemical Societies* **579**, 4961-4965
- Hammock, B.D. (1985) Regulation of juvenile hormone titer: Degradation. *In*: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I (Eds), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol.2. Pergamon Press, New York, 431-472.

- Hansen, I.A., Attardo, M.G., Roy, S.G., Raikhel, A.S. (2005) Target of Rapamycin-dependent Activation of S6 Kinase Is a Central Step in the Transduction of Nutritional Signals during Egg Development in a Mosquito. *The Journal of Biological Chemistry* **280** (21), 20565-20572.
- Hartfelder, K. (1993) Structure and function of the prothoracic gland in honey bee (*Apis mellifera* L.) development. *Invertebrate Reproduction and Development* **23**, 59-74.
- Hartfelder, K., Köstlin, K. Hepperle, C. (1995) Ecdysteroid-dependent protein synthesis in caste-specific development of the larval honey bee ovary. *Roux's Archives of Developmental Biology* **205**, 73-80.
- Hartfelder, K. & Engels, W. (1998). Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Current Topics in Developmental Biology* **40**, 45-77
- Hartfelder, K. (2000)a. Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **33**, 157-177
- Hartfelder, K. (2000)b. Arthropoda- Insecta: Caste Differentiation *Reproductive Biology of Invertebrates I* **10B**, 185-204
- Hartfelder, K. & Emlen, D. J. (2005) Endocrine control of insect polyphenisms. In *Comprehensive Insect Molecular Science* (L. I. Gilbert, K. Iatrou, and S. J. Gill, Eds.), Vol. 3, pp. 653-704. Elsevier, Oxford.
- Haydak, H. M. (1970) Honey Bee Nutrition. *Annual Review of Entomology* **15**, 143-156
- Haydak, H. M. (1943) Larval Food and Development of Castes in the Honeybee. *Journal of Economic Entomology* **36**, 779-793
- Kim, J. J. & Accili, D. (2002) Signalling through IGF-1 and insulin receptors: Where is the specificity? *Growth Hormone & IGF Research* **12**:84-90

- Makert, G.R., Paxton, R.J., Hartfelder, K. (2006) Ovariole number-a predictor of differential reproductive success among worker subfamilies in queenless honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **60**, 815-825.
- Michellete, E.R.F. & Soares, A.E.E. (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **24**, 431-440.
- Michener, C.D. (1974) The social behavior of the bees: a comparative study. Cambridge, Mass., Harvard Univ. Press.
- Michener, C.D. (2000) *The Bees of the World*. John Hopkins University Press, Baltimore.
- Mirth, C., Truman, J.W., Riddiford, L.M. (2005) The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology* **15 (20)**, 1796-1807.
- Nascimento, A.M., Cuvillier-Hot, V., Barchuk, A.R., Simões, Z.L.P. & Hartfelder, K. (2004). Honey bee (*Apis mellifera*) transferrin-gene structure and the role of ecdysteroids in the developmental regulation of its expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**, 415-424.
- Nelson, C.M., Ihle, K.E., Fondrk, M.K., Page-Jr., R.E., Amdam, G.V. (2007) The gene *vitellogenin* has multiple coordinating effects on social organization. *PLOSbiology* **5 (3)**, 673-677.
- Nijhout, H.F. (1994) Insect hormones. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Nijhout, H.F. (1999) Control mechanisms of polyphenic development in insects. *BioScience* **49**, 181-192

- Nijhout, H.F. (2003) The control of growth. *Development* **130**, 5863-5867.
- Nunes-Silva, P., Gonçalves, L. S., Francoy, M. T., Jong, D. D. (2006) Rate of growth and development time of africanized honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers during ontogenetic development. *Brazilian Journal fo Morphological Sciences* **23 (3-4)**, 325-332
- Oldham, S. & Hafen, E. (2003). Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends in Cell Biology* **13**, 79-85
- Page, R. E. & Peng, C.Y.S. (2001) Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology* **36**, 695-711
- Patel, A., Fondrk, k.M., Kaftanoglu, O., Hunt, G., Amdam, G.V. (2007) The making of a queen: TOR pathway governs diphenic caste development (submetido).
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, 2002-2007
- Puig, O., Marr, M.T., Ruhf, L.M. e Tjian, R. (2003) Control of cell number by *Drosophilai* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes & Development* **17**, 2006-2020
- Puig, O. & Tijian, R. (2005) Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes & Development* **19**, 2435-2446
- Puig,O. & Tjian, R. (2006) Nutrient Availability and Growth: regulation of Insulin Signaling by dFOXO/FOXO1. *Cell Cycle* **5**, 503-505
- Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A., Hartfelder, K. (1990) Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honey bee larvae. *General and comparative endocrinology* **78**, 31-38.

- Radimerski, T., Montagne, J., Hemmings-Mieszczak, M., Thomas, G. (2002) Lethality of *Drosophila* lacking TSC tumor suppressor function rescued by reducing dS6k signaling. *Genes & Development* **16**, 2627-2632.
- Radimerski, T., Montagne, J., Rintelen, F., Stocker, H., Van-der-Kaay, J., Downes, C. P., Hafen, E., Thomas, G. (2003). dS6K-regulated cell growth is dPKB/Dpi(3)K-independent, but requires dPDK1. *Nature Cell Biology* **4**, 251-255
- Ratnieks, F.L.W. (1993) Egg-laying, egg-removal, and ovary development by workers in queenright honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **32**, 191-198.
- Reginato, R. D. & Cruz-Landim, C. (2003) Ovarian growth during larval development of queen and worker of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae): A morphometric and histological study. *Brazilian Journal of Biology* **63**(1), 121-127
- Reiss, M.J. (1989) The allometry of growth and reproduction. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rembold, H & Hanser, G. (1964) On the royal jelly of honey bees. 8. Demonstration of the determining principle in the jelly of queen bee larvae. *Hoppe-Seyler Zeitschrift der Physiologische Chemie* **339**(1), 251-254
- Rembold, H., Czoppelt, C., Rao, P.J. (1974) Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* **20**, 1193-1202.
- Rembold, H.; Kramer, J.P.; Ulrich, G.M. (1980). Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* **11**, 29-38
- Rembold, H. (1987). Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry*. **17**, 1003-1006

- Rembold, H. (1988) Die Aufklärung der Kastenentstehung im Bienenstaat in: Dittfurth H. V. (ed) Mannheimer Forum 87/88, 167-231.
- Richard, S. D., Rybczynski, R. Wilson, T. G., Wang, Y., Wayne, M. L., Zhou, Y., Partridge, L., Harshman, L. G. (2005) Insulin signaling is necessary for vitellogenesis in *Drosophila melanogaster* independent of the roles of juvenile hormone and ecdysteroids: female sterility of the *chico* insulin signaling mutation is autonomous to the ovary. *Journal of Insect Physiology* **51**, 455-464
- Robinson, G. E., Strambi, C., Strambi, A., Huang, Z.Y. (1992) Reproduction in worker honey bees is associated with low juvenile hormone titers and rates of biosynthesis. *General and Comparative Endocrinology* **87**, 471-480.
- Roe, R.M. & Venkatesh, K. (1990) Metabolism of juvenile hormones: degradation and titer regulation. In: Rutgers, G. A. (Ed.), *Morphogenetic Hormones of Arthropods*, vol. 1. University Press, New Brunswick, 126-179.
- Ruan, Y., Chen, C. Cao, Y. Garofalo, R.S. (1995) The *Drosophila* insulin receptor contains a novel carboxyl-terminal extension likely to play an important role in signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry* **270** (9) 4236-4243.
- Sambrook, J. Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning- A Laboratory Manual* 2ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Seehuus, S-C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., Amdam, G.V (2006) Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Science* **103**, 962-967.
- Schmidt-Capella, I.C. & Hartfelder, K. (1998) Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *Journal of Insect Physiology* **44**, 385-391
- Stern, D. (2003). Body-size control: how an insect knows it has grown enough. *Current Biology* **13**, R267-R269

- Stern, D.L. & Emlen, D.J. (1999) The developmental basis for allometry in insects. *Development* **126**, 1091-1101
- Tanaka, D.E., Schmidt-Capella, I.C., Hatfelder, K. (2006) Cell death in the germline-mechanisms and consequences for reproductive plasticity in social bees. . *Brazilian Journal fo Morphological Sciences* **23 (1)**, 467-500.
- Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.-P., Yin, C.-M. (2001) A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* **292**, 107-110.
- Tatar, M., Bartke, A., Antebi, Adam (2003) The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* **299**, 1346-1351.
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **44**, 931-949.
- Thomas, G. (2000) An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nature Cell Biology* **2**, E71-E72.
- Truman, J.W. & Riddiford, L.M. (2002) Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annual Review of Entomology* **47**, 467-500.
- Van Sluijters, D. A., Dubbelhuis, P.F., Blommaart, E.F., Meijer, A.J. (2000) Amino-acid-dependent signal transduction. *Biochemical Journal* **351**, 545-550.
- Weaver, N. (1957) Effects of larval age on dimorphic differentiation of the female honey bees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera: Apidae) *Annals of the Entomological Society of America* **50**, 283-294.
- Wheeler, D.E; Buck, N; Evans, J.D. (2006) Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* **15 (5)**, 597-602

- Wilde, J. De (1976) Juvenile hormone and caste differentiation in honey bee (*Apis mellifera* L.). In: *Phase and Caste Determination in Insects* (M. Lücher, ed.) pp.5-20. Pergamon Press, Oxford
- Wilde, J. De & Beetsma, J. (1982) The Physiology of Caste Development in Social Insects *Advances in Insect Physiology* **16**,167-246
- Wilson, E.O. (2006) How to make a social insect. *Nature* **443**, 919-920.
- Winston, M. L. (1987) The Biology of the honey bee. *Harvard University Press*. Cambridge, MA.
- Wittwer, F; Jquenoud, M; Brogiolo, W; Zarske, M; Wüstemann, P; Fernandez, R; Stocker, H; Wymann, M and Hafen, E. (2005) Susi, a Negative Regulator of Drosophila PI3-Kinase. *Developmental Cell* **8**, 817-827
- Wu, Q. & Brown, M.R. (2006) Signaling And Function Of Insulin-Like Peptides In Insects. *Annual Review of Entomology* **51**, 1-24.
- Yenush, L., Fernandez, R., Myers, M.G., Jr, Grammer, T.C., Sun, X.J., Blenis, J., Pierce, J. H., Schlessinger, J. and White, M.F. (1997) The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. *BioEssays* **19**, 491-500.

Portais Internet utilizados:

www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/

<http://align.genome.jp/>

<http://zulu.fmrp.usp.br/beelab>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

www.uni-bayreuth.de/.../toek1/fortner/index.htm

<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3> www.cgi