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

**Biologia Molecular de Genes Envolvidos no Metabolismo
do Hormônio Juvenil em *Apis mellifera***

Aline Mackert dos Santos

Ribeirão Preto

-2008-

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

**Biologia Molecular de Genes Envolvidos no Metabolismo
do Hormônio Juvenil em *Apis mellifera***

Aline Mackert dos Santos

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de DOUTOR
em CIÊNCIAS.

Área de concentração: GENÉTICA

Orientadora: Prof^a Dr^a Zilá Luz Paulino Simões

Ribeirão Preto

-2008-

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

SANTOS, ALINE MACKERT

Biologia molecular de genes envolvidos no metabolismo do hormônio juvenil em *Apis mellifera*./ Santos, Aline Mackert; Orientadora: Simões, Zilá Luz Paulino – São Paulo, 2008.

176p.:29 il.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Genética.

1. *Apis mellifera*. 2. Hormônio Juvenil. 3. *Corpora allata*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Mackert dos Santos

Biologia molecular de genes envolvidos no
metabolismo do hormônio juvenil em *Apis mellifera*

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de DOUTOR
em CIÊNCIAS.

Área de concentração: GENÉTICA

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Profº (a) Drº (a).-----

Profº (a) Drº (a).-----

Profº (a) Drº (a).-----

Profº (a) Drº (a).-----

Profº (a) Drº (a).-----

Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para o Senhor, e não para os homens, sabendo que receberão do Senhor a recompensa da herança. É a Cristo, o Senhor, que vocês estão servindo.

Colossenses 3: 23-24 – Bíblia Sagrada, versão NVI

À minha querida família que eu carinhosamente chamo de “Família Buscapé”, por toda a diversão, emoção, ajuda, pelas risadas e por tornar a minha vida NADA monótona. Marcos, Amélia, Amanda, Alan e Elisângela amo vocês com toda minha força, todo meu sentimento e todo o meu entendimento!

AGRADECIMENTOS

- ♥ A Deus por me apontar sempre o caminho correto a seguir e me dar forças para continuar quando tudo parecia estar difícil demais;
- ♥ À Professora Dra. Zilá Luz Paulino Simões, um exemplo de humildade, paciência e sucesso. Obrigada por todo apoio na vida acadêmica e pessoal, estou certa de que não haveria melhor orientadora para mim;
- ♥ À querida Professora Dra. Márcia Gentile Bitondi por todo apoio e ajuda, devo muito do meu aprendizado a você, obrigada!
- ♥ Ao professor Dr. Klaus Hartfelder, divertido e sempre pronto a ajudar, sua ajuda foi indispensável para a conclusão desta tese;
- ♥ Ao Dr. Subba Reddy Palli por me aceitar em seu laboratório durante 4 meses, que eu considero indispensáveis para o meu crescimento. Ao Hua Bai, companheiro de experimentos nos EUA e grande pessoa;
- ♥ Às minhas queridas amigas do coração: Anete Pedro Lourenço e Vera Figueiredo, a nossa amizade será eterna, não importa para onde a vida nos leve. Ah! Obrigada por toda a ajuda no laboratório em todos esses anos;
- ♥ À Marcela Bezerra Flaure por toda a ajuda, amizade em todos esses anos, e por coletar grande parte dos minúsculos *corpora allata* para as análises deste trabalho;
- ♥ Ao querido amigo Luis Aguiar, por toda a ajuda no apiário e por pacientemente cuidar das abelhinhas para mim;

- ♥ Às duas pessoas que me ajudaram intensamente no meu processo de formação, meus queridos orientados de iniciação científica: Ana Durvalina Bomtorin e Gustavo Conrado Couto Rosa, talvez vocês não saibam, mas eu aprendi muito mais com vocês do que vocês comigo. Obrigada também pela ajuda nos experimentos;
- ♥ Tenho muitos amigos, mas em especial quero agradecer aos meus três “ursinhos”: Rodrigo, Carlos e Paulo Emílio. Obrigada pelo carinho, atenção, compreensão, paciência e por nunca terem me deixado de lado;
- ♥ Ao Professor Dr. David De Jong, por toda a ajuda que nunca me negou e por ter sido meu supervisor no estágio de ensino PAE;
- ♥ Ao Professor Dr. Ademilson Espencer Soares, o professor mais gente boa que eu já conheci;
- ♥ À minha querida amiga Amanda por todo carinho e atenção. Obrigada pela ajuda, conselhos e amizade;
- ♥ Aos meus amigos do Bloco A e do Apilab (Ana Rita, Camila M., Camila C., Vanessa, Marina; Fernanda; Thaty; Michele M., Michele P., Rogério, Gesline, Tiago, Weyder, Ivan, Daiana, Gisele, Ana Bonetti, Francis, Aline A., Moysés, Juliana, Adriana, David, Sérgio, Mônica);
- ♥ Aos amigos que passaram pelo Bloco A, mas já foram embora: Roberto Barchuk, Karina, Érica Tanaka, Nínive, José Ezequiel, Adriana Cunha, Evelise, Virginie, Maria Salete, Gustavo, Alexandre, Geusa;

- ♥ Às secretárias do Depto. de Genética: Susie e Maria, que sempre me ajudaram nas horas de sufoco;
- ♥ Ao Nilton Avanci por toda a ajuda nos experimentos de produção *in vitro* de proteínas em bactérias;
- ♥ À Prof. Dra. Maria Cristina Barreira pelo auxílio na produção dos anticorpos;
- ♥ Ao amigo Alexandre Cristino pela ajuda nas análises dos promotores;
- ♥ À FAPESP pela bolsa de estudos concedida;
- ♥ À Pró-Reitoria de Pós-graduação pelas passagens para o estágio em Lexington – Kentucky - EUA;
- ♥ Aos amigos da genética pelos anos de convivência;
- ♥ Aos amigos da igreja Sara Nossa Terra, que me ajudaram tão prontamente em meu caminho.

Enfim, agradeço a todos que ajudaram durante esse período. Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O hormônio juvenil	1
1.2 A modulação dos títulos de hormônio juvenil	2
1.2.1 A via de síntese do hormônio juvenil	2
1.2.2 A via de degradação do hormônio juvenil	5
1.3 As abelhas <i>Apis mellifera</i>	7
1.3.1 Diferenciação de castas em <i>Apis mellifera</i>	8
1.3.2 Títulos de hormônio juvenil e ecdisteróides em <i>Apis mellifera</i>	10
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos gerais	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Material biológico	18
3.1.1 Dissecção do material biológico	20
3.1.2 Coleta de hemolinfa	20
3.2 Análise dos genes de interesse	21
3.2.1 Identificação do gene da epóxido hidrolase do hormônio juvenil	21
3.2.2 Análises de seqüências candidatas à esterase do hormônio juvenil	22
3.2.3 Análise de genes da via de síntese do hormônio juvenil	22
3.2.4 Desenho de <i>primers</i>	25
3.2.5 Análises <i>in silico</i>	25
3.3 Metodologia para análise de RNA e DNA	26
3.3.1 Obtenção do RNA total	26
3.3.2 Confecção de cDNA	27
3.3.3 Eletroforese de RNA em condições desnaturantes	27
3.4 Clonagem e sequenciamento	28
3.4.1 Preparo das células competentes	28
3.4.2 Clonagem de genes em vetores comerciais para sequenciamento	28
3.4.3 Transformação bacteriana	29
3.4.4 Sequenciamento de DNA	29
3.4.5 Sequenciamento utilizando produto de PCR como molde	30
3.5 Quantificação dos níveis de transcritos	31
3.5.1 RT-PCR semiquantitativa	31
3.5.2 RT-PCR quantitativa em tempo real	31
3.5.3 Qualidade dos <i>primers</i> e das amostras	32
3.5.4 Análise dos genes de controle endógeno	33
3.6 Metodologia para análise de proteínas	35
3.6.1 Extração de proteínas utilizando reagente Trizol	35
3.6.2 Extração de proteínas do corpo gorduroso e hemolinfa	35
3.6.3 Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE)	35

3.6.4	Western Blot	36
3.7	Tratamento com hormônio juvenil	38
3.8	Expressão <i>in vitro</i> de proteínas recombinantes em células de E. coli	39
3.8.1	Análise das sequências e desenho dos <i>primers</i>	41
3.8.2	Produção de DNA linear contendo o sítio <i>attB</i>	41
3.8.3	Recombinação entre os sítios <i>attB</i> e <i>attP</i>	42
3.8.4	Recombinação entre os sítios <i>attL</i> e <i>attR</i>	44
3.8.5	Preparo das linhagens de expressão	45
3.8.6	Produção das proteínas recombinantes.....	46
3.9	Produção de anticorpos.....	47
3.9.1	Purificação das proteínas recombinantes recJHE e recJHEH	47
3.9.2	Produção de anticorpos anti-JHE e anti-JHEH em coelhos	48
3.9.3	Imunodifusão dos anticorpos.....	48
3.9.4	Titulação dos anticorpos.....	49
3.10	Experimentos de RNA de interferência.....	50
3.10.1	Produção de RNA dupla fita.....	50
3.10.2	Injeção de dsRNA, confinamento, coleta e análise das amostras.....	51
3.11	Quantificação do hormônio juvenil por Radioimunoensaio.....	52
3.12	Experimentos de manipulação do alimento.....	54
3.12.1	Experimento de alimentação em abelhas adultas	54
3.12.2	Experimento de manipulação do alimento em larvas.....	55
3.13	Análises estatísticas	55
4	RESULTADOS	57
4.1	Produção de anticorpos.....	57
4.2	Esterase do hormônio juvenil	61
4.2.1	Identificação do gene da esterase do hormônio juvenil.....	61
4.2.2	A esterase do hormônio juvenil durante o ciclo de vida de operárias	64
4.2.3	Efeito da manipulação hormonal sobre a expressão de <i>Amjhe</i>	69
4.2.4	Silenciamento do gene <i>Amjhe</i> e efeitos sobre os níveis de HJ	72
4.3	Identificação do gene da epóxido hidrolase do hormônio juvenil.....	78
4.4	Diferenciação de castas e a degradação do hormônio juvenil	85
4.5	Identificação de genes da via de síntese do hormônio juvenil	91
4.5.1	Análises <i>in silico</i>	91
4.5.2	Análises de quantificação gênica.....	101
4.5.3	Análises <i>in silico</i> das regiões 5' <i>upstream</i> dos genes.....	107
4.6	Manipulação do alimento em abelhas adultas	110
5	DISCUSSÃO	114
5.1	Esterase do hormônio juvenil	114
5.2	Epóxido hidrolase do hormônio juvenil	120
5.3	Diferenciação de castas e degradação do hormônio juvenil.....	124
5.4	A via de síntese do hormônio juvenil	129
6	CONCLUSÕES	142
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
8	ANEXOS	161
8.1	Anexo 1 – Tabela de primers utilizados	161
8.2	Anexo 2 – Artigo publicado	164

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tipos de hormônio juvenil.....	01
Figura 2 – A via de síntese do hormônio juvenil	04
Figura 3 – A via de degradação do hormônio juvenil.....	07
Figura 4 – Títulos de hormônio juvenil em <i>Apis mellifera</i>	12
Figura 5 – Títulos de ecdisteróides em <i>Apis mellifera</i>	13
Figura 6 – Sistema de clonagem <i>Gateway</i>	40
Figura 7 – Vetor de entrada.....	43
Figura 8 – Vetor de expressão.....	45
Figura 9 – Estrutura das proteínas recombinantes	58
Figura 10 – Proteínas recombinantes	60
Figura 11 – Expressão do gene da esterase do hormônio juvenil durante o desenvolvimento pós-embrionário de <i>A. mellifera</i>	66
Figura 12 – Expressão do gene da esterase do hormônio juvenil em operárias adultas.....	68
Figura 13 – Efeito de tratamentos hormonais sobre a expressão do gene da esterase do hormônio juvenil.....	71
Figura 14 – Efeitos do <i>knock-down</i> do gene da esterase do hormônio juvenil sobre os títulos de hormônio juvenil e vitelogenina	75
Figura 15 – Efeitos do <i>knock-down</i> do gene da esterase do hormônio juvenil sobre a expressão de carboxiesterases de <i>A. mellifera</i>	77
Figura 16 – Alinhamento entre seqüências de JHEHs de insetos	79
Figura 17 – Expressão do gene da epóxido hidrolase do hormônio juvenil durante o desenvolvimento pós-embrionário de <i>A. mellifera</i>	84
Figura 18 – Expressão dos genes de degradação do hormônio juvenil em larvas de rainhas e operárias	86
Figura 19 – Influência da alimentação sobre os níveis de transcritos da epóxido hidrolase do hormônio juvenil	88
Figura 20 – Expressão dos genes de degradação do hormônio juvenil em Ovários de larvas de rainhas e operárias	90
Figura 21 – Esquema da síntese de hormônio juvenil.....	92
Figura 22 – Síntese de hormônio juvenil III em insetos	96
Figura 23 – Arquitetura dos genes da via de síntese do hormônio juvenil.....	98
Figura 24 – Arquitetura dos genes codificadores de FPPS	100
Figura 25 – Quantificação de genes da via de síntese do hormônio juvenil em diferentes tecidos de operárias forrageiras.....	104
Figura 26 – Quantificação de genes da via de síntese do hormônio juvenil em nos CA durante o ciclo de vida de <i>Apis mellifera</i>	106
Figura 27 – Efeitos da manipulação da dieta em operárias adultas sobre o metabolismo do hormônio juvenil.....	112
Figura 28 – Taxa de síntese e títulos de hormônio juvenil no quinto intar de operárias e rainhas	125
Figura 29 – Modelo para o processo de diferenciação de castas	137

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Características para classificação de operárias <i>Apis mellifera</i>	19
Tabela II – Enzimas da via de síntese do hormônio juvenil	23
Tabela III – Genes de controle endógeno para quantificação de mRNA.....	34
Tabela VI – Características de carboxiesterases de <i>Apis mellifera</i>	63
Tabela V – Mortalidade de abelhas nos experimentos de RNA de interferência ..	73
Tabela VI – Características das epóxido hidrolases do hormônio juvenil de insetos	82
Tabela VII – Identidade de genes da via de síntese do hormônio juvenil.....	94
Tabela VIII – Análise da região promotora dos genes da via de síntese do hormônio juvenil	109

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

µg	micro gramas
µl	micro litros
nm	nanômetros
20E	20-hidroxicodisona
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA completar ao RNA mensageiro
Ct	ciclo do threshold
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio padrão
dsRNA	RNA dupla fita
E	eficiência
EST	<i>expressed sequence tags</i>
EtBr	brometo de etídeo
g	giros
H ₂ O	água
HJ	hormônio juvenil
InVar	variância intrínseca
KDa	quilo Dalton
LB	meio de cultivo Luria-Bertani
M	molar
mA	miliampéres
mg	miligramas
ml	mililitros
mRNA	RNA mensageiro
°C	graus Celsius
ORF	<i>open reading frame</i>
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
pI	ponto isoelétrico
qRT-PCR	RT-PCR quantitativa
RNA	ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
rpm	rotações por minutos
RT	transcrição reversa
SB	solução bloqueadora
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SqRT-PCR	RT-PCR semiquantitativa
TA	temperatura ambiente
T _m	Temperatura de <i>Melting</i>
V	volts
WB	<i>Western Blot</i>

Ilustração: A. Fagundes; *In*: Freire, 2006.

RESUMO

RESUMO

SANTOS, A. M. Biologia molecular de genes envolvidos no metabolismo do Hormônio Juvenil de *Apis mellifera*. 176p. Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2008.

O Hormônio Juvenil (HJ) é um sesquiterpenóide que participa de diversas funções do ciclo de vida de insetos. Em *Apis mellifera* o HJ está envolvido também com o processo de diferenciação de castas e polietismo etário. Neste trabalho, genes participantes da degradação e das vias de síntese do HJ nos *corpora allata* (CA) foram identificados a partir das seqüências disponibilizadas pelo sequenciamento do genoma de *A. mellifera*. A identificação destes genes baseou-se em análises funcionais, como interferência por RNA fita dupla, similaridade entre seqüências, expressão tecido-específica e busca por motivos conservados. Análises de quantificação dos transcritos destes genes revelaram padrões condizentes com os títulos de HJ e mostraram que o balanço entre as vias de síntese e degradação deste hormônio age em conjunto para regular os títulos de HJ. Uma importante associação entre a degradação do HJ pelas enzimas esterase do HJ e epóxido hidrolase do HJ com o processo de diferenciação dos ovários, que ocorre durante o estágio larval, foi estabelecida. Estas enzimas parecem atuar ativamente na manutenção dos níveis de HJ durante o processo de diferenciação de castas. A alimentação mostrou ser um processo de suma importância sobre o metabolismo do HJ durante a vida adulta de operárias, em adição ao controle exercido pela alimentação já descrito durante o período larval, que leva à diferenciação de castas distintas. A execução deste trabalho contribuiu de maneira significativa para o conhecimento deste sistema instigante que controla toda a homeostasia em uma colônia do inseto social, *Apis mellifera*.

Ilustração: A. Fagundes; *In*: Freire, 2006.

ABSTRACT

ABSTRACT

SANTOS, A. M. Molecular biology of genes involved in *Apis mellifera* Juvenile Hormone metabolism. 176p. Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2008.

The sequiterpenoid, Juvenile Hormone (JH), is a key regulator in many aspects of insect life. In the Honey bee, *Apis mellifera*, JH is additionally involved in caste differentiation and also in age task performance during adult worker life. Herein, we identified genes coding to JH synthesis enzymes pathway in *corpora allata* and degradation in hemolymph and tissues based on sequences from Genome Sequencing Consortium. The identification of those genes involved functional assays as RNA interference, expression levels in specific tissues, search for functional motifs and also similarity among sequences. The results showed that a balance between synthesis and degradation occurs to the maintenance of hemolymph JH titers. An association between JH degradation by the enzymes, JH esterase and JH epoxide hydrolase, and ovary differentiation during larval stage was established. JH degradation showed to act together with the JH synthesis process to maintain the cast-specific titers of JH, which is essential to females' development into castes. The nutrition status in Honey bee adult workers is an important mechanism controlling JH metabolism, in the same way it was observed previously for larvae development. The progress of this work contributed significantly to the knowledge of this amazing social insect life, *A. mellifera*.

Ilustração: A. Fagundes; *In*: Freire, 2006.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 O hormônio juvenil

O Hormônio Juvenil (HJ) funciona como importante fator regulador na embriogênese, no desenvolvimento larval e adulto, na metamorfose, reprodução, diapausa, migração, polimorfismo e metabolismo (Nijhout, 1994; Roe e Venkatesh, 1990; de Kort e Granger, 1996; Hammock, 1985). Todas estas funções tornam o HJ um componente essencial para o entendimento de diversos processos biológicos de insetos.

Em insetos foram descritas seis formas de HJ: HJ-I e II foram identificados em Lepidoptera e o HJ-III na maioria restante dos insetos. HJ-0 e 4-metil-HJ-I parecem ser exclusivos também de Lepidoptera (Figura 1). Em Diptera pode ser encontrada outra forma de HJ: 6,7-epóxido-HJ-III (JHB3) (Schooley e Baker, 1985; Baker et al., 1990).

Figura 1 – Principais tipos de hormônio juvenil. Fonte: Newman et al. (2005)

1.2 A modulação dos títulos de hormônio juvenil

A modulação dos níveis de hormônio juvenil é controlada precisamente pelos processos de síntese, degradação, ligação a proteínas específicas na hemolinfa e secreção.

A regulação da síntese tem sido considerada de extrema importância e um grande número de evidências tem se acumulado a respeito do controle estimulatório (alatotrópico) e inibitório (alatostático) exercido pelo sistema nervoso sobre os *corpora allata* (CA), um par de glândulas localizadas no complexo retrocerebral, órgão de síntese do HJ (Gilbert et al., 2000). A quantidade de HJ na hemolinfa está diretamente relacionada à sua produção pelos CA, uma vez que não são conhecidas informações sobre estocagem neste órgão.

1.2.1 A via de síntese do hormônio juvenil

A síntese de HJ ocorre em uma extensa e complexa via que envolve dois produtos intermediários que foram muito estudados em vertebrados: o mevalonato e o farnesil pirofosfato. Em vertebrados, estes intermediários levam ao produto final, colesterol, molécula de grande interesse devido às suas implicações em doenças cardiovasculares humanas, entre outras. Inúmeras pesquisas já foram dedicadas ao entendimento do processo de síntese e regulação do colesterol resultando em importantes descobertas como a identificação da ação do colesterol como chave reguladora (Goldstein e Brown, 1990) e a descoberta das proteínas de ligação regulatórias de esteróis, que ativam a síntese de lipídeos (Horton, 2002; Rawson, 2003). Insetos, porém, não sintetizam o colesterol (Clark e Bloch, 1959), mas sim os

hormônios juvenis, os únicos sesquiterpenóides que participam da regulação do desenvolvimento.

A rota de produção de HJ envolve a formação de dois importantes precursores, assim como ocorre com a via de síntese do colesterol: o mevalonato, que envolve a ação das enzimas acetoacetyl-CoA tiolase (EC 2.3.1.9), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase (HMG-S) (EC 2.3.3.10) e a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-R) (EC 1.1.1.34). O segundo precursor, o farnesil difosfato, envolve a ação das enzimas mevalonato quinase (EC 2.7.1.36), fosfomevalonato quinase (EC 2.7.4.2), difosfomevalonato descarboxilase (EC 4.1.1.33) e a isopentenil difosfato isomerase (EC 5.3.3.2) (figura 2). A maioria dos dados gerados sobre o funcionamento e regulação destas enzimas se refere aos vertebrados. Em insetos a maioria das seqüências de genes codificadores de enzimas da via de síntese do HJ teve sua predição baseada nas seqüências de vertebrados. A identidade entre as seqüências destes dois grupos encontra-se entre 40 e 60%, para a maioria delas (Bellés et al., 2005).

Figura 2 – Representação esquemática da via de síntese do hormônio juvenil (HJ) de uma célula típica do *corpus allatum* (CA). O controle da síntese do HJ via sistema nervoso central está relacionado a dois neuropeptídeos: a allostatina (controle negativo) e a allostropina (controle positivo) e também às aminos biogênicas. Nos CA, os precursores glicose, acetato e ácidos graxos entram na célula para serem convertidos a acetil-CoA. Ácidos graxos são oxidados via β -oxidação nas mitocôndrias (MT) para a produção de NAD^+ e ATP, necessários no processo de síntese. A conversão de HMG-CoA para mevalonato (pela HMG-CoA redutase), de geranil-PP para farnesil pirofosfato (pela farnesil difosfato sintase) e do metil farnesoato para HJ-III (por uma epoxidase) ocorrem no retículo endoplasmático (RE), todos os demais passos ocorrem no citosol. As enzimas estão mostradas em itálico e todos os intermediários da via em negrito. Os cofatores estão representados em letras claras. Esquema modificado de Tobe e Stay (1985), Gilbert et al. (2002) e Bellés et al. (2005).

1.2.2 A via de degradação do hormônio juvenil

Além da diminuição da síntese de hormônio juvenil em momentos precisos do desenvolvimento, uma intensa atividade hidrolítica retira o HJ de circulação (Hinton e Hammock, 2001). Duas enzimas degradam o HJ, a esterase do HJ (JHE), membro da família das carboxiesterases (EC 3.1.1.1) e a epóxido hidrolase do HJ (JHEH), membro da família das hidrolases (EC 3.3.2.3).

A JHE está presente na hemolinfa e nos tecidos, enquanto a JHEH está ligada a tecidos específicos e primariamente associada à fração microssomal (de Kort e Granger, 1996). A ação catabólica de cada uma destas enzimas produz HJ-ácido e HJ-diol, respectivamente, e sua ação conjunta resulta em HJ-ácido-diol (de Kort e Granger, 1996) (Figura 3); formas que foram consideradas inativas por Hammock (1985), entretanto este cenário está sendo modificado atualmente, mostrando que o HJ-ácido possui atividade metabólica (Ismail et al., 1998; 2000) (Figura 3). Uma terceira enzima foi descrita em *Manduca sexta*, JH-diol kinase (JHDK), cuja função é converter o HJ-diol em HJ-diol-fosfato, um composto inativo (Maxwell et al., 2002a; 2002b).

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

A maioria do conhecimento gerado sobre a degradação do HJ tem se concentrado nos mecanismos de ação da JHE. Pouco se conhece sobre a JHEH,

contudo, esta enzima parece desempenhar algum papel durante o desenvolvimento (Debernard et al., 1998). Lassiter et al. (1995) descreveram um papel importante da JHEH em detrimento a JHE em *Culex quinquefasciatus*. Enquanto, em *Drosophila melanogaster*, ambas parecem ser importantes (Campbell et al., 1992). Em muitos estágios larvais de *Manduca sexta*, a formação de HJ-diol é a maior rota do metabolismo do HJ (Halarankar et al., 1993).

A ação das enzimas JHE e JHEH é influenciada por proteínas que se ligam ao hormônio juvenil e que estariam associadas, teoricamente, a todo o HJ disponível (Touhara e Prestwich, 1994). Em insetos foram descritos três tipos de proteínas de ligação ao hormônio juvenil. A primeira identificada em *M. sexta* foi denominada JHBP (*Juvenile hormone binding protein*) por Kramer et al. (1976). A segunda, uma lipoforina, encontrada na hemolinfa de *Leptinotarsa decemlineata* e posteriormente também identificada em *Periplaneta americana* e *Locusta migratoria* (de Kort e Koopmanschap, 1986; 1987; 1989). A terceira classe dentre as proteínas de ligação ao HJ é uma proteína hexamérica encontrada em *L. migratoria* identificada por Koopmanschap e de Kort (1988). A presença de proteínas específicas que se ligam ao HJ oferece vantagens, estas podem prevenir uma ação inespecífica do HJ ao mesmo tempo em que permitem uma circulação uniforme do hormônio pelo corpo do inseto (Gilbert et al., 2000).

Figura 3 – Representação esquemática da via de degradação do hormônio juvenil (Fonte: Gilbert et al., 2000). O HJ é liberado na hemolinfa, onde se liga a proteínas específicas (JHBp) para que seja transportado pela hemolinfa e alcance os tecidos alvos. O HJ é degradado em momentos específicos do desenvolvimento pela esterase do hormônio juvenil (JHE), presente na hemolinfa, que metaboliza o JH para a forma ácida (HJ-ácido) e pela epóxido hidrolase do hormônio juvenil (JHEH), encontrada principalmente nos tecidos, que converte o HJ para HJ-diols.

1.3 As abelhas *Apis mellifera*

Além de sua importância econômica as abelhas *Apis mellifera* se distinguem como um modelo de polifenismo facultativo e por isso têm recebido especial atenção de pesquisadores, tanto em pesquisas básicas como aplicadas. Nesta espécie um único genótipo pode produzir fenótipos alternativos, dependendo da quantidade e qualidade do alimento que a larva recebe (Rembold e Hanser 1964; Weaver, 1957).

O polifenismo é um caso especial desta plasticidade fenotípica, que se refere à capacidade de organismos com o mesmo genoma se desenvolverem em dois ou mais fenótipos. A existência de tipos morfo-fisiológicos distintos dentro de uma mesma espécie desempenhando funções diferentes e complementares, trazendo benefício mútuo, caracteriza o grupo dos insetos eusociais, cuja organização colonial se baseia na divisão de trabalho e na sobreposição de gerações.

Em uma colônia de *A. mellifera* são encontrados três tipos de indivíduos: zangões, rainhas e operárias, estas, representando as castas. Cada um destes organismos possui funções específicas que permitem à manutenção da colônia. Os machos são produzidos de ovos haplóides, enquanto as fêmeas são diplóides. A rainha detém a atividade reprodutiva e produz feromônios que controlam e organizam diversas funções na colônia. As operárias, fêmeas funcionalmente estéreis, desempenham desde sua emergência uma série de tarefas que obedecem a uma ordem cronológica: limpeza e remoção de cera do ninho, alimentação e cuidado com a prole (abelhas mais jovens); construção, limpeza e aprovisionamento das células das crias, produção de cera, processamento de pólen e néctar para a produção do mel e proteção da colméia (abelhas com idade média) e forrageamento (operárias mais velhas).

1.3.1 Diferenciação de castas em *Apis mellifera*

A produção de fêmeas morfologicamente distintas é uma resposta a estímulos ambientais que ativam cascatas gênicas específicas durante o desenvolvimento larval. O estímulo primário para o processo de diferenciação de castas em *A. mellifera* é a alimentação diferenciada, sendo que as larvas que originarão rainhas recebem geléia real (um tipo de secreção das glândulas hipofaringianas) durante todo o estágio larval; enquanto as larvas que originarão operárias, após o segundo dia larval, passam a receber ao invés de geléia real, uma mistura de mel, pólen e geléia real chamada de “geléia de operárias”.

A alimentação com geléia real é responsável por uma resposta neuroendócrina que estimula o aumento da atividade dos CA (Nijhout e Wheeler, 1982; Wheeler, 1986; Winston, 1987; Rachinsky e Hartfelder, 1990; Hartfelder e Engels, 1998). Este,

considerado o fator endógeno de maior importância para a indução do desenvolvimento de rainhas (Rachinsky, 1994).

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

Operárias e rainhas de *Apis mellifera* possuem características morfológicas, comportamentais e fisiológicas distintas. Operárias não apresentam comportamento de acasalamento, apesar de possuírem ovários funcionais e poderem efetuar postura de ovos não fecundados em condições especiais (Michener, 1974; Robinson et al., 1992; Ratnieks, 1993; Barron et al., 2001). As rainhas não desenvolvem estruturas especializadas para coleta e processamento do pólen, papel exercido com alta eficiência pelas operárias (Michener, 1969).

Em relação ao sistema reprodutor as diferenças morfológicas entre castas podem ser observadas nos ovários e na espermateca. A espermateca é mais desenvolvida em rainhas e atrofiada ou reduzida em operárias (Snodgrass, 1974), diferença que já pode ser observada na fase pupal (Silva, 2005). O número de ovariolos dos ovários de rainhas adultas é muito superior ao de operárias (Snodgrass, 1974). A diferenciação casta-específica dos ovários ocorre durante o estágio larval e é controlada

através da ação conjunta do HJ e ecdisteróides (Goewie e Beetsma, 1976; Cnaani et al., 1997; Dedej et al., 1998). O HJ influencia os processos de proliferação celular (Schmidt-Capella e Hartfelder, 1998; 2002) e de morte celular programada (Rembold, 1987; Kimura e Trumam, 1990; Rembold et al., 1992; Schwartz et al., 1993; Hartfelder e Engels, 1998; Hartfelder et al., 2002; Reginato e Cruz-Landim, 2002), sendo os ecdisteróides responsáveis por um padrão casta-específico de síntese de algumas proteínas de baixo peso molecular e pelo desenvolvimento diferencial dos ovários (Hartfelder et al., 1995). Nas rainhas, o elevado título de HJ, previne o processo de morte celular nos ovários e estimula a glândula protorácica, promovendo um aumento nos títulos de ecdisteróides (Rembold, 1987; Rachinsky et al., 1990; Rembold et al., 1992; Rachinsky e Engels, 1995). A decisão crítica para a diferenciação dos ovários ocorre rapidamente após a última muda larval, quando os ovários de operárias exibem sinais de morte celular, ao contrário do que ocorre com os ovários de rainha (Hartfelder e Steinbrück, 1997).

O processo de diferenciação dos ovários em *A. mellifera* culmina em rainhas adultas com ovários possuindo 150-180 ovários, enquanto operárias adultas possuem apenas 4-7 ovários por ovário (Snodgrass, 1974).

1.3.2 Títulos de hormônio juvenil e ecdisteróides em *Apis mellifera*

O HJ-III é o único hormônio juvenil presente em *A. mellifera* (Trautmann et al., 1974; Huang et al., 1991). A makisterona A é o principal ecdisteróide presente na hemolinfa desta espécie (Feldlaufer et al., 1985; Rachinsky et al., 1990), embora, 20-hidroxiecdisona (20E) seja o principal ecdisteróide presente na maioria dos insetos (Robinson et al., 1991).

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

Dois picos de HJ são observados durante o estágio larval de *A. mellifera*, sendo maiores em rainhas do que em operárias (Figura 4). O primeiro pico ocorre entre o segundo e o terceiro estágio, como observado por Beetsma (1979) e Rembold et al. (1992). O segundo pico de HJ ocorre no quinto estágio larval, no qual a diferença nos títulos deste hormônio é considerada casta-específica (Rachinsky e Hartfelder, 1990; Rachinsky et al., 1990; Hartfelder et al., 1995; Rachinsky e Engels, 1995), pois é nesta fase em que são estabelecidas as principais diferenças entre rainhas e operárias. Após a operculação das células de cria pelas operárias, os títulos de HJ em rainhas e operárias no estágio pré-pupal apresentam o mesmo perfil, sendo mais baixos nas operárias (Rachinsky e Hartfelder, 1990). Na fase adulta altos níveis de HJ estão associados com períodos de atividade de vôo em rainhas, operárias e também nos zangões (Robinson et al., 1991); a única diferença é que os vôos em rainhas e zangões ocorrem mais cedo na vida adulta e estão associados com as atividades de cópula (Robinson et al., 1991; Giray e Robinson, 1996; Tozetto et al., 1997). No caso das operárias o início da atividade de vôo incluir atividade de reconhecimento e forrageamento, estes controlados por um mecanismo denominado polietismo etário (Fluri et al., 1982; Robinson, 1987; Robinson et al., 1987; Huang et al., 1991).

Os ecdisteróides apresentam dois picos ao longo do desenvolvimento pós-embrionário, sendo que o primeiro pico ocorre no final do quinto estágio larval e o segundo no estágio pupal. Este último o pico em rainhas é mais precoce em relação ao

das operárias (Figura 5). Durante o final do desenvolvimento pupal e os primeiros dias de vida após a emergência, os títulos de ecdisteróides diminuem e permanecem relativamente baixos nas duas castas (Feldlaufer et al., 1985; Hartfelder et al., 2002).

Figura 4 - Título do hormônio juvenil ao longo do desenvolvimento e na emergência de operárias, rainhas e zangões de *Apis mellifera* até a emergências das abelhas (modificado de Rembold, 1987; Rachinsky et al., 1990). Estes dados foram organizados através de trabalhos empregando diferentes metodologias, assim, os valores devem ser considerados relativos. Fases: L2-3 (larva de segundo e terceiro estágio), L5F (larva no quinto estágio em fase de alimentação, subdivisões: F1, F2 e F3), L5S (larva em fase de tecelagem do casulo, subdivisões: S1, S2 e S3), PP (pré-pupa, subdivisões: PP1, PP2 e PP3).

Figura 5 - Título de ecdisteróides ao longo do desenvolvimento e na emergência de operárias, rainhas e zangões de *Apis mellifera* (modificado de Rachinsky et al., 1990, Feldlaufer et al., 1985 e Pinto et al., 2002). Estes dados foram organizados através de trabalhos empregando diferentes metodologias, assim, os valores devem ser considerados relativos. Fases: L2-3 (larva de segundo e terceiro estágio), L5F (larva no quinto estágio em fase de alimentação, subdivisões: F1, F2 e F3), L5S (larva em fase de tecelagem do casulo, subdivisões: S1, S2 e S3), PP (pré-pupa, subdivisões: PP1, PP2 e PP3).

Ilustração: A. Fagundes; *In*: Freire, 2006.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Resultados divulgados ao longo de décadas deixaram cada vez mais claro o papel central do Hormônio Juvenil na regulação do desenvolvimento dos insetos, reprodução, comportamento e ainda na determinação de castas nos insetos sociais e em particular em *Apis mellifera*, organismo alvo deste trabalho. No entanto, dados sobre o metabolismo do HJ, processos de síntese e degradação, ainda são raros em abelhas. Com o objetivo de contribuir para este conhecimento identificamos genes codificadores de enzimas participantes das vias de síntese do HJ nos *corpora allata*, órgão responsável pela síntese e liberação deste hormônio, bem como as de degradação, processo que ocorre preferencialmente na hemolinfa e nos tecidos. Estes genes foram analisados no contexto biológico e comparados aos títulos de hormônio juvenil durante o ciclo de vida da abelha.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar genes envolvidos no processo de síntese do hormônio juvenil a partir das seqüências disponibilizadas pelo projeto de sequenciamento do genoma de *Apis mellifera*;
2. Identificar genes envolvidos no processo de degradação do hormônio juvenil a partir das seqüências disponibilizadas pelo projeto de sequenciamento do genoma de *Apis mellifera*;
3. Realizar análises *in silico* das seqüências identificadas em busca de sítios catalíticos e regiões conservadas das enzimas preditas, bem como da região promotora dos genes;

-
4. Analisar a expressão de genes codificadores de enzimas da via de síntese do HJ no local de produção deste hormônio, *corpus allatum*, em momentos específicos do ciclo de vida das abelhas melíferas;
 5. Analisar a expressão de genes codificadores de enzimas de degradação do HJ durante o desenvolvimento pós-embrionário de abelhas;
 6. Analisar o efeito de aplicação exógena de hormônios morfogenéticos sobre os genes de degradação do HJ;
 7. Produzir anticorpos contra as enzimas de degradação do HJ: JHE e JHEH em coelhos, utilizando como antígeno a sequência parcial destas proteínas produzidas *in vitro* em células em bactérias;
 8. Detectar a JHE e JHEH de *Apis mellifera* utilizando anticorpos para tais proteínas durante o ciclo de vida de abelhas melíferas;
 9. Analisar os efeitos da interferência por RNA de dupla fita sobre a expressão do gene da esterase do HJ (JHE) e seu reflexo sobre os títulos de HJ nas abelhas adultas;
 10. Analisar os efeitos da alimentação em abelhas operárias adultas sobre a expressão dos genes da via de síntese e degradação do HJ;
 11. Analisar os efeitos da manipulação do alimento durante o período larval, momento crítico para o desenvolvimento das castas, sobre os níveis de JHEH.

Ilustração: A. Fagundes; *In*: Freire, 2006.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Este estudo foi realizado utilizando-se abelhas *A. mellifera*, africanizadas, do apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. As fases do desenvolvimento de operárias e rainhas foram identificadas segundo Michelette e Soares (1993) e Rembold et al. (1980), respectivamente. As características de rainhas foram uma adaptação dos dados de Rembold et al. (1980) para abelhas européias para as nossas condições (abelhas africanizadas). As características para identificação de operárias estão na tabela I.

Para a obtenção de operárias adultas com idade conhecida, as recém emergidas foram marcadas com caneta atóxica e devolvidas para as colônias de origem, sendo coletadas nas idades desejadas.

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

TABELA I – Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval e pupal de operárias de *Apis mellifera*. A duração dos estágios larvais durante o desenvolvimento preimaginal refere-se às horas após eclosão (modificado de Michelette e Soares, 1993). CTT: comprimento tíbia-tarso.

FASE		CARACTERIZAÇÃO	DURAÇÃO (horas)
Ovo		Embriões de 0 a 72 horas	72
L1		Larva de primeiro instar peso – 0,0001 a 0,0003 g	0-20
L2		Larva de Segundo instar peso – 0,0003 a 0,001 g	20-35
L3		Larva de terceiro instar peso – 0,0015 a 0,004 g	35-55
L4		Larva de quarto instar peso – 0,004 a 0,0248 g	55-80
L5	F1	Larva de quinto instar em fase de alimentação	peso – 0,029 a 0,06 g
	F2		peso – 0,06 a 0,11 g
	F3		peso – 0,11 a 0,16 g
	S1	Larva de quinto instar em fase de tecelagem do casulo	intestino cheio
	S2		intestino semi-cheio
	S3	(célula operculada)	intestino vazio
			130-145
PP1		Larva de quinto instar em estágio de pré-pupa	CTT - 1,4 a 1,99 mm
PP2			CTT - 2,0 a 2,6 mm
PP3			CTT - > 2,6 mm
Pw		pupa de olho branco (white)	145-160
Pp		pupa de olho rosa (pink)	160-180
Pdp		pupa de olho rosa-escuro	180-190
Pb		pupa de olho marrom (brown)	190-230
Pbl		pupa de olho marrom, com pigmentação leve no tórax	230-250
Pbm		pupa de olho marrom, com pigmentação torácica intermediária	250-265
Pbd		pupa de olho marrom com pigmentação torácica forte	265-305
RE		Operária recém-emergida com menos de 24 horas de vida	265-305
			305-330
			330-370
			370-390
			-

3.1.1 Dissecção do material biológico

As amostras de *corpora allata* (CA) coletadas para extração com o uso do reagente Trizol® constituíam em *pools* de 25 pares desta glândula, neste caso a dissecção ocorreu em solução salina 0,9% esterilizada. Após a coleta, os CA foram colocados diretamente em reagente TRIzol® (Invitrogen) e congelados em *freezer* (-80°C) até o momento da extração do RNA. Amostras de CA coletadas para extração de RNA total com o Kit *GenElute* constituíam em *pools* de 8 pares de CA dissecados em Ringer para insetos. Neste caso, os CA foram colocados em tubo contendo 50 µl de meio de cultivo para insetos (Rachinsky e Hartfelder, 1998), congelados imediatamente em nitrogênio líquido e mantidos em *freezer* (-80°C) até o momento da extração do RNA.

Para obtenção dos ovários, larvas de rainhas e operárias foram dissecadas em solução salina 0,9% esterilizada. Os ovários foram coletados, lavados exaustivamente em salina e colocados em reagente TRIzol®. Para cada amostra foram coletados de 10 a 20 pares de ovários, dependendo da fase e casta. Os demais tecidos utilizados, corpo gorduroso e cérebro, seguiram o mesmo protocolo, sendo utilizados *pools* de 10 indivíduos.

3.1.2 Coleta de hemolinfa

A hemolinfa foi coletada com auxílio de um microcapilar a partir de uma pequena incisão lateral entre o 2º e o 3º segmento abdominal de abelhas adultas, ou pela perfuração do tegumento no estágio larval. Durante o tempo de coleta as amostras de hemolinfa permaneceram em gelo, sendo adicionada ao tubo uma pitada de PTC

(*phenylthiocarbamid*) para inibir a melanização da hemolinfa. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7500 rpm por 5 minutos à 8°C, para descarte de células contaminantes provenientes do corpo gorduroso ou hemócitos da própria hemolinfa.

3.2 Análise dos genes de interesse

3.2.1 Identificação do gene da epóxido hidrolase do hormônio juvenil

O primeiro fragmento correspondente ao gene da epóxido hidrolase do hormônio juvenil (JHEH) foi obtido em reações de amplificação por PCR utilizando-se *primers* degenerados: JHEHP1-F e JHEHP2-R (para as seqüências ver Tabela I - Anexo I). Estes *primers* foram desenhados a partir do consenso de quatro seqüências de insetos depositadas no GenBank: *Bombyx mori* (AY377854), *Drosophila melanogaster* (NM176233), *Ctenocephalides felis* (AF503908) e *Aedes aegypti* (AY212033). As condições de PCR foram: 94 °C por 2 minutos; 45 ciclos de 94°C – 45 segundos, 45°C – 45 segundos e 72°C – 1 minuto; seguido de extensão final por 72°C – 7 minutos. Após eletroforese o fragmento foi isolado, clonado, seqüenciado e utilizado para comparações com outras seqüências de insetos do mesmo gene. O fragmento de 260 pb isolado foi utilizado para obtenção da seqüência de predita do gene, correspondente ao cDNA, usando o programa BLASTN e seqüências preditas obtidas a partir do genoma de *A. mellifera* (Honey Bee Genome Assembly, version Amel_pre_release2OGS). O gene usado neste trabalho para as análises *in silico* foi predito automaticamente pelo método de análise, GNOMON. A seqüência de cDNA predita corresponde a 1662 pb (número de acesso no GenBank: XM_394922) e a respectiva proteína a 446 aminoácidos (número de acesso no GenBank: XP_394922).

3.2.2 Análises de seqüências candidatas à esterase do hormônio juvenil

O banco de dados de *A. mellifera* (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>) foi utilizado para procura de possíveis seqüências codificadoras do gene da JHE utilizando as seqüências de *Drosophila melanogaster* (número de acesso no *GenBank*: **AAK07833**) e *Heliothis virescens* (número de acesso no *GenBank*: **AAL41023**) como “queries” e programa BLASTN. O *status* de esterase das seqüências preditas foi confirmado por análise de melhor *match* contra seqüências do *GenBank* e pela presença de motivos catalíticos de esterase-lipases. A função de cada uma das esterases identificadas foi determinada de acordo com Claudianos et al. (2006).

3.2.3 Análise de genes da via de síntese do hormônio juvenil

Os genes da via de síntese do hormônio juvenil foram preditos utilizando a base de dados proveniente das anotações do genoma de *A. mellifera* (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>). Para tanto foram utilizadas as seqüências de genes envolvidos na síntese de HJ descritas para *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster* obtidas a partir de Noriega et al. (2006), como “queries” para as buscas (Tabela II). As seqüências que obtiveram o melhor *score* foram submetidas à procura de domínios funcionais, usando banco de dados universal, uma vez que a maioria destas seqüências é conservada desde insetos até mamíferos. Após confirmação dos domínios pelo programa *NCBI Conserved Domain* as seqüências foram utilizadas para análises de quantificação gênica.

Tabela II – Enzimas da via de síntese do hormônio juvenil. Os números de acesso no *GenBank* dos ortólogos em *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster*, assim como o gene predito em *A. mellifera* e o respectivo *e-value* fornecido pelas análises.

Enzima	Função	E.C.	<i>Anopheles gambiae</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Ortólogo em <i>A. mellifera</i>	<i>e-value</i>
Acetoacetil CoA tiolase	Condensa 2 moléculas de Acetil-CoA	2.3.1.9	XP_321828	NP_612094	GB12956	2e-78
Hidroximetilglutaril-CoA sintase	Condensa Acetoacetil-CoA + acetil-CoA	2.3.3.10	XP_315872	NP_725570	GB12497	e-169
Hidroximetilglutaril-CoA redutase	Reduz HMG-CoA para mevalonato	1.1.1.34	XP_307890	NP_996271	GB18242	0.0
Mevalonato kinase	Fosforila mevalonato	2.7.1.36	XM_319701	NM_176158	GB14701	1e-30
Fosfomevalonato kinase	Fosforila fosfomevalonato	2.7.4.2	XP_310779	Q9VIT2	GB11982	6e-40
Difosfomevalonato descarboxilase	Descarboxila MPP para IPP	4.1.1.33	-	-	-	-
Isopentenil-difosfato delta-isomerase	Isomerização de IPP para DMAPP	5.3.3.2	XM_321388	NP_650962	GB18308	5e-30
Farnesil difosfato sintase (preniltransferase)	Condensação seqüencial de IPP com DMAPP e depois GPP para formar FPP	2.5.1.1/10	XP_308653	NP_477380	GB12385 GB12859 GB11866 GB15337 GB10756 GB19361 GB18623	4e-76 4e-69 3e-63 8e-54 2e-51 1e-37 4e-04
Prenil-difosfatase	Hidroliza FPP para farnesol	3.1.7.1	EAA01914	-	-	-

Tabela II – continuação

Desidrogenase de cadeia curta	Oxidação de farnesol para farnesal?	-	XM_556135	NM_132467	GB12522	5e-57
Ácido farnesóico <i>O</i> -metiltransferase homóloga a crustáceos (FAMeT)	Função não está clara em insetos, em crustáceos converte ácido farnesóico em metil farnesoato	-	XP_318631	NP_611544	GB20002	2e-94
Metiltransferase do HJ-ácido (JHAMT) ortólogo à <i>Bombyx mori</i>	Transfere grupo metil de AdoMet para ácido farnesóico	-	XP_314173	NP_609793	GB10517	
Metil farnesoato epoxidase (CYP15)	Oxidação de MF para JH III	-	XP_315675	NP_649151	GB15634	4e-80
Citrato (<i>si</i>)-sintase	Síntese de citrato na mitocôndria	2.3.3.1	XM_320478	-	GB12573	0.0
Proteína de transporte do citrato na mitocôndria	Transporte de citrato da mitocôndria para o citosol	-	XP_308964	NP_727450	GB17499 (1) GB15259 (2)	e-141 e-120
ATP citrato liase	Síntese de acetil-CoA a partir de citrato	2.3.3.8	XM_319323	-	GB10992	0.0
Metionina adenosil transferase	Síntese de S-adenosil-L-metionina (AdoMet)	2.5.1.6	XM_307861	M_164362	GB15781	e-132
Adenosilhomocisteinase	Hidrolise de S-adenosil-L-homocisteína (AdoHci)	3.3.1.1	XM_311257	NM_078609	GB14324 (1) GB15919 (2)	0.0 e-116
Adenosil kinase	Fosforilação de adenosina	2.7.1.20	XM_307001	NM_168532	GB13063	e-110

3.2.4 Desenho de primers

Para a confecção dos *primers* foi utilizada a ferramenta *online Primer3* (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>), evitando-se sempre pares de *primers* com alta probabilidade em formar dímeros. Todos os *primers* confeccionados foram submetidos à comparação com as seqüências preditas pelo genoma de *A. mellifera* (*Official Gene Set*) descartando-se *primers* que pareavam aleatoriamente com 15 ou mais pares de bases no genoma. As seqüências dos *primers* utilizados neste trabalho estão disponibilizadas na tabela I em Anexo.

3.2.5 Análises *in silico*

As coordenadas de ESTs, ORFs e sítios putativos de *splicing* dos genes estudados foram feitas utilizando a plataforma *Artemis* 7.0 (Rutherford et al., 2000) e como base de dados as seqüências de DNA da versão *Amel* 4.0 do genoma de *A. mellifera*.

As características das seqüências de proteínas preditas deste trabalho foram analisadas através de ferramentas *online*, como descrito a seguir. O peso molecular das proteínas e a estimativa do ponto isoelétrico (pI), quando necessários, foram calculados utilizando o programa *PROTCALC* (<http://www.justbio.com/protcalc/index.php>). As análises de domínios conservados foram feitas utilizando o programa BLASTN contra o banco de dados de domínios de proteínas do *GenBank* (NCBI *Conserved Domain Search*). A presença de peptídeo sinal e motivos transmembrana foram analisados pelos programas *SignalP 3.0 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e *TMpred* (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html), respectivamente.

Os ortólogos putativos foram alinhados utilizando programa *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). O alinhamento múltiplo resultante foi utilizado como *input* para o programa BOXSHADE (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) para as indicações de resíduos similares.

As análises das regiões promotoras foram realizadas com metodologia descrita por Cristino et al. (2006). O banco de dados de regiões de controle gênico foi gerado das seqüências do *Official Set annotation* iniciando-se na região 5'terminal da ORF de cada gene. As regiões analisadas foram até 1,5 Kb acima do início das ORFs.

3.3 Metodologia para análise de RNA e DNA

3.3.1 Obtenção do RNA total

A extração de RNA foi feita utilizando duas metodologias diferentes: (1) reagente TRIzol® (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento de RNA total, Invitrogen) e (2) Kit *GenElute™ Mammalian Total RNA Kit* (Sigma) para extração de RNA de tecidos ou amostras contendo poucas células. O protocolo de extração para o reagente TRIzol foi aquele recomendado pelo fabricante. Para tecidos contendo excesso de gordura (no caso de larvas de quinto instar e amostras de CG) foi feita uma lavagem extra com clorofórmio, seguindo sugestão do fabricante. O RNA obtido foi ressuspendido em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1%. Para os experimentos envolvendo apenas extração de CA, foi utilizado o Kit *GenElute™ Mammalian Total RNA Kit* (Sigma), seguindo as instruções do fabricante, para extração de RNA total e oito pares de CA equivalentes por amostra. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro (Cecil 3000) a 260 nm. Cada

unidade de absorbância foi considerada como 40 µg/ml de RNA. As amostras foram estocadas em freezer – 80°C.

3.3.2 Confecção de cDNA

O cDNA foi produzido a partir de 1µg de RNA total, exceto nos experimentos de quantificação de transcritos em amostras de CA, cujo volume total de RNA extraído foi utilizado nas reações de produção de cDNA. Anteriormente à síntese do cDNA, o RNA foi tratado com DNase (*RQ1 Rnase-Free Dnase*, Promega) por 1 hora a 37°C e em seguida a 70°C por 15 minutos, para a inativação da enzima. A síntese de cDNA foi feita utilizando-se o sistema de síntese 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 posteriormente por PCR com o uso de *primers* específicos.

3.3.3 Eletroforese de RNA em condições desnaturantes

Para confirmação da integridade do RNA extraído foi utilizada eletroforese em condições desnaturantes. A detecção do RNA foi feita utilizando de 5 a 10 µg de RNA total que foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2 %, em condições desnaturantes [0,48 g de agarose, 0,8 ml de formaldeído 37%, 4 ml de tampão 10x MOPS (10,46g MOPS; 1,025g citrato de sódio; 5 ml EDTA 0,5M; H₂O-DEPC para 500 ml; pH 7,0) e H₂O tratada com DEPC (0,1%) para um volume final de 40 ml]. Após eletroforese, o gel foi corado em solução contendo EtBr por 10 minutos, visualizado em luz ultravioleta e fotografado.

3.4 Clonagem e sequenciamento

3.4.1 Preparo das células competentes

As células de *Escherichia coli* utilizadas correspondiam às linhagens: BL21 (DE3) Rosetta (experimentos de expressão de proteínas *in vitro*), cedida gentilmente pela Dr^a Maria Helena Goldman (Depto. Biologia – FFCLRP/USP) ou DH5 α (experimentos de clonagem e sequenciamento). Para o preparo das células 5 ml de meio LB foram inoculados com as células provenientes do estoque (-80°C) e incubados por 12 horas a 37°C e agitação de 250 rpm. A seguir, 200 μ l deste cultivo foram utilizados para inocular 50 ml de meio LB e incubados a 37°C e 210 rpm, sendo realizadas leituras periódicas em espectrofotômetro a 595 nm até que fosse obtida uma densidade óptica de 0,5. O cultivo era incubado em gelo por 30 minutos, posteriormente transferido para tubos *Corex* e centrifugado a 6.000 rpm por 5 minutos (4°C); o *pellet* foi ressuscitado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* em 5 ml de solução CaCl₂ 0,1M. Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada a 6.000 rpm por 5 minutos (4°C) e o *pellet* ressuscitado em 5 ml de CaCl₂ 0,1M - 15% de glicerol. Esta suspensão contendo as células era aliquoteada em tubos de crioproteção, congelada rapidamente em nitrogênio líquido e estocada em freezer -80°C até o momento da transformação. No caso da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta o antibiótico cloranfenicol (34 mg/ml) foi adicionado ao meio de cultivo.

3.4.2 Clonagem de genes em vetores comerciais para sequenciamento

Este protocolo foi utilizado para clonagem do primeiro fragmento referente ao gene codificador da JHEH de *A. mellifera*. O fragmento amplificado, com peso

molecular esperado, foi recortado do gel de agarose 1%, purificado com o uso de colunas de extração (QIAquick Spin - QIAGEN) e ligado em plasmídeo (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen). A solução de ligação, contendo os plasmídeos recombinantes, foi usada para transformar quimicamente células competentes de *E. coli* DH5 α .

3.4.3 Transformação bacteriana

Uma solução contendo os plasmídeos foi adicionada ao tubo contendo as células competentes e incubado por 30 minutos no gelo. As células foram submetidas a choque térmico de 42°C por 30 segundos. A seguir, foram adicionados 250 μ l de meio LB ao tubo, que foi incubado à 37°C por 1 hora sob agitação (210 rpm). Após transformação utilizando-se plasmídeos TOPO, as células foram plaqueadas em meio LB-ágar (1,5%), contendo Ampicilina (100 μ g/ml), X-Gal (5-Bromo-chloro-3 indolyl-B-D-Galactoside; 4 μ g/ml) e IPTG (isopropylthio-B-D-galactoside; 4 μ g/ml) e em seguida, incubadas em estufa a 37°C por 12-16 horas. As células para transformações das soluções de recombinação do Kit *Gateway* foram plaqueadas em meio LB contendo Kanamicina (100 μ g/ml), Ampicilina (100 μ g/ml) ou Cloranfenicol (34 mg/ml).

3.4.4 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA foi utilizado para checagem das seqüências amplificadas previamente às análises de quantificação de mRNA. Este procedimento foi utilizado para checagem da amplificação específica dos genes da farnesil difosfato sintase (*fpps*), e para checagem dos clones utilizados nos experimentos de produção *in vitro* de proteínas recombinantes. As colônias de bactérias selecionadas, contendo o

inserto, foram inoculadas em meio LB líquido, contendo o antibiótico adequado, em tubos *Falcon* e incubadas em estufa a 37°C e 180 rpm por 12-16 horas. Os plasmídeos destas células foram extraídos (*QIAprep Miniprep* – QIAGEN); e em seguida verificados quanto à presença do gene de interesse. Esse procedimento foi feito utilizando digestão com enzimas de restrição adequadas (*Eco RI*, no caso de plasmídeos TOPO) ou checagem por PCR (no caso do plasmídeo pDONR221) com *primer* universal M13 e *primers* específicos dos genes de interesse, seguido por gel de agarose 1% corado com EtBr. Após verificação, os plasmídeos foram utilizados para sequenciamento pelo método de *Sanger*, usando-se um seqüenciador ABI PRISM 310, após reação com *DNA Sequencing Kit, BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction* – ABI PRISM (Applied Biosystems) e *primers* universais: M13F (5'-CGACGTTGTAAAACGGCCAGT-3') e M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3').

3.4.5 Sequenciamento utilizando produto de PCR como molde

Este procedimento foi realizado utilizando o DNA proveniente de PCR após purificação utilizando reagente *MinEluteTM PCR purification Kit* (QIAGEN). Este protocolo foi utilizado com a finalidade de confirmar as seqüências amplificadas pelos *primers* referentes aos genes da via de síntese do HJ para utilização posterior em análises de quantificação da expressão gênica. A reação de sequenciamento foi feita pelo método descrito no item anterior e *primers* específicos (*forward* ou *reverse*) para cada gene, os mesmos *primers* utilizados para a primeira amplificação (ver Tabela Anexo I).

3.5 Quantificação dos níveis de transcritos

3.5.1 RT-PCR semiquantitativa

A técnica de RT-PCR semiquantitativa (SqRT-PCR) foi utilizada quando os resultados eram claramente visualizados em gel de agarose 1% sem a necessidade de uma técnica mais sensível. As amplificações foram feitas nas seguintes condições: 94 °C por 2 minutos, *n* ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 7 minutos. Todos os *primers* para análises de quantificação por SqRT-PCR foram desenhados com temperatura de *Melting* (*T_m*) de 60°C, exceto os referentes ao gene da JHE (GB15327), cuja temperatura de pareamento era de 52°C. Em todos os casos foi utilizada a mesma mistura de reação: 7,4 µl de água *Milli-Q* autoclavada; 10µl de *Master Mix* (2X; Promega); 0,8 µl de cada *primer* (*forward* e *reverse*) de uma solução estoque a 10 pmol e 1µl de cDNA. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em géis de agarose 1% em tampão 1xTBE (89mM Tris base; 89mM ácido bórico; 2mM EDTA; pH 8,0) que foram corados com uma solução de EtBR (0,5µg/ml de gel) e fotografados. Para cada par de *primers* utilizado foi escolhida a melhor condição de amplificação.

3.5.2 RT-PCR quantitativa em tempo real

Os experimentos para quantificação relativa da expressão dos genes de interesse por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) foram realizados utilizando-se metodologia *SYBR® Green* em um aparelho de PCR em tempo real (*7500 Real Time PCR*, Applied Biosystems). A reação de amplificação foi feita utilizando-se 20µl de

volume final, sendo: 10µl de *SYBR Green PCR Master Mix* (2x) (Applied Biosystems); 0,8µl de cada *primer* (*forward* e *reverse*) de uma solução estoque de 10pmol; 7,6 µl de água *Milli-Q* autoclavada esterilizada e uma alíquota de 1µl do cDNA pré-sintetizado. O “*threshold*” e a linha de base foram ajustados automaticamente pelo sistema. Os valores de Ct foram transformados em valores de quantificação usando o método comparativo de Ct de acordo com Applied Biosystems (user bulletin #2).

3.5.3 Qualidade dos *primers* e das amostras

Para as análises da eficiência dos primers foi montada uma curva padrão para cada um dos pares de *primers* utilizando diluições seriadas de cDNA (sem diluição; 1:10; 1:100; 1:1000 e 1:10000). Os valores de eficiência da PCR (E) foram calculados para cada gene individualmente a partir do valor obtido de *slope* após reações de curva padrão e utilizando a fórmula: $E = 10^{-1/\text{slope}}$.

A integridade do RNA foi confirmada por eletroforese em condições desnaturantes, sendo utilizadas as amostras que apresentaram uma banda de RNA ribossomal intensa e nenhum rastro. A integridade das amostras (alíquotas de cDNA) foi investigada através do coeficiente de variância intrínseca (InVar) para a expressão de cada amostra (*BestKeeper*; Pfaffl et al., 2004). O InVar das amostras dos genes de controle endógeno deve apresentar uma baixa variância de Ct, assim como um baixo nível de *x-fold*, indicando uma boa integridade do RNA e do cDNA. A remoção de uma amostra é recomendada quando um valor três vezes maior ou menor é encontrado (Pfaffl et al., 2004).

Para assegurar a amplificação de apenas um único fragmento e a ausência de contaminação de DNA genômico foram utilizadas as análises de dissociação das curvas

do gene de controle endógeno, *rp49*, foram utilizadas. No caso de contaminação com DNA genômico dois picos de dissociação seriam visualizados, pois, os *primers* para *rp49* flanqueiam um íntron, e um fragmento de 240 pb e 78°C de temperatura de Melting (T_m) seria esperado quando amplificado em DNA genômico, enquanto um fragmento de 150 pb e $T_m=76^\circ\text{C}$ era esperado em amplificações a partir do cDNA. Sempre que possível os *primers* para amplificação dos genes de interesse foram desenhados flanqueando um íntron.

3.5.4 Análise dos genes de controle endógeno

Para a escolha do gene de controle endógeno para as análises de quantificação de transcritos nos CA foi utilizado o programa *BestKeeper*. Esse *software* utiliza valores de C_t e os valores da eficiência da PCR para determinar o melhor padrão e os combina em um *index*. Os genes pré-selecionados para as análises estão mostrados na tabela III. O *software* analisa dados de estatística descritiva dos valores de C_t para cada gene de referência: média geométrica, média aritmética, valores máximos e mínimos, desvio padrão e coeficiente de variância. As análises usando estatística descritiva incluem o valor máximo e mínimo de expressão das amostras individuais contra a média geométrica e calculam um desvio padrão. Os valores são corrigidos via eficiência da PCR. A estabilidade do gene de controle endógeno é baseada nas variações calculadas, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação. Valores de DP maiores que 1 podem ser considerados inconsistentes e assim, a exclusão do gene é recomendada, inclusive para o cálculo do *index*. Os genes de controle endógeno podem ser ordenados do mais para o menos estável, sendo possível, então, a escolha do melhor gene de referência.

Um estudo mais detalhado dos genes contidos na Tabela III foi realizado por Lourenço et al. (2008) em *A. mellifera*. Neste trabalho, os quatro genes testados foram considerados eficientes como genes de controle endógeno. Contudo, os autores concluíram que cada um dos genes testados poderia ser usado, no entanto em situações diferentes, e que para uma melhor normalização mais de um gene deve ser utilizado em cada situação, ou ainda, os quatro genes devem ser testados para cada situação biológica específica e um deles pré-selecionado para a normalização utilizando programas específicos para este fim: BestKeeper© (Pfaffl et al., 2004), geNorm™ (Vandesompele et al., 2002) ou Normfinder© (Andersen et al., 2004).

Tabela III – Descrição dos genes utilizados como controle endógeno nos experimentos de RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) e semiquantitativa (SqRT-PCR).

Gene	Símbolo	Número de acesso	Tamanho do amplicon (pb)	Função
Actina	<i>act</i>	AB023025	156	Proteína estrutural de citoesqueleto
Proteína ribossomal 49	<i>rp49</i>	AF441189	150	Constituinte estrutural do ribossomo
Fator de alongação 1-alfa	<i>ef1-α</i>	NM_001014993	154	Alongação durante a síntese de polipeptídeos no ribossomo
Fator de associação à TBP	<i>tbp-af</i>	XM_393492	149	Fator de associação à TAF 10 RNA polimerase II, ligação à proteína TATA box (TBP)

3.6 Metodologia para análise de proteínas

3.6.1 Extração de proteínas utilizando reagente Trizol

Proteína total dos CA para as análises por *Western Blot* nos CA foi extraída utilizando-se o reagente TRIzol® seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, as proteínas foram dosadas utilizando-se Ácido Bicinconínico (Smith et al., 1985), método indicado para amostras dissolvidas em solução contendo SDS (*sodium dodecyl sulfate*). Para determinação da concentração de proteína em cada amostra foi construída uma curva padrão utilizando-se albumina sérica bovina (BSA), as leituras foram realizadas em espectrofotômetro Cecil 3000, a 562 nm.

3.6.2 Extração de proteínas do corpo gorduroso e hemolinfa

As amostras de hemolinfa foram coletadas de acordo com o item 3.1.2. As amostras de corpo gorduroso (CG) foram coletadas em Ringer para insetos e homogeneizado em solução de lise (1,5 ml de solução 150mM de NaCl 1N; 500 µl de solução Tris-HCl 50 mM pH 7,4; 500 µl de solução de Lisozima 10mg/ml; 7,5 ml de água destilada), centrifugado a 12000 rpm por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi utilizado como amostra. A quantificação foi feita utilizando metodologia Bradford (1976).

3.6.3 Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para eletroforese de proteínas foram utilizadas amostras de proteína dissolvida em tampão Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8, contendo 70% de sacarose, 0,25% de SDS, 0,12% bromofenol azul e 5% de β-mercaptoetanol. A metodologia usada foi descrita por Laemmli (1970), com algumas modificações. As amostras foram submetidas à

desnaturação térmica por 4 minutos, posteriormente aplicada em géis com concentrações de poliacrilamida de 7,5 ou 12%. A migração das proteínas foi feita a 4°C e com corrente constante, até que as amostras atingissem o final do gel. Após separação por eletroforese, para visualização das proteínas, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* 1%, dissolvido em uma solução contendo etanol, água e ácido acético (5:5:1 v/v) ou com nitrato de prata (Caetano-Anollés e Gressshoff, 1994). As proteínas Miosina, β -Galactosidase, Fosforilase-B, Albumina sérica bovina, Ovoalbumina e Anidrase Carbônica (com peso 205, 116, 97, 66, 45 e 29 KDa, respectivamente), foram utilizadas como marcadores de massa molecular. Alternativamente, para proteínas de baixo peso foi utilizado um padrão com proteínas de 66, 45, 29, 24 e 14,2 KDa.

3.6.4 Western Blot

Nos experimentos de *Western Blot* (WB), amostras de proteínas foram submetidas à eletroforese como descrito no item anterior. Imediatamente após a separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (*Millipore, Immobilon-P, 0,45 μ m/ Immuno-BlotTM PVDF*) utilizando-se como tampão de transferência a solução: 20mM Tris, 192 mM Glicina e 20% metanol ou transferidas em membrana de nitrocelulose (*HybondTM-ECLTM Nitrocellulose membrane – Amersham Bioscience*) utilizando como tampão de transferência uma solução de 25 mM Tris, 400 mM Glicina e 5% etanol. A transferência ocorreu por 2 horas à temperatura ambiente, sob voltagem constante de 30 V.

A detecção dos antígenos imobilizados na membrana após a transferência foi realizada utilizando-se o *Kit ECL Western Blotting Detection Reagents and Analysis*

System (Amersham Biosciences), de acordo com as especificações do fabricante. Este método de detecção consiste na emissão de luz não-radioativa (quimioluminescente), por meio de anticorpo marcado com *Horseradish Peroxidase* (HPR). Após a transferência as membranas foram coradas com solução de *Ponceau* para marcação das bandas padrão, lavadas em água destilada por cinco minutos e incubadas por 16 horas a 4°C em uma solução bloqueadora (SB) – 250 ml de tampão “A” (3,027 g Tris, 0,147 g CaCl₂ e 2,337 g NaCl, pH 8.5, em um volume final de 250 ml), 50 g de leite em pó desnatado e 500 µl de azida sódica 10%, em um volume final de 500 ml. Após este período, o anticorpo primário apropriado foi diluído em concentração adequada em 20 ml de SB, em seguida, as membranas foram imersas nesta solução e incubadas sob leve agitação por uma hora à temperatura ambiente. Para os experimentos foram utilizados os seguintes anticorpos primários:

(1) **Anti-HMGR**, descrito e caracterizado por Zapata et al. (2002); este foi obtido utilizando-se um peptídeo de 14 aminoácidos, posição 828-841 (GHLVKSHMRHNRSS), da HMG-CoA redutase de *Blattella germanica* (ver a sequência completa em Martinez-Gonzalez et al., 1993). A diluição utilizada foi 1:350 em SB. Este anticorpo foi cedido gentilmente pela Dr^a M. D. Piulachs (Department of Physiology and Molecular Biodiversity/ CSIC –Barcelona).

(2) **Anti-His**, anticorpo comercial (Sigma), este anticorpo é capaz de reconhecer e se ligar a seqüências com sequencia poli-histidina N-terminal. A diluição utilizada foi a recomendada pelo fabricante, 1:12000 em SB.

(3) **Anti-JHE e Anti-JHEH**, anticorpos produzidos em coelhos durante este trabalho utilizando como antígeno parte da seqüência das proteínas

produzidas em células de *E. coli*. A diluição utilizada foi 1:100 e 1:500 para JHE e JHEH, respectivamente, em SB.

Posteriormente, as membranas foram lavadas da seguinte forma: 2 lavagens rápidas de 5 minutos cada e 1 lavagem de 15 minutos à temperatura ambiente, sob leve agitação, em PBS-Tween - 500 µl de Tween em 1 litro de PBS 0,2 M, pH 7.2. Após as lavagens, as membranas foram incubadas por 1 hora em diluição adequada do anticorpo secundário (1:12000) em PBS-Tween. Os anticorpos secundários utilizados foram: *anti-mouse* (para anticorpo primário anti-His) e *anti-rabbit* (para anticorpo primário anti-HMGR, anti-JHE e anti-JHEH) *IgG, Horseradish Peroxidase-linked whole antibody*, fornecido pelo fabricante do *Kit*. Posteriormente, as membranas foram lavadas novamente em PBS-Tween, como descrito acima. Para a detecção do sinal quimioluminescente, as membranas foram dispostas sobre uma folha plástica e uma mistura dos reagentes de detecção (*Kit*) foi adicionada sobre as mesmas. A reação de detecção foi processada por 1 minuto no escuro, e em seguida, as membranas foram envolvidas em nova folha plástica e colocadas em cassetes para expor filmes autoradiográficos (*Kodak® XR-Omat/ HyperfilmTM MP*, Amersham Biosciences) por período adequado. A revelação do filme foi feita usando as soluções de revelação e fixação GBX da Kodak®.

3.7 Tratamento com hormônio juvenil

Larvas de operárias no quinto estágio larval, fase de defecação, (L5S1) foram tratadas com HJ-III (Sigma, 5mg/ml em acetona), com o objetivo de modular as enzimas de degradação do HJ. As larvas foram removidas de suas células de cria e tratadas com HJ-III (para uma dose final de 10 µg) ou com 1 µl de acetona ou não

receberam tratamento (controle). As larvas foram mantidas em um incubador a 34°C e 80% de umidade relativa. Após as amostras serem homogeneizadas em reagente TRIzol®, estas foram congeladas em freezer em -80°C até o momento da extração de RNA. Para o tratamento hormonal de larvas mais jovens, ou seja, ainda no período de alimentação, foi adotado outro protocolo, pois as larvas não podem permanecer fora da colônia. Assim, nossa estratégia foi realizar um experimento *in vitro* em meio de cultura contendo HJ-III. Larvas de operárias no início do quinto estágio larval (L5F2) foram retiradas de suas células de cria e dissecadas em solução Ringer de insetos, para a retirada do intestino e a cabeça (removendo-se, assim as glândulas protorácicas - local de síntese de ecdisteróides e os CA – local de síntese do HJ), o restante do corpo foi posteriormente incubado em 1 ml de meio de cultivo (Rachinsky e Hartfelder, 1998) durante o período de duas horas (para garantir a metabolização dos hormônios presentes no organismo). A seguir, o material foi incubado em novo meio de cultivo (1ml), contendo o hormônio a ser testado. As larvas foram separadas em três grupos, contendo três larvas cada um. Grupo I: larvas incubadas em 1 ml de meio de cultivo (controle I); Grupo II: larvas tratadas com 1 µl de acetona (solvente do HJ) em 1ml de meio, (controle II) e Grupo III: larvas tratadas com 1µg de HJ-III em 1 ml de meio. As larvas foram mantidas em um incubador a 30°C sob agitação por 4 horas. Após tratamento, as amostras foram homogeneizadas em reagente TRIzol e congeladas em freezer -80°C até o momento da extração de RNA.

3.8 Expressão *in vitro* de proteínas recombinantes em células de *E. coli*

Seqüências parciais das proteínas JHE e JHEH foram produzidas *in vitro* utilizando-se metodologia Gateway® Technology with ClonaseTM II (Invitrogen) para

construção do vetor de expressão. Nesta metodologia as seqüências de interesse são clonadas para análise funcional em múltiplos sistemas de expressão por meio de recombinação gênica utilizando-se sítios específicos. Assim, fragmentos provenientes de PCR, digestão por enzimas de restrição ou de bibliotecas de cDNA são inseridos em um vetor de entrada, que então é usado para transferir o gene de interesse para um vetor de expressão (Figura 6).

Figura 6 – Esquema mostrando a multiplicidade de uso do *Kit Gateway* para clonagem. Fragmentos de DNA provenientes de várias metodologias são inseridos no vetor de entrada que então é utilizado para transferir a seqüência de interesse para diversos tipos de vetores para análises funcionais e expressão de proteínas.

3.8.1 Análise das seqüências e desenho dos *primers*

As seqüências de cDNA, obtidos como descrito acima, da JHE e JHEH foram utilizadas para desenho de *primers* específicos visando à amplificação do cDNA parcial. Foram desenhados *primers* que amplificam fragmentos 778 pb (*jhe*; *primers* GATJHE-F e GATJHE-R) e 796 pb (*jheh*; *primers* GATJHEH-F), estes *primers* continham um trecho de 9 nucleotídeos do sítio *attB1* (*forward*) ou *attB2* (*reverse*). Foram construídos também, seguindo as instruções do fabricante, *primers* para amplificação do sítio *attB* (ATTB-F e ATTB-R) (ver seqüências dos *primers* na Tabela I - Anexo I). O peso molecular predito das proteínas recombinantes a serem produzidas foi de 29 e 30 KDa para a JHE e JHEH, respectivamente. Durante o processo as proteínas recombinantes produzidas por este sistema recebem uma seqüência N-terminal de 22 aminoácidos que são referentes à seqüência do vetor (sítio *attB1*) e uma cauda de seis Histidinas (6xHis).

3.8.2 Produção de DNA linear contendo o sítio *attB*

Os *primers* específicos para os genes de interesse que continham uma seqüência de nove nucleotídeos do sítio de recombinação *attB* foram utilizados em reações de PCR nas seguintes condições: 94°C por 2 minutos, seguidos de 25 ciclos à 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, e uma extensão final de 7 minutos à 72°C. Para tanto foi utilizado cDNA de larva de operária de quinto estágio. Uma alíquota desta 1ª PCR foi empregada numa segunda reação de PCR utilizando-se os *primers* ATTB-F e ATTB-R, com as mesmas condições de amplificação exceto a temperatura de anelamento dos *primers* à 55°C. Assim, foram amplificadas as seqüências específicas para os genes da JHE e JHEH que continham o

sítio *attB* em suas extremidades. O produto gerado pelas reações de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da amplificação e tamanho dos fragmentos. Estas reações de PCR foram feitas utilizando-se uma enzima de alta fidelidade, *Platinum® Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

3.8.3 Recombinação entre os sítios *attB* e *attP*

O DNA produzido nas amplificações por PCR com *primers* ATTB foi purificado adicionando-se solução 30% PEG 8000/30 mM de MgCl₂ para concentração final de 10%. Após homogeneização as amostras foram centrifugadas por 15 minutos (14000 rpm – TA), sendo o *pellet* ressuspendido em tampão TE (Tris-EDTA; pH 8,0). O DNA obtido foi quantificado e utilizado para a primeira reação de recombinação entre o sítio *attB* do fragmento linear de DNA gerado por PCR e o sítio *attP* do vetor de entrada (pDONR™ 221; Invitrogen – Figura 7). A reação BP foi feita misturando-se 1 µl do produto de PCR (150 ng/µl), 1 µl do vetor de entrada (150 ng/µl), 6 µl de tampão TE e 2 µl da enzima BP clonase™ II (Invitrogen). A mistura foi incubada a 25°C por 1 hora, a reação foi finalizada com a adição de 1 µl de solução de Proteinase K (2 µg/µl em 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 20 mM CaCl₂; 50% glicerol) e incubação por 10 minutos à 37°C. Após a recombinação, 1 µl da solução resultante da reação BP foi utilizado para transformar quimicamente células One Shot® OmniMAX™ 2 T1 (Invitrogen). A seleção de transformantes foi feita adicionando-se Kanamicina (100 µg/ml) à placa de cultivo. Neste procedimento, só são capazes de crescer bactérias que contenham o vetor de entrada recombinado, pois aquelas que recebem o vetor de entrada não recombinado, possuem o gene *ccdB* que impossibilita o crescimento da *E. coli*. Os clones foram

selecionados, cultivados em meio líquido LB e utilizados para extração dos plasmídeos. Os plasmídeos recombinantes foram utilizados como molde em PCR para verificação da presença do inserto, utilizando-se o *primer* universal M13F (o sítio M13F está presente *upstream* ao início do sítio de recombinação) e um *primer antisense* do gene de interesse (Tabela I – Anexo I). Os plasmídeos foram seqüenciados para verificar se o gene de interesse estava em fase de leitura, e se a seqüência do mesmo estava correta.

Figura 7 – Vetor de entrada pDONR™21 (Invitrogen) utilizado para a reação de recombinação entre os sítios *attB* e *attP*.

3.8.4 Recombinação entre os sítios *attL* e *attR*

Foi selecionado um vetor de entrada para cada gene que foi, então, utilizado para a reação de recombinação LR: entre o sítio *attL* (sítio resultante da recombinação BP) e o sítio *attR* do vetor de expressão (pDESTTM 17, Invitrogen – Figura 8). A reação LR foi feita separadamente para cada gene misturando-se 1 µl do plasmídeo resultante da respectiva Reação BP (150 ηg/µl), 1 µl do vetor de expressão (150 ηg/µl), 6 µl de tampão TE (pH 8,0) e 2 µl da enzima LR clonaseTM II (Invitrogen). As misturas foram submetidas a 25°C por 1 hora, as reações foram finalizadas com a adição de 1 µl de solução de Proteinase K por 10 minutos a 37°C. Após a recombinação, 1 µl de cada reação LR foi utilizado para transformar quimicamente as células One Shot® OmniMAXTM 2 T1 (Invitrogen). A seleção de transformantes foi feita adicionando-se Ampicilina (100 µg/ml) à placa de cultivo. Os plasmídeos extraídos foram utilizados como molde em PCR para verificação da presença do inserto no vetor de expressão, utilizando-se o *primer* universal T7 (o sítio T7 está presente *upstream* ao gene de interesse no vetor de expressão) e um *primer antisense* do gene de interesse (ver Tabela I – Anexo I).

Figura 8 – Vetor de expressão pDEST™ 17 (Invitrogen) para a reação de recombinação entre os sítios *attL* e *attR*

3.8.5 Preparo das linhagens de expressão

Os plasmídeos de expressão contendo o gene de interesse foram utilizados para transformar quimicamente uma linhagem de expressão de *E. coli*: BL21 (DE3) Rosetta. Estas células foram tratadas previamente com CaCl₂ para torná-las competentes para transformação de rotina (item 3.4.1.). O protocolo de transformação foi o mesmo adotado anteriormente (item 3.4.3.). Neste experimento foi utilizado além de Ampicilina, cujo gene de resistência está presente no plasmídeo recombinante, cloranfenicol (34mg/ml), por ser a linhagem de expressão resistente a este antibiótico.

3.8.6 Produção das proteínas recombinantes

Os experimentos de expressão *in vitro* foram realizados da seguinte forma: no dia anterior aos experimentos a solução contendo as células *E. coli* da linhagem de expressão previamente transformadas com os plasmídeos contendo o gene da JHE ou da JHEH (mantida em estoque a -80°C em 80% de glicerol) foram pré-inoculadas em meio LB líquido contendo 34mg/ml de cloranfenicol e 100 µg/ml de Ampicilina, sendo incubado *overnight* a 37°C e 180 rpm de agitação. No dia seguinte, dois tubos contendo meio LB, (1) JHE e (2) JHEH, e antibióticos eram inoculados com 200 µl de cada pré-inóculo. O crescimento das células foi monitorado por leituras em espectrofotômetro a 595nm até a DO atingir 0,4. Neste momento, foram coletados 2 ml de cada cultivo (Tempo inicial - T₀), sendo o restante do cultivo induzido com 0,2 – 0,4 mM de IPTG. Foram coletadas amostras 1, 2, 3 e 4 horas após a indução. Após a coleta das amostras o meio de cultivo era centrifugado por 1 minuto a 6000 rpm para formar o *pellet* de bactérias, que foi estocado em *freezer* -20°C até o dia seguinte. As amostras foram processadas da seguinte forma: o *pellet* foi ressuscitado em 300 µl de tampão de Lise (1,5 ml de solução 150mM de NaCl 1N; 500 µl de solução Tris-HCl 50 mM pH 7,4; 500 µl de solução de Lisozima 10mg/ml; 7,5 ml de água destilada); foi adicionado também 50 µl de um coquetel de solução de inibidores de protease. As células foram lisadas por choque de temperatura (30 segundos a 42°C e 30 segundos em nitrogênio líquido por 10 vezes) ou por sonicação (três pulsos de 45 segundos com intervalos de 45 segundos). As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10000 rpm e 4°C, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o *pellet* foi ressuscitado em 200 µl do mesmo tampão de lise. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% para investigar a presença de uma banda de tamanho esperado (29

KDa – JHE e 30 KDa - JHEH) que não estivesse presente antes da indução e em quantidade crescente nos demais intervalos. Além disto, a detecção da proteína recombinante foi também feita através de protocolo de *Western Blot* utilizando anticorpo anti-His (ver item 3.6.4) que reconhece a cauda N-terminal contendo 6XHis.

3.9 Produção de anticorpos

3.9.1 Purificação das proteínas recombinantes recJHE e recJHEH

Após produção *in vitro* de seqüências parciais das proteínas JHE e JHEH e confirmação por *Western Blot*, o procedimento de produção foi repetido em larga escala, para produção suficiente de proteínas para inoculação em coelhos. O sobrenadante foi utilizado para extração de proteínas com o uso do reagente Dynabeads® TALON® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Contudo a purificação da proteína JHEH não foi possível com este reagente, pois, a mesma não se encontrava na fração solúvel quando da extração das proteínas. Neste caso, a JHEH recombinante foi separada em gel de poliacrilamida 12%, sendo que a região do gel contendo o peso molecular apropriado foi recortada e utilizada para purificação da seguinte forma: a banda foi congelada em nitrogênio líquido e macerada, este produto foi diluído em água *Milli-Q* autoclavada, incubado em gelo por 30 minutos e centrifugado, a proteína foi obtida no sobrenadante. Após estes dois procedimentos as proteínas purificadas foram separadas em gel de poliacrilamida 12% para confirmação do procedimento e quantificadas apropriadamente.

3.9.2 Produção de anticorpos anti-JHE e anti-JHEH em coelhos

Os anticorpos anti-JHE e anti-JHEH foram obtidos pela imunização de duas coelhas de aproximadamente 2 Kg. A proteína purificada (40 µg) diluída em salina (volume final: 500 µl) foi emulsificada em 500 µl de adjuvante completo de *Freund*. Três injeções subcutâneas foram administradas com intervalos de sete dias. As coelhas foram mantidas no biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em gaiolas e receberam água e alimento *ad libitum*. Na quarta semana as coelhas receberam injeção sem adjuvante (cerca de 80 µg de proteína) diluída em 1 ml de salina. No mesmo dia foi realizada a primeira sangria para retirada de 5 ml de sangue para os testes de imunodifusão e verificação dos títulos de anticorpos. No 28º dia as coelhas foram sacrificadas e o volume máximo de sangue foi coletado por punção cardíaca. O soro obtido após coagulação do sangue e centrifugação a 400 g por 5 minutos foi aliquotado e estocado a -20°C.

3.9.3 Imunodifusão dos anticorpos

Este procedimento foi realizado separadamente para verificação da reação antígeno-anticorpo das proteínas JHE e JHEH de *A. mellifera*. Sobre uma lâmina de microscopia foram derramados 2 ml de agarose 1% em tampão Tris- HCl 0,06 M (pH 8,6), após resfriamento foram perfuradas as rosetas para o aplicação das amostras e anticorpos. Nos poços periféricos foram adicionados 5 µl do antígeno (proteína recombinante) ou 5 µl de hemolinfa (para o teste da JHE) ou ainda, 5 µl de proteínas extraídas do corpo gorduroso (para o teste da JHEH) de larvas de operárias. O poço central recebeu 10 µl do soro de coelho. As lâminas foram incubadas *overnight* em

câmara úmida para difusão das amostras. Após este período as lâminas foram lavadas em salina, secas com uma pilha de papel absorvente sobre a lâmina e coradas com *Coomassie Brilliant Blue R-250* em etanol, água e ácido acético (5:5:1 v/v) para visualização da interação antígeno e anticorpo. Uma linha de precipitação no local onde antígeno e anticorpo se encontravam após a difusão deveria se formar para demonstrar um resultado apropriado.

3.9.4 Titulação dos anticorpos

O sangue das coelhas, proveniente de sangria total, foi deixado por 8 horas à temperatura ambiente, seguido de incubação a 4°C *overnight* para retração do coágulo. No dia seguinte o soro foi coletado, aliquotado e congelado. Uma alíquota dos soros foi utilizada para teste de concentração de anticorpo a ser utilizado em *Western Blot*. Numa tira de membrana de nitrocelulose foram aplicadas gotas do soro em diluições seriadas (soro puro; 1:10; 1:100; 1:1000) e sobre as mesmas foi adicionado 1 µl do antígeno (proteína purificada; 0,3-0,5 µg). Como controle negativo foi utilizado apenas 1 µl do antígeno ou 1 µl do anticorpo. Após o tempo de reação a membrana foi incubada por 1 hora em solução *Blotto*, sendo executado, então, o protocolo de lavagem com PBS-*Tween*, incubação com anticorpo secundário (anti-coelho), lavagem com PBS-*Tween* e revelação (item 3.6.4. - *Western Blot*).

3.10 Experimentos de RNA de interferência

3.10.1 Produção de RNA dupla fita

O RNA de fita dupla do gene da JHE (JHE-dsRNA) e de uma *Green Fluorescence Protein* (GFP) de planta (utilizado como controle) foram produzidos utilizando-se o kit RiboMAX™ (*Large Scale RNA production System – T7*, Promega). Nesta metodologia o RNA de fita dupla é sintetizado através da ação de um *mix* enzimático que age sobre um molde linear de DNA que contenha a sequência de nucleotídeos do promotor T₇. Para tanto, foram desenhados *primers* específicos para os genes da JHE e GFP contendo em suas extremidades a sequência do promotor desejado. Os *primers* utilizados foram RNAiJHE-F, RNAiJHE-R, para o gene da JHE e GFP-F e GFP-R, para o gene GFP, as sequências dos *primers* estão na Tabela I - Anexo I.

Estes *primers* foram utilizados para amplificação dos DNAs lineares por PCR (produzindo um fragmento de 440 pb para JHE e 450 pb para GFP), utilizando-se o cDNA proveniente de larva de quinto estágio para o gene da JHE. Um plasmídeo contendo o gene da proteína GFP, gentilmente cedido pela Prof^a Maria Helena Goldman (Depto. Biologia-FFCLRP/USP), foi utilizado como molde para as reações de PCR para GFP. As condições de PCR utilizadas para ambos os genes foram as seguintes: 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos; e uma extensão final à 72°C por 7 minutos. Após amplificação, uma alíquota das soluções de PCR foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, para verificação do tamanho dos fragmentos amplificados. O restante foi usado para extração do DNA diretamente da PCR utilizando-se um Kit de extração (*NucleoSpin®*

Extraction Kit, Macherey-Nagel). Os DNAs obtidos foram quantificados e em seguida foram utilizados para as reações de produção do dsRNA dos genes.

A reação de produção do dsRNA foi feita utilizando-se 20 µl de tampão de transcrição T₇, 30 µl de rNTPs (25mM de ATP, CTP, GTP e UTP), 40 µl de DNA molde linear (aproximadamente 4µg de DNA) e 10 µl do *mix* de enzimas do *Kit* em uma reação de 8 horas a 37°C. Os dsRNAs produzidos foram purificados utilizando-se o reagente TRIzol LS® (especial para extração de RNA em soluções) através do procedimento recomendado pelo fabricante. Os dsRNAs foram desnaturados submetendo-os a 98°C por 1 minuto e resfriados lentamente por 30 minutos para renaturação das fitas. Após este procedimento os dsRNAs foram submetidos à eletroforese para verificar o tamanho do produto e a união das fitas de RNA. Os dsRNAs foram quantificados e armazenados em freezer -80°C até o momento do uso.

3.10.2 Injeção de dsRNA, confinamento, coleta e análise das amostras

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se abelhas operárias adultas com 4 dias de idade. Operárias recém-emergidas foram marcadas com caneta atóxica e devolvidas à colônia, no quarto dia as abelhas foram coletadas, adormecidas em gelo, injetadas com a solução contendo o dsRNA adequado ou mantidas sem tratamento. As abelhas foram divididas em três grupos de 30 indivíduos cada: (Controle I) controle sem tratamento, (Controle II) controle tratado com 10µg de GFP-dsRNA e (JHE) abelhas tratadas com 10 µg de JHE-dsRNA.

Após os devidos tratamentos, cada grupo de abelhas foi transferido para pequenas caixas de madeira medindo 8 x 11 x 13 cm. Todas as caixas foram mantidas em estufa a 34°C e 80% de umidade relativa, por cinco dias. Água e dieta (uma mistura

composta de 40 g de pólen, 50 g de açúcar, em 100 ml de água) foram fornecidas *ad libitum* para todos os grupos.

Após 5 dias do tratamento inicial as abelhas foram coletadas. O abdome das abelhas, sem o intestino, foi coletado individualmente e incubado em reagente Trizol para extração de RNA total e posterior quantificação dos genes codificadores da JHE, outras carboxiesterases (COs) e vitelogenina (Vg); a hemolinfa foi coletada para quantificação de HJ por Radioimunoensaio (RIA) e para análise do perfil de proteínas por SDS-PAGE. Como controle dos efeitos inespecíficos do dsRNA, foram selecionados três genes de carboxiesterases de *A. mellifera* (número de acesso no *Glen Official Set*: **GB10820**, **GB11403** e **GB13602**) com alta similaridade ao gene analisado neste experimento (**GB15327**), neste caso o número de transcritos foi investigado por SqRT-PCR utilizando o cDNA de cada amostra, construído como descrito acima.

3.11 Quantificação do hormônio juvenil por Radioimunoensaio

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

(1) Extração do HJ: As amostras contendo 1 µl de hemolinfa em 500 µl de acetonitrila foram colocadas em tubos de vidro de 1 ml, misturadas e centrifugadas a 7500 rpm por 3 minutos a 4°C. Após, centrifugação, o sobrenadante foi transferido para tubos de extração (tubos de 5 ml), aos quais foram também adicionados 1 ml de NaCl 0,9% e 1 ml de hexano. Esta mistura foi cuidadosamente agitada e mantida em gelo por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (750 rpm) a 4°C por 5 minutos e tiveram o sobrenadante (fase hexano – fase contendo o HJ) cuidadosamente

transferido, com auxílio de uma pipeta *Pasteur*, para um novo tubo de extração. O passo de extração foi repetido por mais duas vezes, perfazendo um total de 3 ml de hexano no final do procedimento. O volume de hexano foi evaporado utilizando-se centrifugação a vácuo (*SpeedVac*), por aproximadamente 15 minutos. O *pellet* foi redissolvido em 100 µl de tolueno.

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

(3) Preparo das amostras para cintilação: Após este período, foram adicionados às amostras 250 µl de solução saturada de sulfato de amônia (para a precipitação das proteínas), que em seguida foram novamente agitados, deixados a 4°C por 30 minutos e centrifugados a 7500 rpm por 15 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram descartados. Aos precipitados foram adicionados 500 µl de solução de sulfato de amônia 50%. Após agitação e permanência a 4°C por mais 30 minutos, os tubos foram novamente centrifugados por 15 minutos a 7500 rpm, descartando-se em seguida o sobrenadante. Os precipitados foram ressuspensos em 40 µl de água bidestilada estéril. Após

agitação, estas amostras foram transferidas para frascos especiais para cintilação líquida; os tubos que continham os precipitados foram novamente lavados com mais 40 µl de água e este volume foi transferido, em seguida, para os respectivos frascos. A estes frascos foram acrescentados 5 ml de líquido de cintilação (90 mg de POPOP, 3,6 g de PPO, 300 ml de Triton X-100 e 600 µl de tolueno), e após agitação procedeu-se a quantificação do HJ-III em espectrômetro de cintilação líquida (Multi-Purpose Scintillation Counter/LS 6500 Beckman – USA).

3.12 Experimentos de manipulação do alimento

3.12.1 Experimento de alimentação em abelhas adultas

Operárias recém-emergidas foram coletadas das colônias e confinadas em caixas de Madeira de 8 x 11 x 13 cm providas com alimento em duas diferentes condições: abelhas alimentadas com uma dieta a base de açúcar (xarope - 50% de açúcar em água) e abelhas alimentadas com açúcar e pólen (*beebread* – pólen fermentado coletado diretamente nos favos – 30% em xarope). Todas as abelhas receberam alimento e água *ad libitum*. As abelhas foram mantidas durante sete dias em uma estufa regulada à 34°C e 80% de umidade relativa. Após este período as abelhas foram coletadas em *pools* de 10 indivíduos para amostras de hemolinfa e corpo gorduroso e *pools* de 8 indivíduos para amostras de CA. As amostras de corpo gorduroso e CA foram processadas para extração de RNA e posterior quantificação do número de transcritos para os genes de interesse. Amostras de corpo gorduroso e hemolinfa foram processadas por análise de *western blot*.

3.12.2 Experimento de manipulação do alimento em larvas

Primeiramente foi feita uma postura controlada sobre um quadro de cria, ou seja, a rainha foi mantida presa por uma gaiola sobre o quadro com células de cria. Após 96 horas (1º estágio larval) metade das larvas foram transferidas para realeiras contendo 1 gota de geléia real para o desenvolvimento de rainhas. Após 48 horas, metade de cada grupo: (1) larvas mantidas em favos de cria de operárias e (2) larvas mantidas em realeiras foram transferidas para as células da outra casta. Após 48 horas, as larvas foram coletadas para análises por *western blot*. Ao final do experimento foi coletado o corpo gorduroso de amostras individuais para cada um dos grupos: abelhas que permaneceram 4 dias em células de operárias (4Op), abelhas que ficaram 2 dias em células de rainha e foram em seguida transferidas para células de operárias (2Ra2Op), abelhas que ficaram 2 dias em células de operária e foram em seguida transferidas para células de rainhas (2Op2Ra), abelhas que permaneceram 4 dias em células de rainhas (4Ra).

3.13 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa *Sigma Stat 3.1*, e teste não paramétrico ANOVA (*one way anova*) ou *t-test*. O cálculo do erro padrão e das médias das amostras foi feito pelo mesmo programa.

Ilustração: A. Fagundes; *In*: Freire, 2006.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Produção de anticorpos

A fim de produzir as proteínas JHE e JHEH, para posterior produção de anticorpos, utilizamos o sistema de clonagem *Gateway* (Invitrogen) para o preparo de vetores de expressão, o vetor de expressão utilizado possui na região N-terminal uma cauda de Histidina (6xHis), e pode ser regulado facilmente com a adição de IPTG devido à presença do promotor T₇ no vetor. As seqüências gênicas utilizadas para a produção “in vitro” das proteínas citadas estão descritas nos itens seguintes. Os anticorpos produzidos foram parte da caracterização dos genes de degradação do HJ, e portanto, a descrição da produção dos mesmos está citada previamente. As proteínas recombinantes recJHE e recJHEH foram produzidas contendo os resíduos de aminoácidos na posições 101 a 381 e 35 a 263, respectivamente (Figura 9A e 9B). Após a produção de DNA linear para os dois genes contendo o sítio *attB* foi confirmado o tamanho dos fragmento amplificados, correspondente às seqüências parciais dos genes *jhe* (778 pb) e *jheh* (796 pb) (Figura 9C). Após as etapas de recombinação (BP e LR) foi verificada a presença do gene de interesse no vetor por meio de reações de PCR utilizando sempre um *primer* do vetor (M13 *forward*, para o vetor de entrada e T7, para o vetor de expressão) e um *primer* específico do gene de interesse (*reverse*) (Figuras 9D e 9E).

Figura 9 – Fragmentos das seqüências deduzidas de aminoácidos utilizados para produção *in vitro* das proteínas recombinantes recJHE e recJHEH utilizando-se o sistema *Gateway* para clonagem. Proteína JHE recombinante - recJHE (A) e JHEH recombinante - recJHEH (B). Géis de agarose 1% mostrando o resultado das amplificações por PCR para clonagem; (M) marcador de peso molecular de 100pb, o fragmento de maior intensidade representa 600pb. (C) PCR utilizando *primers* para a construção do fragmento linear para clonagem no vetor de entrada, sendo, respectivamente: 1 e 2, resultado da 1º PCR com *primers* específicos para os genes de interesse e resultado da 2º PCR utilizando-se os *primers* do sítio *attB*. (D) fragmentos amplificados utilizando-se *primers* específicos para os genes de interesse em conjunto com o primer universal M13, para a confirmação da presença do inserto no vetor de entrada. (E) Fragmentos amplificados utilizando-se *primers* específicos para os genes de interesse em conjunto com o *primer* universal T7, para a confirmação da presença do inserto no vetor de expressão.

As amostras coletadas durante os ensaios de expressão *in vitro* foram processadas para separação das proteínas presentes nas fases solúvel e insolúvel. As amostras coletadas após 1, 2, 3 e 4 horas de indução foram comparadas àquelas coletadas antes da indução (tempo zero) em gel de poliacrilamida 12%. Foi localizada uma banda, do tamanho esperado, para as amostras coletadas do cultivo de *E. coli* que receberam o vetor de expressão contendo o cDNA parcial da JHE na fração solúvel (Figura 10A); a um polipeptídeo de aproximadamente 29 KDa não está presente na amostra coletada antes da indução (T_0) e tem concentração crescente nos tempos seguintes. A recJHEH foi localizada apenas na fração insolúvel, correspondendo a um polipeptídeo de aproximadamente 30KDa (Figura 10B).

Nas reações de WB para localização e identificação das proteínas recombinantes, utilizando-se anticorpo anti-His foram utilizadas as amostras nos tempos de indução: T_0 , T_2 e T_4 . Foi localizada a banda de tamanho esperado e em concentração crescente para ambas as reações (JHE e JHEH) (Figura 10C). A produção da recJHE foi padronizada com 0,4 mM de IPTG e 4 horas de cultivo, enquanto a recJHEH foi induzida por 0,4 mM de IPTG e 5 horas de cultivo.

Os anticorpos anti-JHE e anti-JHEH foram produzidos em coelhas utilizando as proteínas purificadas, o teste de imunodifusão em agarose mostrou que ambos reagiram com os seus respectivos antígenos. Também foi realizado um teste de titulação dos anticorpos com diluições seriadas do soro de coelho em procedimento de imunofixação (Figura 1D). O teste sugere que a diluição apropriada a ser utilizada para ambas as proteínas deve ser maior que 1:1000.

Figura 10 – Análise por SDS-PAGE das proteínas extraídas do cultivo celular de *E. coli* transformada com o vetor de expressão recJHE (A) e recJHE (B). As células foram coletadas 0, 1, 2, 3 e 4 horas após indução (T₀-T₄). As proteínas foram obtidas após lise celular e separação das frações solúvel e insolúvel. As setas indicam a banda correspondente a cada proteína. (M) proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular. (C) Análise por *Western Blot* das proteínas extraídas do cultivo celular de *E. coli*. As células foram coletadas 0, 2 e 4 horas após indução (T₀, T₂ e T₄); a banda observada corresponde à presença da fusão poli-His em posição N-terminal. (D) Titulação do anticorpo para uso em *Western Blot*. Cada *spot* recebeu 1ul da proteína purificada. O anticorpo foi adicionado em diluições seriadas, sendo que os controles negativos, C1 e , C2 receberam apenas 1 ul de antígeno ou anticorpo, respectivamente.

4.2 Esterase do hormônio juvenil

4.2.1 Identificação do gene da esterase do hormônio juvenil

A identificação do primeiro trecho do gene putativo da JHE ocorreu a partir de um projeto EST (Nunes et al., 2004), antes do início do projeto de sequenciamento do genoma de *A. mellifera*. As 26 seqüências obtidas naquele momento formaram um trecho de 502 nucleotídeos que mostrou um alinhamento perfeito com uma carboxiesterase de *A. mellifera* descrita como uma proteína preferencial de antena de zangões (Kamikouchi et al., 2004) (número de acesso no GenBank: proteína, **BAC541301** e cDNA, **AB083009**).

Após o término do projeto de sequenciamento do genoma de *A. mellifera* (Honey bee Genome Consortium, 2006), uma extensa análise das carboxiesterases foi realizada por Claudianos et al. (2006). Neste trabalho o autor anotou o **GB18660** (número de acesso no *Official Gene Set*) como o gene codificador da JHE em *A. mellifera*. No entanto, esta seqüência revelou discrepâncias em relação a motivos funcionais tipicamente encontrados em uma JHE (Oakeshott et al., 2005). Por esse motivo, nós usamos buscas por análises de similaridades baseadas na seqüência de *D. melanogaster* e ainda, checamos a presença de motivos catalíticos de esterase-lipases das 21 seqüências localizadas no genoma de *A. mellifera*.

Das 21 carboxiesterases com similaridade à seqüência de *D. melanogaster*, concluímos que a seqüência correspondente ao **GB15327** como sendo a mais forte candidata a JHE de *A. mellifera* por dois motivos principais: pela presença de todos os motivos de esterase-lipases e por esta seqüência ser o melhor *match* (BLASTP) com as JHE de *D. melanogaster* e *T. molitor*, que são modelos de JHEs para insetos não-

lepidópteros (Kamita et al., 2003). Um fato interessante, nestas análises, é que nenhuma das 21 esterases localizadas apresentou o motivo na configuração, GQSAG (Tabela IV), que é considerado um motivo canônico para enzimas com a função de JHE. No entanto, o motivo na configuração GQSAG está presente no genoma de *Nasonia vitripennis*, o segundo Himenóptera a ter o seu genoma seqüenciado (liberado parcialmente em 2007, para os membros do Consórcio).

Além das razões apresentadas acima, outros pontos reforçaram nossa análises:

(1) a seqüência relativa ao **GB15327** possui um peptídeo sinal (resíduos 1-16), flanqueando um sítio putativo de clivagem, característica necessária para a secreção desta proteína na hemolinfa; (2) de forma similar ao que ocorre com o gene da JHE de *D. melanogaster* (número de acesso: **CG8425**) que possui uma duplicação vizinha (número de acesso: **CG8424**), o **GB15327** também possui uma duplicação vizinha (**GB10820**) com uma seqüência predita de aminoácidos que perdeu o peptídeo sinal e (3) um projeto de EST realizado previamente por Nunes et al. (2004) evidenciava que o gene é transcrito.

Tabela IV – Análise de motivos e características bioquímicas de 21 carboxiesterases preditas no genoma de *A. mellifera*. Estas 21 carboxiesterases foram aquelas que exibiram similaridade com as JHEs de *D. melanogaster* e *T. molitor*. Estão mostrados os cinco motivos catalíticos de esterases-lipases (RF, DQ, GxSxG, E e GxxHxxD/E), a presença de peptídeo sinal (PS), a massa molecular (M) e ponto isoelétrico (pI) preditos. A classificação das carboxiesterases está de acordo com Claudianos et al. (2006): (NI) esterases não incluídas nas análises deste autor. GB: representa os genes preditos (GLEAN3 predicted genes in the Honey Bee Genome Assembly, version Amel_pre_release2OGS). (+/-)presença/ausência de motivos ou peptídeo sinal; (EL) esterase-lipase, (CO) carboxiesterase, (ACh) acetilcolinesterase. O **GB15327** foi selecionado como o melhor candidato a ser o codificador da JHE de *A. mellifera* e está destacado pela sombra em cinza.

GB	Motivos catalíticos de esterase-lipase					PS	Função predita (BLASTP)	Classificação	Predito	
	RF	DQ	GxSxG version	E	GxxHxxD/E				M (kDa)	pI
GB15327	+	+	GLSAG	+	+	+	EL/CO	β -esterases/feromônio esterase	64	6.13
GB10820	+	+	GMSAG	+	-	+	EL	β -esterases/feromônio esterase	56.3	9.56
GB13602	+	+	GESAG	+	+	-	EL/CO	Metabolismo xenobiótico	61.2	6.27
GB18657	+	+	GESAG	+	+	+	EL/CO	NI	61.1	4.56
GB14478	+	+	GESAG	+	+	+	EL/CO	Metabolismo xenobiótico	64.1	9.29
GB11403	+	+	GESAG	+	+	+	EL/CO	β -esterases/feromônio esterase	65.8	8.41
GB16342	+	+	GESAG	+	+	+	EL/CO	Metabolismo xenobiótico	61.0	4.62
GB12572	+	+	GESAG	+	-	+	EL	NI	55.7	8.47
GB14873	+	+	GESAG	+	+	+	ACh	Acetilcolinesterase	69	5.34
GB18414	+	+	GESAG	+	+	-	EL/CO	Acetilcolinesterase	58.9	5.12
GB15030	+	-	GVSAG	+	+	-	EL/CO	Metabolismo xenobiótico	58.8	7.25
GB13591	+	-	GVSAG	+	+	-	EL/CO	Metabolismo xenobiótico	59.2	5.55
GB19866	+	-	GVSAG	+	+	-	EL/CO	Metabolismo xenobiótico	59.7	5.56
GB10854	+	-	GVSAG	+	-	-	EL	Metabolismo xenobiótico	69.9	8.34
GB16889	+	+	GYSAG	+	-	+	EL/CO	Esterase do tegumento	65.3	6.12
GB18660	+	-	GHSAG		-	+	EL/CO	JHE	57	5.88
GB14049	+	-	GHSAG		-	+	EL	NI	57.9	5.88
GB18901	+	+	GHSSG	+	+	+	EL/CO	Grupo não caracterizado	69.9	5.67
GB11064	-	+	GDSSG	+	+	+	EL/CO	Metabolismo xenobiótico	61.8	4.81
GB15536	+	+	-	+	-	+	EL/CO	Grupo não caracterizado	73.4	9.22
GB18290	+	+	-		+	+	EL/CO	Função neural	88.9	6.76

4.2.2 A esterase do hormônio juvenil durante o ciclo de vida de operárias

Os protocolos de RT-PCR semiquantitativa e quantitativa, utilizados para as análises dos níveis de transcritos de *Amjhe* durante o desenvolvimento embrionário incluíram abelhas operárias de segundo estágio larval até o final do desenvolvimento pupal. O quinto estágio larval revelou alto número de transcritos, especialmente nas fases de alimentação (F1-F3) e início da fase de tecelagem do casulo (S1-S2) (Figura 11A). O nível máximo de transcritos foi encontrado ao final da fase de alimentação (F3). Após este período, um declínio dos níveis de transcrito foi detectado, no estágio pré-pupal e durante o estágio pupal.

Os níveis da proteína JHE foram estudados durante o quinto estágio larval, para comparação entre níveis de expressão e a tradução do gene. Os níveis de AmJHE foram estudados utilizando a técnica de *western blot* utilizando anticorpo específico anti-JHE produzido neste trabalho. As análises revelaram uma única proteína correspondendo à massa molecular de 64KDa, que está de acordo com a massa molecular predita para esta proteína (ver Tabela IV). Os resultados mostraram uma relação direta entre os níveis de transcritos e proteína na hemolinfa de abelhas operárias (Figura 11B). Estes dados evidenciam a possibilidade de não haver um controle regulatório sobre a tradução desta proteína, e que os níveis da proteína na hemolinfa, local onde esta enzima degrada o HJ circulante, sejam diretamente regulados via transcrição gênica.

Quando os níveis de transcritos do gene *Amjhe* foram comparados com os títulos de hormônios morfogênicos disponíveis na literatura (Figura 11C), uma relação inversa entre os títulos de HJ e *Amjhe* pôde ser traçada. Especialmente em relação ao declínio observado durante a transição da fase de alimentação (F) para tecelagem do

casulo (S) durante o quinto estágio larval. Neste momento, a diminuição dos níveis de HJ circulante (Figura 11C) acompanha um aumento nos níveis de transcritos (Figura 11A) e de proteínas na hemolinfa (Figura 11B), embora o aumento de proteínas na hemolinfa esteja ligeiramente atrasado, em relação ao nível de transcritos.

Após este período, os níveis de transcrito de *Amjhe* diminuem drasticamente (S3-PP3; figura 11A), acompanhado pela diminuição de sua respectiva proteína na hemolinfa (PP2-PP3; figura 11B). Aparentemente, esta diminuição da AmJHE circulante deve permitir o aumento dos níveis de HJ no estágio pré-pupal (Figura 11C).

Esta correlação negativa entre os níveis de JHE e HJ na hemolinfa é consistente com a função de degradação desta proteína, que provavelmente seja essencial para a retirada de HJ durante o período de transição larval-pupal da metamorfose. Além disto, uma comparação entre os níveis de *Amjhe* e AmJHE na hemolinfa, com os títulos de ecdisteróides na hemolinfa (Figura 11C) sugere que os níveis de transcrição de *Amjhe* sejam regulados negativamente por este hormônio. Este pode ser o caso dos níveis de *Amjhe* no estágio pré-pupal (PP) e pupal, quando altos níveis de ecdisteróides coincidem com a ausência ou baixos níveis de *Amjhe*.

Figura 11 – Níveis de esterase do hormônio juvenil durante o desenvolvimento pós-embrionário de *A. mellifera* e sua relação com os títulos de hormônios morfogênicos. (A) RT-PCR semiquantitativa para quantificação dos níveis de transcritos de *Amjhe*, utilizando-se a expressão do gene da actina como controle endógeno das reações. O inserto corresponde a análises por RT-PCR quantitativa (RQ) dos níveis de transcritos utilizando os níveis de transcritos da RP49 como controle endógeno; neste caso cada coluna representa a média entre duas amostras independentes contendo três indivíduos cada. (B) Quantificação dos níveis de JHE na hemolinfa de operárias durante o quinto estágio larval. Cada amostra corresponde a um *pool* de 10 indivíduos. Neste experimento, 50 μ g de proteína total foram utilizados para o procedimento de SDS-PAGE, seguido de *western blot* utilizando anticorpo específico para esta proteína. (C) Níveis de hormônio juvenil e ecdisteróides na hemolinfa de operárias durante o desenvolvimento pós-embrionário. Os títulos de HJ e ecdisteróides no estágio larval foram baseados em dados de Rembold (1987) e Elekonich et al. (2003) (para o 2°, 3° e 4° estágio), e Rachinsky et al. (1990) (para o 5° estágio). O gráfico mostrando os níveis de ecdisteróides e HJ no estágio pupal representam dados de Pinto et al. (2002) e Elekonich et al. (2003), respectivamente. Os gráficos dos títulos de HJ e ecdisteróides foram desenhados com base em estudos utilizando metodologias diferentes e por isso, devem ser considerados relativos. Fases: L2, L3 e L4 representam o 2°, 3° e 4° estágios larvais, respectivamente. O 5° estágio larval está subdividido em progressivas fases de alimentação (F1, F2 e F3), tecelagem do casulo (S1, S2 e S3) e estágio pré-pupal (PP1, PP2 e PP3). Pw, Pp, Pb, Pbm e Pbd, correspondem a fases sucessivas de pigmentação dos olhos e cutícula.

A quantificação dos níveis de transcritos no estágio adulto de operárias está mostrado na figura 12A, os dados estão calibrados contra o maior nível de expressão, abelhas de 5 dias de idade. Foi observado que os níveis de mRNA de *Amjhe* aumentam logo após a emergência das abelhas alcançando os níveis máximos em 5 e 10 dias de vida, um período quando as abelhas executam tarefas intra-nidais. Logo após este período, os níveis de *Amjhe* diminuem coincidindo com a troca de tarefas intra-nidais para atividades de forrageamento, que se iniciam ao redor do 15º dia de vida adulta em abelhas *A. mellifera* européias (Winston, 1987).

O perfil de expressão temporal deste gene candidato, *Amjhe*, durante o estágio adulto, é consistente com as mudanças observadas nos títulos de HJ (Figura 12B); sendo os baixos títulos de HJ acompanhados por altos níveis de transcritos. Baixos títulos de HJ em abelhas adultas jovens são mantidos por uma baixa taxa de atividade de síntese nos *corpora allata* (Huang et al. 1991; Robinson et al., 1992), o aumento de transcritos do gene *Amjhe* está em concerto com essas observações. Quando as operárias atingem o momento da transição do estágio de nutrízes para forrageiras os níveis de HJ aumentam (Huang e Robinson, 1996; Amdam e Omholt, 2003) e se mantêm alto até o resto da vida adulta. Níveis basais de ecdisteróides são detectados durante a vida adulta, a julgar pelos níveis baixos deste hormônio na vida adulta, nenhuma regulação por ele é esperada.

Figura 12 – (A) Quantificação relativa (RQ) dos níveis de *Amjhe* durante a vida adulta de operárias, avaliada por RT-PCR em tempo real de abelhas com 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 dias de vida adulta. Cada coluna representa a média de duas amostras independentes, cada uma preparada com três indivíduos adultos. O controle endógeno foi feito utilizando-se a expressão de *rp49*. (B) níveis de HJ e ecdisteróides durante o estágio de vida adulta, dados obtidos de Huang et al. (1991), Robinson et al. (1991), Jassim et al. (2000) e Hartfelder et al. (2002). Os gráficos foram desenhados a partir de valores obtidos por metodologias diferentes e, portanto, devem ser considerados relativos.

4.2.3 Efeito da manipulação hormonal sobre a expressão de *Amjhe*

As análises comparativas entre os títulos de HJ e ecdisteróides sobre os níveis de transcritos do gene *Amjhe* sugere uma ação regulatória destes hormônios morfogenéticos sobre o gene em questão nos períodos larval e pupal. Tratamentos hormonais foram feitos para verificar a influência dos hormônios morfogenéticos sobre os níveis de expressão do gene da *Amjhe* e assim testar nossa hipótese que este gene é regulado positivamente pelo HJ e negativamente por ecdisteróides.

O efeito do HJ foi analisado em dois experimentos diferentes: (1) adição de 10 µg HJ-III, utilizando um tratamento tópico, em larvas no estágio S1 imediatamente antes da queda dos níveis de *Amjhe* (Figura 11A) que ocorre naturalmente 24 horas depois, já no estágio S2. A aplicação de HJ-III aumentou os níveis de expressão de *Amjhe* em relação aos controles 24 horas após o tratamento (Figura 13A - $P=0,001$; *t-test*); (2) o HJ-III foi capaz de ativar a expressão do gene *Amjhe* em um segundo experimento cuja adição de 1 µg deste hormônio em 1 ml de meio de cultivo contendo três larvas (sem intestino e cabeça) no estágio F1 causou o aumento dos níveis de transcritos do gene de interesse em relação aos controles, quando as amostras foram deixadas 4 horas sobre tratamento (Figura 13B – $P=0,001$; *t-test*). Os resultados indicam que altos níveis de HJ, como no caso de larvas jovens, causam a ativação do gene *Amjhe*, que como resultado, promove a degradação do HJ na hemolinfa das larvas de abelhas.

Em outro experimento, foi investigado o efeito do tratamento exógeno de ecdisteróides sobre os níveis de transcritos de *Amjhe*. As análises de quantificação do transcrito durante o desenvolvimento pós-embriônico sugeriam que os ecdisteróides pudessem regular negativamente os níveis de expressão do gene *Amjhe*, como sugerido

nas fases de pré-pupa e durante o estágio pupal (Figura 13A). Está hipótese foi testada injetando-se 1 µg 20E (20-hidroxiecdisona) em pupas de olho marrom (Pb), quando os títulos de ecdisteróides estão normalmente em declínio para permitir a progressão da transição pupa-adulto. A intenção foi de manter níveis altos de ecdisteróides, o que segundo nossa hipótese, manteria baixos os níveis de transcrito de *Amjhe*; neste período, os títulos de HJ são basais, sendo que, efeitos de regulação positiva deste hormônio sobre os níveis de transcrito do gene de interesse não era esperado. Após as análises de quantificação dos níveis de transcritos, foi detectado que os ecdisteróides têm efeito negativo sobre a regulação dos níveis de transcrição do gene *Amjhe*, pois, as análises após 24 e 48 horas indicaram diminuição nos níveis de transcrito, ocorrendo uma recuperação gradual após 72 horas da injeção (Figura 13C). Estes resultados indicam, não apenas que os ecdisteróides agem sobre os níveis de transcrição do gene *Amjhe*, mas também que o hormônio sintético injetado é gradualmente inativado nos três dias subsequentes ao tratamento. Uma terceira conclusão que pode ser tirada destes experimentos, é que a ação negativa dos ecdisteróides sobre os níveis de transcritos de *Amjhe* pode estar contrabalanceando o efeito positivo do HJ, o que poderia explicar os baixos níveis de transcritos encontrados no período pré-pupal, quando altos níveis de HJ e ecdisteróides são encontrados (Figura 11C).

Figura 13 – Efeitos do tratamento com HJ-III e 20-hidroxiecdisona sobre os níveis de transcritos de *Amjhe*. (A) tratamento em larvas de 5º estágio no início da fase de tecelagem de casulo (S1) com 10 µg de HJ-III. O RNA total foi extraído e quantificado após 24 horas após o tratamento. Os controles foram deixados sem tratamento ou tratados com o solvente do HJ, acetona, a amostra representa um *pool*. (B) tratamento em larvas de 5º estágio no início da fase de alimentação (F1) em meio de cultivo para insetos (Rachinsky e Hartfelder, 1998) contendo 1 µg de HJ-III ou 1 µl do solvente de HJ, acetona. O RNA total foi extraído e quantificado após 4 horas após o tratamento. Um asterisco indica diferenças estatísticas significativas nos níveis de transcrito (*t-test*; $P=0,001$). (C) Níveis de transcritos analisados por RT-PCR e *Southern blot* (Santos, 2004 – Dissertação de mestrado). As análises mostraram que os níveis de transcritos são inibidos 24 e 48 horas após o tratamento, ocorrendo normalização dos níveis de mRNA após 72 horas após o tratamento. Os controles foram deixados sem tratamento (C), ou injetados com o solvente de 20E, etanol (Et). A expressão do gene de uma actina foi utilizada como controle endógeno para normalização.

4.2.4 Silenciamento do gene *Amjhe* e efeitos sobre os níveis de HJ

Para esta técnica nós sintetizamos dsRNA de um fragmento do gene *Amjhe* que foi posteriormente injetado em abelhas de 4 dias de vida adulta (10 µg), enquanto os controles constituíam-se de abelhas recebendo GFPdsRNA (10 µg) ou permanecendo sem tratamento. Nós injetamos dsRNA em abelhas de 4 dias, pois, no início dos experimentos foi observada uma alta mortalidade em abelhas recém-nascidas injetadas com dsRNA quando estas completavam entre 2 a 4 dias de injeção, mesmo em concentrações menores de dsRNA (1 ou 5 µg) (Tabela V). Abelhas recém-emergidas mostraram ser bem menos resistentes ao tratamento em estudos prévios (Amdam et al., 2003a). A alta mortalidade inicialmente observada quando as injeções foram feitas em abelhas recém-emergidas, pode ter sido provocada devido à necessidade de um aumento nos níveis de HJ que formam um pequeno pico entre 2 e 3 dias após a emergência (Jassim et al., 2000) (ver Figura 12B). A função deste pequeno pico de HJ ainda precisa ser elucidada, mas ele pode estar relacionado à entrada da vida adulta.

Tabela V – Tabela mostrando a mortalidade de abelhas operárias injetadas com o JHEdsRNA e controles injetado com GFPdsRNA ou deixado sem tratamento (controle). Os dados referem-se a quatro experimentos diferentes.

Grupos	Número de abelhas tratadas	Mortalidade			
		1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
Experimento 1 – 5 µg de dsRNA em operárias recém-nascidas					
Controle	15	0	0	0	-
GFPdsRNA	25	4	2	19	-
JHEdsRNA	25	3	2	20	-
Experimento 2 – 5 µg de dsRNA em operárias recém-nascidas					
Controle	10	0	0	-	-
GFPdsRNA	15	0	15	-	-
JHEdsRNA	21	7	14	-	-
Experimento 3 – 3 µg de dsRNA em operárias recém-nascidas					
Controle	25	0	3	-	-
GFPdsRNA	26	6	20	-	-
JHEdsRNA	24	11	13	-	-
Experimento 4 – 1 µg de dsRNA em operárias com 1 dia de via adulta					
Controle	20	0	0	0	0
GFPdsRNA	40	11	9	3	15
JHEdsRNA	40	3	7	4	21

Assim como esperado, a injeção de dsRNA significativamente reduziu os níveis de transcritos de *Amjhe* quando comparado com os controles injetados com GFP ou não tratados (Figura 14A; ANOVA e *post hoc* test Dunn's, $P < 0.001$). Os níveis de HJ na hemolinfa de abelhas *knock-down* para *Amjhe* foram três e seis vezes superiores aos dos controles injetados com GFP ou não tratados, respectivamente (Figura 14B; ANOVA e *post hoc* test Dunn's, $P < 0.001$) sugerindo que uma redução em longo prazo do gene de estudo (*Amjhe*) causa um efeito dramático sobre os títulos de HJ em *A. mellifera*.

Uma observação incontestável é a redução dos níveis de transcrito de *Amjhe* quando GFPdsRNA é injetado, que é significante quando comparada aos controles sem tratamento. Este efeito é similar a efeitos observados em outros estudos quando o

nocaute do gene codificador de vitelogenina (Vg) de *A. mellifera* foi realizado pela técnica de RNAi (Amdam et al., 2007). Devido à importância da interação entre títulos de HJ e níveis de Vg na hemolinfa, a injeção de GFPdsRNA pode ter causado um efeito colateral sobre os níveis desta proteína. Por esta razão, os níveis de transcritos de vitelogenina foram analisados nas amostras. Quando comparados aos controles sem tratamento, os controles injetados com GFPdsRNA provocaram uma significativa redução nos níveis de transcritos, mas não foram diferentes das amostras injetadas com o dsRNA para JHE (Figure 14C; ANOVA - post-hoc: Dunn's; $P < 0.001$). Os níveis de vitelogenina na hemolinfa das mesmas amostras foram analisados por SDS-PAGE. Esses resultados foram condizentes com os resultados encontrados para a expressão do gene. Neste caso os níveis de uma lipoforina (ApoLp-I) podem ser utilizados para normalização, pois, não variam entre as amostras dos diferentes grupos (Figura 14D).

Figura 14 – (A) Efeitos da interferência pelo dsRNA (RNAi) sobre os níveis de transcrito do gene *Amjhe* por RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) em abelhas de 4 dias de idade injetadas com 10 μg de JHEdsRNA ou GFPdsRNA (controle I) ou deixadas sem tratamento (controle II). As abelhas foram coletadas 5 dias após a injeção. (B) Títulos de HJ na hemolinfa por radioimunoensaio e (C) níveis de transcrito de vitelogenina (*Vg*). As barras representam médias ± erro padrão; o número de amostras individuais (N) está representado sobre as barras; letras diferentes mostram diferenças significativas entre amostras (ANOVA *on ranks*, Dunn's post hoc test, $P < 0.001$). (D) Perfil de vitelogenina (*Vg*) e lipoforina (apoLp-I) presente em 1 μl de hemolinfa por SDS-PAGE.

Devido ao fato da grande similaridade entre as carboxiesterases descritas e identificadas em *A. mellifera*, os níveis de transcritos de três carboxiesterases foram analisados para que qualquer efeito de silenciamento inespecífico pudesse ser afastado. Nós executamos análises de múltiplo alinhamento na região contida entre os *primers* utilizados para a síntese de JHEdsRNA. Nenhum alinhamento ininterrupto maior que 20pb foi localizado entre as carboxiesterases e o **GB15327** (gene de interesse), o único *match* de 20pb foi localizado para o **GB10820**, que aparentemente é uma duplicação do **GB15327**. Esta é uma forte evidência *in silico* forte de que o nocaute seja específico, no entanto, três carboxiesterases (**GB10820**, **GB11403** e **GB13602**) foram analisadas por SqRT-PCR seguida de gel de agarose 1%, pois, estas mostraram ter alta similaridade ao GB15327. Não foram encontradas diferenças nos níveis de transcrito para os genes analisados entre o controle sem tratamento, controle injetado com GFPdsRNA ou abelhas tratadas com JHEdsRNA (Figura 15). Este resultado sugere uma alta especificidade para o silenciamento gênico desta forte candidata a ser a JHE de *A. mellifera*. No entanto, nós não podemos afastar um efeito inespecífico sobre as demais carboxiesterases que são menos similares ao **GB15327** em suas seqüências de aminoácidos.

Figura 15 – Géis de agarose 1% corados com EtBr mostrando os níveis de transcritos de 3 carboxiesterases para amostras de cDNA produzidas a partir de RNA total extraídos de abelhas de 4 dias de idade injetadas com 10 μ g de JHEdsRNA ou 10 μ g de GFPdsRNA ou deixadas sem tratamento e coletadas 5 dias após o procedimento. Estes genes foram analisados por serem similares ao gene correspondente ao GB15327 (JHE), que foi nocauteado neste experimento. (M): marcador de peso molecular. (C-) controle negativo das reações de PCR.

4.3 Identificação do gene da epóxido hidrolase do hormônio juvenil

Um trecho de 260 nucleotídeos do gene da epóxido hidrolase do hormônio juvenil (JHEH) foi obtido através de amplificação por PCR utilizando-se *primers* degenerados, estes foram desenhados a partir da homologia de quatro seqüências de insetos depositadas no GenBank (*B. mori*, *D. melanogaster*, *C. felis* e *A. aegypti*). Esta seqüência inicial foi utilizada para buscas contra as seqüências preditas a partir do genoma de *A. mellifera*. Identificamos uma seqüência de 1668pb e 446 aa depositada no GenBank (cDNA: **XM_394922**; proteína: **XP_394922**). A seqüência foi utilizada como “query” em busca no NCBI Conserved Domain Search. Os resultados revelaram o domínio conservado de epóxido hidrolases N-terminal (*pfam06441*, *EHN*) e de α/β hidrolases (*pfam00561*, *Abhydrolase_1*, *alpha/beta hydrolase fold*) (Figura 16A).

Um alinhamento da seqüência deduzida da JHEH de *A. mellifera* e outras EH de insetos está mostrado na figura 16B. O tamanho das proteínas variou entre 387 e 462 aminoácidos. As seqüências idênticas entre a AmJHEH e outras JHEHs mostraram similaridades significantes que se estenderam sobre toda a seqüência, demonstrada pela presença de 54 aminoácidos estritamente conservados em todas as proteínas analisadas. O alinhamento sugere que a AmJHEH compartilha importantes características com as EHs de outros organismos. A AmJHEH apresenta os três resíduos do sítio ativo que formam a tríade catalítica das EHs (Morisseau e Hammock, 2005). As posições da tríade catalítica na seqüência de *A. mellifera* são: Asp²¹⁴, Glu³⁹⁰ e His⁴¹⁷ (Fig. 16B). Além disto, a AmJHEH possui o motivo HGXP e duas tirosinas (posições Tyr²⁸⁴ e Tyr³⁴⁷ em AmJHEH), que servem como parte do *oxyanion hole* das EHs (Morisseau e Hammock, 2005). A tríade catalítica Asp-Asp-His é mais comum em EH solúveis

(sEH), enquanto EH microsossomais possuem a tríade Asp-Glu-His, como acontece na sequência de *A. mellifera* (*Op.Cit.*).

A

B

```

TnI      1  ----MGRLIFIVPVLAIVLIPVYLFLQGPPELLELDLYNEWGPEESGKQKQ-----DTSVRPFKINSGENIVKDLKDR
TnII     1  ----MARLLFILPVLAIVFIPVYLFLQSPPPVENVDMDNWGPESAKEKQ-----DTSIRPFKISGNNNVKDLKDR
Bm       1  ----MSRLFIAPLLVLASIPLYLLVKSPPPEMKLDLEBWGPPELKQKQ-----DTSIKPFKIFITSEIMVKELKER
Ms       1  ----MYKILSSFVAGVAIGSGLVITYVLYNVPEPELPLQRWNGIGTRPTEE-----DKSIRPFSDINDIVLIDLKDR
CfI      1  ----MSNCCRIWIAIVIGGVLVYEITKEFPKENPLDTWWGIG-KSOKI-----DTSMRPFKIAINDVLTNLKVK
CfII     1  ----MGCCRMLIFAALAGAVLYQITKELPKENIPLDTWWGPG-KPONV-----DISIRPFKININNKVIEHLKVK
Ar       1  ----MTIKYSLIGVGLIYGISLFLNQGNGOKAPKLGDOWNWGP-GKEOKI-----VKDVVPFKVNSKGDIEDLKDR
DmI      1  --MGVTVKIIVVILAIAGCLVYRNVTQIWADLPAFKLDPCEBWGDEAQPKDYEAYLKNSEVIGNLSIPDKTIADLKDR
DmII     1  --MANIWPRIIVGALTILVAVGYKNRDLSPAGKREDHNNAMWGTILKEP-----YRENKALLPFDISVKPEVIEDLIGQ
DmIII    1  MKCLIVFGLIVAFGAFVGYGYVVDLTKPLKKEFEKDDTWWGPGDAKD----FVPDEKITYEFLQVPOSEVDLKE
Aa       1  --MGFAGFVLTFTLLVGVLFKVFQDLSPAAIALDYCEWGPQDVKN-----NKEVPEKSPENLGGDVIGKLNRR
Am       1  -----MYFHFYILFSVNELNVPTLPETNWGSK-KNEKE-----SIEIRPFKIDVSKSVLDDLKVR

```

```

TnI      70  LKRRTRPLTPPLEGVCFEYGFNTNEINSLWKYWAECYN--FKERETELNCFPQFKTNIQGLDIHFIRVTP----KVPAGVQ
TnII     70  LQRRTRPLTPPLEGVCFEYGFNTNEINSLWKYWAEDYN--FKERETELNCFPQFKTNIQGLDIHFIRVTP----KVPQGV
Bm       71  LKRRRPTAPPLEGVCFKYGFNSKOLDNLKYWAEEYP--FAERCKELNCFPQFKTNIQGLDIHFMRITP----KVPKDV
Ms       71  LKNRRPTAPPLEGINSEYGMNTEYLETLYEYWLNBYN--FKRAELLNCFPQFKTNIQGLDIHFIRVTP----EIKEGVQ
CfI      69  LLS-DVSFTTPPLEGIDFYGFNNTNLKKLVDFWRTQYN--WRERALLNCFPQFKTNIQGLDIHYVHIK----QVSKNIE
CfII     69  LN-DVQYTLPLEGINFEYGFNTDSKKLVDFWRTQYN--WRERALLNCFPQFKTNIQGLDIHYVHIK----QVSKNIE
Ar       68  LKNTRNLTPALENAGWTYGVGKFKPKIVDYWLNKYD--FKKREQLNCFPQFKTNIQGLDIHFIRVTP----KNSGGKR
DmI      79  LNRTRLTPPLEGVAFEYGFNTNYLKEVVEYWRDDYLPRWREREVELWQFNHFTDIQGLRTHFHLMVYD-DN-KVGKK
DmII     75  LSRPLKAQAPLEGVCFYGFNANBLAKVVKYWRDYLTPKWSEREVELKRLDHYQTEIQGLKTHFHIAKESQ-VKGQKPK
DmIII    76  LNETLRLTEPLDGLAFYGFNTYALEQFVDYWRDNLTKWDERCELFNSFKYKTEIQGLNHYIHEKQVSE-EA-KEKKE
Aa       74  LDDVPKFAEPLEGFAFEYGFNSKKLGEILKYWRSDYLERWDERCKYLNRFQFKTNIQGLDIHFIRVKEV-QN---PKR
Am       56  LAHRRTEKKPLENVGWTYGISITTYLNTVLDYWRDKYN--WTERCALLNCFPQFKTNIQGLDIHFIRVTP----NLPNNK

```

```

TnI      144  VVPLLLHGWPGSVREFYESIPLLTAVS--KDRDFALEVIIVPSLPGYGFSDGAVRPGMGAPHIGIIMRNLMNRLGKRYF
TnII     144  VVPLLLHGWPGSVREFYEAIPLLTAVS--KDRDFAFEVIIVPSLPGYGFSDGAVRPGMGAPQIGVIMNLMNRLGKQFY
Bm       145  IVPLLLHGWPGSVREFYEAIPLLTAVS--RDRFALEVIIVPSLPGYGFSDGAVRPGMGAAAVAVIFKNNLMNRLGKQFY
Ms       145  VLPLLLMHGWPGSSSEFEQDKVIPILTTPK--HYNIVFEVVAVDLPGYGFSECTNPGINPVQIGVMRNLMNRLGFEKFY
CfI      142  VLPIMIVHGWPGSVFEFYKIIIPMLTTPR--TDYNFVFELIIPSLPGYGFSDGAAAPGLGATQIAVIMNLMNRLGFKKYY
CfII     142  VLPIMIVHGWPGSVFEFYKIIIPMLTTPR--AGYNFVFELIIPSLPGYGFSDGAAAPGLGSTQVAVIMNLMNRLGFKKYY
Ar       142  VLPLLLHGWPGSVFEFYKIIIPMLTTPR--DDYDFVFEVIAPSLPGYGFSDGAVRPGMGAAQIAVILNLMNRLGFKNFY
DmI      157  HYPVLLHGWPGSVREFYDFTHLHQTNDLNKYYIFNVVPSLPGYGFSDGTSRKGGLGPAQVAVIMNLMNRLGKNKFF
DmII     154  VLPLLLHGWPGTVREFYDFIPLLTTP--SDKSDYVFEVIAPSLPGYGFSDGSSSTIGFQVAVAVIMNLMNRLGFGDKFL
DmIII    154  VVPLLLHGWPGSVREFSDFIPLMTKHS--NITDVAFEVVAVPSLVGYGMSDAATRECFNAAEMATVMRNLMNRLGKHKFF
Aa       150  IVPLLLHGWPGSVQKFYEIIPRIIVARS--DDKEYVFEVIIVPSLPGYGFSDGASKQGLSPAKIAVIMNLMNRLGFKKYY
Am       132  VLPLLLHGWPGSVFEFKIIPMLTKPW--PNQNFVFEVIIVPSLPGYGFSDGAVRPGMGAAQIAVIFKNNLMNRLGFEKFY

```

HGXP motif

```

TnI      222  VQGGDWGSVIGTSLATFFPEVVLGYHANIGVLSKAMWQALGSVWPSLIMDDLSLVRITYPLSKTSLFQVRESGYLHI
TnII     222  VQGGDWGALIGNCHVTLFPKDLGCHTNMPVMSAKSTFELLGSGVFPSSLIEDMSTYRLVPLSTRFANLRETGYMHI
Bm       223  VQGGDWGALIGSAMATSPFKENIGHSMATLSAATFLEFVGALFPSSLVEPELANR-LYPLSEKYSTLEELGYMHI
Ms       223  VQAGDWGSCCATHMATLFPDVLGCHTNMPSSRELSTVKLFICALFPSSLVDKAYMDR-LYPLKNLSYILRETGYFHI
CfI      220  VQGGDWGSRIVSAMSTLPPENVLGHSHNLCLNLTLSSNKKSFVGSLLFEWFAGKQNVHK-LYPLSEHFTLLEESGYFHI
CfII     220  VQGGDWGSMIISAMSTLPPENVLGHSHNMCFVNIPSSNIKALIGSFFPESFAGTGNHAK-NYPMSEHFTLLEEMGYLHI
Ar       220  VQGGDWGATITAHMAVLFPPEVVLGHSHNMCAVLQDTFFFTYLYSYWPSLLVPDEDVHL-MYPLSKKSRSTEETGYFHI
DmI      237  VQGGDWGSTIGSNLATLPPENVLGHSHNMNLSKSLAKGLVAEFFWPSLFPVS-GFEFFFPKSNEMRYLLEESGYFHI
DmII     232  VQGGDWGSTIGSNLASLPPENVLGHSHNMGNNSPMGOLKMLASFFPSPWFVDS-EYADFYKGLGHLSTIMEEMGYAHI
DmIII    232  VQGGDWGSTIGSNLATLPPENVLGHSHNMVLTHTPLATIKGLYGSFFPEKYTPSRFFVCHHFPVWDKMLELLEESGYFHI
Aa       228  VQGGDWGSVIGNLMATEFQDVLGVHLTMCNTAIGTLKNLLGAVAPSLVVS-QYKFFYPYLPRLKLLAETGYMHI
Am       210  VQGGDWGSVIASDMAVLFPPEKILGLHNNMCTSLNLSNLFWLVGYFYFSSLGANEHYSK-FPPVSEILSFLLEESGYFHI

```

*(Asp)
CT

*(Tyr)

[illegible]

Figure 16 – (A) Domínios conservados da AmJHEH de *A. mellifera*, resultados do NCBI Conserved Domain Search. (B) Alinhamento da sequência deduzida da JHEH de *A. mellifera* (número de acesso no GenBank: **XP394922**) com outras EHs de insetos. TnI: *Tricoplusia ni* microsomal EH (**AAB18243**), TnII: *T. ni* EH (**AAB88192**), Bm: *Bombyx mori* JHEH (**AAQ87024**), Ms: *Manduca sexta* JHEH (**Q25489**), Cfl: *Ctenocephalides felis* JHEH I (**AF503909**), CflII: *C. felis* JHEH II (**AF503908**), Ar: *Athalia rosae* JHEH (**BAE48505**), DmI: *Drosophila melanogaster* JHEH I (**AF517545**), DmII: *D. melanogaster* JHEH II (**AF517546**), DmIII: *D. melanogaster* JHEH III (**AF517547**) e Aa: *A. aegypti* variante II (**AAO52658**). Os resultados do alinhamento foram obtidos utilizando-se o programa BOXSHADE e formato *Aln* após alinhamento pelo programa ClustalW. As posições conservadas estão sombreadas e os números das posições dos aminoácidos indicados na margem esquerda. Os três aminoácidos que formam a tríade catalítica (CT) e as duas posições de tirosina conservadas estão marcados com um asterisco. Também está representado o motivo HGXP.

A JHEH tem sido apontada como uma enzima de suma importância para o processo de degradação do HJ, tendo apresentado uma função essencial em *Bombyx mori* (Zhang et al., 2005), *Helicoverpa zea* (Khalil et al., 2006) e *Culex quinquefasciatus* (Lassiter et al., 1996). No genoma de *A. mellifera* apenas uma única epóxido hidrolase foi encontrada, esta sequência possui dois motivos transmembranas putativos preditos com base nas análises feitas pelo programa *TMpred Server*, que são característicos de enzimas microssomais, classe a que faz parte a JHEH de insetos (Tabela VI). Outras JHEH analisadas possuem sequências que fortemente indicam a presença de motivos transmembranas.

As JHEHs descritas para outros insetos foram analisadas em relação à presença de peptídeo sinal utilizando-se o programa *Signal 3.0 Server*. Em *A. mellifera* não foi detectado nenhum peptídeo sinal na sequência AmJHEH. Apesar de algumas sequências revelarem a presença do sítio de clivagem e de um peptídeo sinal, os valores de probabilidade foram muito baixos para a maioria das sequências analisadas (Tabela VI). As análises de localização da proteína AmJHEH foram feitas utilizando-se amostras de corpo gorduroso e também hemolinfa; nestas análises a AmJHEH não foi localizada na hemolinfa, sugerindo então, que esta proteína não é solúvel, devendo, portanto, atuar nos tecidos em *A. mellifera*. A sequência utilizada para estas análises foi predita automaticamente pelo método GNOMON, utilizado para predições a partir do genoma sequenciado de *A. mellifera*. A sequência desta abelha é um pouco mais curta do que as sequências comparadas (Tabela VI). Não podemos descartar a hipótese de que um erro na anotação da AmJHEH possa ter ocorrido, o que explicaria o tamanho reduzido desta proteína.

Tabela VI – Características das epóxido hidrolases do HJ (JHEH) de insetos. Posição e probabilidade (P) do sítio de clivagem do peptídeo sinal, quando presente, de acordo com resultados do programa *Signal 3.0 Server*. Posição e *score* dos motivos transmembrana de acordo com resultados do programa *TMpred*, foram considerados motivos transmembrana aqueles com *score* maior que 500. Número de aminoácidos de cada uma das proteínas (aa).

Espécie	Número de acesso	Peptídeo Sinal		Motivos Transmembrana		aa
		Posição	P	Posição	Score	
<i>Apis mellifera</i>	XP_394922	-	-	77-95/246-271	503/1715	446
<i>Ctenocephalides felis</i>	AAM22695	17/18	0.007	3-21/143-168	2027/549	465
<i>C. felis</i>	AAM22694	19/20	0.025	4-23/220-243	1753/797	464
<i>Athalia rosae</i>	BAE48505	20/21	0.115	3-21/218-238	1894/890	463
<i>Bombyx mori</i>	AAQ87024	15/16	0.378	4-24/222-240/ 244-274	2255/723/ 1103	461
<i>D. pseudoobscura</i>	EAL25252	28/29	0.608	3-23/213-231/ 235-254/275-292	2099/547 636/1251	474
<i>D. melanogaster</i>	AAM88327	28/29	0.428	2-20/235-254	1603/954	474
<i>Trichoplusia ni</i>	AAB18243	23/24	0.601	4-23/138-147/ 220-239/253-273	2241/548 1029/1091	463
<i>Manduca sexta</i>	Q25489	17/18	0.276	4-25/258-279	2152/578	462
<i>D. melanogaster II</i>	AAM88328	20/21	0.638	1-24/230-249	1277/851	463
<i>Aedes aegypti</i>	AAO52658	24/25	0.149	4-23/227-245	1724/795	462

O protocolo de RT-PCR semiquantitativa foi utilizado para estudos de expressão do gene *Amjheh* durante estágios representativos do desenvolvimento de operárias de *A. mellifera*. Altos níveis de transcrito do gene *Amjheh* foram encontrados no 5º estágio larval, durante a fase de alimentação (F1-F3) e no início da fase de tecelagem do casulo (S1-S2) (Figura 17). Na metade do 5º estágio larval (S3) os níveis de transcritos de *Amjheh* caem drasticamente mantendo-se baixos durante todo o estágio pré-pupal (PP1 – PP3) e pupal. Os níveis de transcrição aumentam ao fim do estágio pupal (Pbd; pupal com olho marrom e corpo fortemente pigmentado) (Figura 17A). Ao traçarmos o perfil de expressão de *Amjheh* e o compararmos com os níveis de transcrito de *Amjhe* durante o desenvolvimento pós-embrionário de operárias, podemos afirmar

que os perfis são bastante similares, porém a expressão de *Amjheh* não é tão acentuada na fase F3 quanto *Amjhe* (ver Figura 11A para níveis de transcrito de *Amjhe*).

Os níveis da proteína AmJHEH foram estudados durante o quinto estágio larval, para comparação entre níveis de transcrição e tradução do gene. Para tanto, foi utilizada a técnica de *western blot* e anticorpo específico anti-JHEH produzido neste trabalho. As análises revelaram uma única proteína correspondendo à massa molecular de aproximadamente 50 KDa. A AmJHEH foi localizada em todas as fases analisadas com a mesma intensidade, com exceção do início do 5º estágio larval (F1), cujos níveis de AmJHEH no corpo gorduroso são menores em relação às demais fases (Figura 17B). Os resultados mostraram que apesar da queda nos níveis de transcrição de *Amjheh* do meio para o fim do estágio larval, a proteína se mantém presente no corpo gorduroso até o fim do estágio larval (PP3) (Figura 17B). Ao contrário do que acontece com os níveis de transcritos de *Amjhe*, cujos níveis da proteína na hemolinfa correspondem aos níveis de transcritos (Figuras 11A e 11B). Provavelmente, a JHEH esteja realizando a função de retirada do HJ no CG, mesmo no estágio pré-pupal, quando um alto pico de HJ é observado na hemolinfa (Figura 17C).

O gene *Amjhe* mostrou previamente ser regulado negativamente por ecdisteróides e positivamente por HJ (Figura 13). Devido ao fato do perfil de expressão de *Amjheh* ser bastante similar ao do gene *Amjhe*, a atuação dos hormônios morfogenéticos, 20E e HJ-III, foi também testada para este gene. Foi realizada a quantificação de transcritos de *Amjheh* nas mesmas amostras dos tratamentos com hormônios exógenos realizados previamente para o gene *Amjhe*, no entanto os níveis de mRNA de *Amjheh* não foram alterados em nenhum dos experimentos (dados não mostrados).

Figura 17 – Níveis de AmJHEH e *Amjheh* durante o desenvolvimento pós-embriônico de operárias de *A. mellifera* e sua relação com os títulos de hormônios morfogênicos. (A) RT-PCR semiquantitativa para quantificação dos níveis de transcritos de *Amjheh*, utilizando-se a expressão do gene da actina como controle endógeno das reações. (B) Quantificação dos níveis de AmJHEH no corpo gorduroso de operárias durante o quinto estágio larval. Cada amostra corresponde a um *pool* de 10 indivíduos. Neste experimento, 50 μ g de proteína total foram utilizados para o procedimento de SDS-PAGE, seguido de *western blot* utilizando anticorpo específico para esta proteína. (C) Níveis de hormônio juvenil e ecdisteróides na hemolinfa de operárias durante o desenvolvimento pós-embriônico. Os títulos de HJ e ecdisteróides no estágio larval foram baseados em dados de Rembold (1987) e Elekonich et al. (2003) (para o 2°, 3° e 4° estágio), e Rachinsky et al. (1990) (para o 5° estágio). O gráfico mostrando os níveis de ecdisteróides e HJ no estágio pupal representam dados de Pinto et al. (2002) e Elekonich et al. (2003), respectivamente. Os gráficos dos títulos de HJ e ecdisteróides foram desenhados com base em estudos utilizando metodologias diferentes e por isso, devem ser considerados relativos. Fases: L2, L3 e L4 representam o 2°, 3° e 4° estágios larvais, respectivamente. O 5° estágio larval está subdividido em progressivas fases de alimentação (F1, F2 e F3), tecelagem do casulo (S1, S2 e S3) e estágio pré-pupal (PP1, PP2 e PP3). Pw, Pp, Pb, Pbl, Pbm e Pbd, correspondem a fases sucessivas de pigmentação dos olhos e cutícula.

4.4 Diferenciação de castas e a degradação do hormônio juvenil

Os níveis de transcritos dos genes *Amjhe* e *Amjheh* foram analisados durante o quinto estágio larval de rainhas e operárias por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR). As análises permitiram o estabelecimento de uma relação direta entre o nível de transcritos dos genes de degradação do HJ e a manutenção de seus títulos. Uma vez que os níveis de HJ são diferentes entre as castas, uma atividade diferencial dos genes *Amjhe* e *Amjheh* permite a diferenciação das castas em *A. mellifera*. Operárias mostraram maiores níveis de transcrito de *Amjhe* no início do quinto estágio (F1) em relação às rainhas. Após a fase F3, ou seja, no final do período de alimentação, os níveis de transcritos de *Amjhe* em operárias sofrem uma queda considerável ao mesmo tempo em que os níveis em rainhas aumentam (Figura 18A). No estágio pré-pupal tanto rainhas quanto operárias têm baixos níveis de transcritos de *Amjhe*, corroborando com as análises anteriores de quantificação de transcritos no desenvolvimento pós-embrionário de operárias para o gene *Amjhe* (Figura 11A).

Em relação à expressão do gene *Amjheh* os níveis de transcritos são maiores em rainhas na primeira metade do quinto estágio (F1-F3 e S1-S3). Os níveis de transcritos caem drasticamente no período pré-pupal de ambas as castas (PP1-PP3) (Figura 18B). As análises corroboram com os resultados obtidos anteriormente quanto à quantificação do número de transcritos durante o desenvolvimento pós-embrionário de operárias para o gene *Amjheh* (Figura 17A). Para ambos os genes, *Amjhe* e *Amjheh*, ocorre uma queda nos níveis de transcritos no estágio pré-pupal.

Figura 18 – Quantificação relativa dos níveis de transcrito dos genes codificadores da esterase do hormônio juvenil (*Amjhe*) e epóxido hidrolase do hormônio juvenil (*Amjheh*) durante o 5º estágio larval de operárias e rainhas de *A. mellifera*. O 5º estágio foi subdividido em nove fases: larvas em fase de alimentação (F1-F3), larvas em fase de tecelagem do casulo (S1-S3) e pré-pupas (PP1-PP3). As análises foram feitas em triplicata por RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) utilizando os níveis de transcritos do gene da actina como controle endógeno; neste caso cada ponto representa um *pool* de três indivíduos.

As análises de quantificação de transcritos em larvas de rainhas e operárias mostraram um perfil casta-específico dos genes *Amjhe* e *Amjheh* e que a regulação destes genes pode estar envolvida com os títulos de HJ entre castas, que é maior em rainhas. Para o gene *Amjhe* o HJ já revelou ser um importante regulador para a indução da transcrição (Figura 13A e 13B), enquanto os ecdisteróides são capazes de diminuir a expressão deste gene (Figura 13C). No entanto, nossas análises não mostraram resposta nos níveis de transcrição de *Amjheh* em amostras tratadas com HJ ou 20E. Para testar os efeitos do tipo de alimentação sobre os níveis de AmJHEH no corpo gorduroso, larvas de rainhas e operárias foram manipuladas para receberem uma alimentação diferencial. Nosso objetivo foi alterar a alimentação à base de geléia real (alimento oferecido às larvas que se desenvolverão em rainhas) para “geléia de operárias” (alimento oferecido às larvas que se desenvolverão em operárias) e vice e versa durante o desenvolvimento larval e averiguar os níveis de AmJHEH no corpo gorduroso em resposta à manipulação do alimento. A figura 19A mostra o procedimento experimental e as mudanças causadas pelo tipo de alimento sobre os níveis de JHEH.

Os resultados mostraram baixos níveis de AmJHEH em larvas que receberam “geléia de operárias” durante os 4 dias de experimento. Níveis baixos de AmJHEH foram observados em larvas que receberam geléia real por 2 dias, mas que voltaram a alimentar-se de geléia de operárias por mais 2 dias (Figura 19B). Ao contrário, larvas que receberam geléia real por 4 dias ou larvas que receberam “geléia de operárias” por 2 dias iniciais, mas depois passaram a alimentar-se de geléia real, tiveram altos níveis de AmJHEH no corpo gorduroso (Figura 19B). Mesmo larvas que inicialmente foram alimentadas com “geléia de operárias” ao receberem geléia real tiveram os níveis de

AmJHEH aumentados rapidamente, alcançando os níveis de AmJHEH de larvas que receberam apenas alimentação com geléia real.

Figura 19 – Níveis de epóxido hidrolase do HJ (JHEH) no corpo gorduroso de larvas de abelhas *A. mellifera* com diferentes tipos de alimentação. Após 16 horas da eclosão as larvas foram transferidas (1º transferência) para realeiras ou permaneceram em células de operárias, após 48 horas metade de cada grupo foi transferida para células opostas (2º transferência). Ao final, foram coletados 4 grupos de larvas em amostras individuais de corpo gorduroso. Grupos: abelhas que permaneceram 4 dias em realeiras (4Ra), abelhas que permaneceram 2 dias em realeiras e 2 dias em células de operárias (2Ra2Op), abelhas que permaneceram 2 dias em células de operárias e mais 2 dias em células de rainhas (2Op2Ra) e abelhas que permaneceram 4 dias em células de operárias (4Op). As amostras de proteína (50 µg) foram separadas por SDS-PAGE e processadas por *Western blot* utilizando anticorpo anti-JHEH

Muitas são as diferenças morfológicas entre as castas, no entanto, o sistema reprodutor é um marco no processo de diferenciação de castas. Em *A. mellifera* são reconhecidas uma fêmea altamente fértil (rainha) que detêm a atividade reprodutiva e fêmeas facultativamente estéreis (operárias). O processo de diferenciação dos ovários ocorre desde o início do estágio larval (2º estágio), no entanto, é durante o 5º estágio larval que grandes mudanças na morfologia dos ovários podem ser observadas, este período é considerado por ser altamente sensível aos níveis de HJ, crítico para a indução do processo de diferenciação de castas. Neste período os ovariolos de operárias sofrem um intenso processo de morte celular, ao contrário dos ovariolos de rainhas, cujo processo de degeneração é inibido pela presença de altos níveis de HJ nesta casta (Schmidt-Capella e Hartfelder, 1998; 2002; Rembold, 1987; Kimura e Trumam, 1990; Rembold et al., 1992; Schwartz et al., 1993; Hartfelder e Engels, 1998). De um modo geral o sistema reprodutor tem desenvolvimento casta-específico, além do descrito em relação aos ovários, como exemplo pode também ser citado, o desenvolvimento da espermateca, apenas vestigial em operárias, enquanto em rainhas constitui um órgão bastante diferenciado e funcional (Silva, 2004).

Devido à grande importância do HJ sobre o processo de diferenciação de castas, os níveis de transcrição dos genes que atuam sobre a degradação deste hormônio foram analisados nos ovários de rainhas e operárias em fases do desenvolvimento larval quando o processo de diferenciação está ocorrendo.

Os níveis de transcritos foram muito superiores para ambos os genes (*Amjhe* e *Amjheh*) em ovários de larvas de operárias em relação às larvas de rainhas em todas as fases analisadas, sendo que os maiores níveis de transcritos ocorreram nas fases mais jovens (larva de 4º estágio, L4 e larva de 5º estágio em fase de tecelagem do casulo, S2)

(Figura 20). Os resultados revelaram que os níveis de transcrito de *Amjhe* e *Amjheh* podem ter uma participação sobre o processo de diferenciação dos ovários no período larval, sendo que as proteínas codificadas por este gene podem estar regulando os níveis de HJ neste importante órgão. Os ovários de rainhas devem estar protegidos do processo de degradação do HJ por enzimas específicas. O mecanismo de regulação da expressão de genes de degradação do HJ pode ser considerado como um mecanismo de proteção da estrutura dos ovários em rainhas.

Figura 20 – Quantificação relativa dos níveis de transcrito dos genes codificadores da esterase do hormônio juvenil (*Amjhe*) e epóxido hidrolase do hormônio juvenil (*Amjheh*) em ovários de operárias e rainhas de *A. mellifera*. Fases: larva de 4º estágio (L4), larvas de 5º estágio em fase de alimentação (F2), tecelagem do casulo (S1) e pré-pupa (PP3). As análises foram feitas por RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) utilizando os níveis de transcritos do gene da actina como controle endógeno; neste caso cada coluna representa uma amostra correspondendo a um *pool* de 20-25 pares de ovários cada.

4.5 Identificação de genes da via de síntese do hormônio juvenil

4.5.1 Análises *in silico*

Os ortólogos putativos para os genes da via de síntese do hormônio juvenil foram identificados utilizando-se as seqüências de *A. gambiae* e *D. melanogaster* para as buscas no banco de dados das seqüências anotadas pelo projeto genoma de *A. mellifera* (*Official Gene Set*). As seqüências de *A. gambiae* e *D. melanogaster* foram obtidas a partir de ESTs (Noriega et al., 2006). Nós selecionamos os genes codificadores de enzimas da via de síntese do mevalonato a partir de acetil-CoA: Acetoacetil CoA tiolase (ACT), Hidroximetilglutaril-CoA sintase (HMGS), Hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMGR), Mevalonato kinase (MK), Fosfomevalonato kinase (PMK), Isopentenil-difosfato delta-isomerase (IPPI) e Farnesil difosfato sintase (FPPS); da via de síntese específica do hormônio juvenil em insetos a partir de farnesil difosfato: Desidrogenase de cadeia curta (SCD), Ácido farnesóico *O*-metiltransferase homóloga à crustáceos (FAMeT), Metil transferase homóloga à metil transferase do hormônio juvenil ácido de *Bombyx mori* (MT) e Metil farnesoato epoxidase - CYP15 (MFE); de enzimas que participam do metabolismo mitocondrial Citrato (*si*)-sintase (CS), Proteína de transporte do citrato na mitocôndria (MCTP) e ATP citrato liase (ATPCL); e de enzimas envolvidas na porção de transferência do grupo metil: Metionina adenosil transferase (MAT), Adenosilhomocisteinase (AHC) e Adenosil kinase (AK). A figura 21 mostra os passos enzimáticos envolvendo a maioria destas enzimas na via de síntese de HJ.

Figura 21 – Esquema da via de síntese do hormônio juvenil a partir de acetil-CoA (acima) e detalhes da via de transferência da porção metil (abaixo). As enzimas estão em itálico. Fonte: Noriega et al. (2006).

Para todos os genes foi identificada apenas uma sequência, com exceção dos genes codificadores de enzimas de três passos metabólicos: a proteína de transporte do citrato da mitocôndria para o citosol (MCTP), a adenosilhomocisteinase (ACH) (responsável pela hidrólise de S-adenosil-L-homocisteína) e para a farnesil difosfato sintase (FPPS). Para as duas primeiras enzimas, foram identificados dois genes que tiveram maior similaridade com *A. gambiae* ou *D. melanogaster*. Em geral, o gene selecionado tinha alta similaridade com ambos os insetos, mas nesses dois casos, as sequências similares para cada inseto foram diferentes, por esta razão, os dois genes foram utilizados para as análises. Em relação à FPPS, foram identificados 7 genes com baixa similaridade com genes codificadores de FPPSs de outros insetos (Tabela VII). Os sete genes foram analisados neste trabalho.

As comparações envolvendo as putativas enzimas da síntese de HJ com sequências ortólogas de outros insetos revelaram identidade variando entre 34 e 92% (Tabela VII). Em geral a identidade entre os genes foi bastante alta, com exceção das sequências de FPPSs, metil transferase (MT) e metil farnesoato epoxidase (MFE). A FPPS 7 não tem similaridade significativa com a FPPS de nenhum inseto (Tabela VII).

Tabela VII – Identidade entre os genes codificadores de enzimas envolvidas na síntese do HJ em *A. mellifera* e outros insetos: *Drosophila melanogaster* (Dm), *Anopheles gambiae* (Ag), *Nazonia vitripennis* (Nv), *Tribolium castaneum* (Tc), *Aedes aegypti* (Aa), *Culex pipiens quinquefaciatus* (Cp), *Bomby mori* (Bm) e *Blatella germanica* (Bg).

Enzima	Ortólogo em <i>A. mellifera</i>	Identidade (%)							
		Dm	Ag	Nv	Tc	Aa	Cp	Bm	Bg
AAT	GB12956	61	61	70	65	61			
HMGS	GB12497	63	62	72	66	63	65		63
HMGR	GB18242	49		68	61				60
MK	GB14701	34		48	37	34	36		
PMK	GB11982		44	58	47	48		56	
IPPI	GB18308	65	57	68	59	62	62	67	
FPPS1	GB11866	40	39	49		39		39	
FPPS2	GB12385	45	44	55		43		43	
FPPS3	GB12859	41	37	48	40	39		40	
FPPS4	GB10756	42		48	42	39			
FPPS5	GB15337	41	38	50		39		40	
FPPS6	GB18623	41	43	46	41	43		42	
FPPS7	GB19631								
SCD	GB12522		47	63	52	47	50		
FAMET	GB20002	50	58	64	55	57			
MT	GB10517	36	34	46	31	31		33	
MFE	GB15634	36	38	59	45	42			
CS	GB12573	68	75		74	74			
MCTP1	GB17499	86	78	92	87	78		85	
MCTP2	GB15259	77		77	75			76	
ATPCL	GB10992	73	74	86		74	75		
MAT	GB15781	80	81	67	84	61	61	85	
AHC1	GB14324	80	78		83	79	85	80	
AHC2	GB15919	88	84	88		85	58		
AK	GB13063	56		74	60	58		54	

Um dos intermediários da via de síntese do HJ, metil farnesoato (MF), participa na regulação de características juvenis em crustáceos de uma maneira similar ao que ocorre com o HJ-III em insetos (Spradling e Rubin, 1982; Laufer et al., 1987). A farnesóico ácido *O*-metiltransferase (FAMeT) é a responsável pela catalização de ácido farnesóico (FA) para MF usando como co-fator a molécula de S-adenosil-L-metionina (SAM). Em insetos os últimos passos da via de síntese do HJ são uma epoxidação e uma metilação. No entanto, estes passos são invertidos quando comparamos os lepidópteros e outros insetos. Em lepidópteros o FA é convertido em HJ-ácido por uma epoxidação catalizada pela P450 monooxygenase (epoxidase), em seguida ocorre uma metilação convertendo esta molécula em HJ pela HJ-ácido metiltransferase (JHA-MT), que é uma metiltransferase SAM-dependente (Figura 22). Os diferentes HJs encontrados em lepidópteros (HJ-I, HJ-II e HJ-III) são sintetizados pela mesma via, mas são obtidos por combinações diferentes de precursores derivados de homomevalonato e mevalonato (Schooley et al., 1973). Em outros insetos, a conversão de AF para MF é realizada por uma metiltransferase e o passo final, convertendo MF para HJ-III é realizado por uma epoxidase (MFE – P450 monooxygenase) (Figura 22).

Neste trabalho nós identificamos uma metiltransferase (MT), que seria responsável pela conversão de AF para MF, a partir da sequência descrita em *B. mori*. O domínio conservado identificado na sequência da MT de *A. mellifera* é correspondente à classe de enzimas metiltransferase SAM-dependente. Este domínio encontra-se entre as posições 37 e 138 da proteína. Em relação à FAMeT, o gene identificado em *A. mellifera* não possui o domínio conservado para enzimas da classe das metiltransferases. Foram encontrados na FAMeT de *A. mellifera* dois domínios, nas posições 164-231 e

236-304, pertencentes à família DM9, repetições descritas originalmente em *D. melanogaster* segundo análises do programa *NCBI Conserved Domain Search*.

Figura 22 – Síntese de hormônio juvenil III em insetos. Ilustração esquemática da via de síntese de HJ-III em insetos a partir de farnesil difosfato. Após a síntese de ácido farnesóico (AF) a síntese pode progredir por duas vias: (1) via epoxidação da molécula de C_{10} para C_{11} seguida por metilação do HJ-ácido (Lepidoptera) ou, alternativamente, via metilação seguida por epoxidação (outras ordens de insetos). Fonte: Bede et al., 2001.

Os genes selecionados para as análises tiveram suas seqüências confirmadas por anotação utilizando-se a plataforma *Artemis 7.0*. A arquitetura dos genes, mostrando o tamanho e número de íntros e exons estão na figura 23. O gene codificador da HMGS possui um único exon (Figura 23).

As análises dos genes codificadores de FPPSs foram feitas separadamente (Figura 24). Estes genes possuem alta similaridade entre si, maior que 70%. Os genes das 7 FPPSs têm alta similaridade no tamanho e número de seus éxons e íntrons. Por esta razão, os éxons foram nomeados de acordo com o número de nucleotídeos que os mesmos possuem (Figura 24). Os genes correspondentes às isoformas *fpps3*, *fpps5* e *fpps7* são os únicos inteiramente seqüenciados pelo projeto genoma de *A. mellifera*. Porém, *fpps3* é o único com seis éxons. Os éxons 213 e 210 estão ausentes no *fpps5* e em seu lugar se encontra um éxon 228, este é proveniente da deleção de parte de ambos os éxons e do íntron intercalante. O primeiro éxon do *fpps7* (18pb) é menor que o primeiro éxon das outras FPPSs (84pb), e provavelmente sofreu uma deleção parcial; *fpps7* perdeu também o éxon 198, e conseqüentemente um domínio importante denominado FARM (Ashby e Edwards, 1990). Os únicos genes que foram identificados como adjacentes no genoma foram *fpps4* e *fpps5*, que estão no mesmo *contig* (*UnOriented Group 720*), separados por cerca de 7,5 Kb. Todos os outros genes não puderam ser analisados quanto à posição, pois, algumas regiões do genoma não foram totalmente seqüenciadas (*5'upstream* destes genes). Nenhum dos genes codificadores de FPPSs tem sua posição cromossômica determinada. A seqüência da FPPS3 foi a maior entre as FPPSs de *A. mellifera* (337 aminoácidos), porém, esta seqüência é menor que a seqüência de *N. vitripennis* (364 aminoácidos), única FPPS localizada no genoma desta vespa. Entre os insetos, as FPPSs variam entre 382 e 428.

Figura 23 – Esquema dos genes da via de síntese do HJ. As setas indicam o sentido da transcrição. As caixas indicam os éxons, e as linhas os íntrons, o tamanho em pares de base de cada éxon e íntron estão indicados abaixo e acima, respectivamente. O *Group* indicado refere-se ao *contig* onde estão localizadas as seqüências no genoma de *A. mellifera*.

Figura 23 – Continuação

Figura 24 – Esquema dos genes codificadores da farnesil difosfato sintase (FPPS) de *A. mellifera*. Os genes foram anotados utilizando-se a plataforma *Artemis 7.0*. A seta acima da figura mostra o sentido da transcrição. As caixas representam os éxons, que foram nomeados de acordo com o tamanho de sua sequência em pares de base; as linhas entre os éxons representam os íntrons, sendo seu tamanho indicado acima. Os triângulos invertidos sobre os éxons mostram a posição dos *primers* utilizados para quantificação gênica. As setas pontilhadas no início das sequências indicam regiões cujas sequências não foram determinadas pelo projeto de sequenciamento do genoma de *A. mellifera*.

A síntese de hormônio juvenil ocorre na sua maior parte no citosol. No entanto, três passos envolvendo a HMGR, FPPS e MFE ocorrem na fração microsomal. De acordo com análises realizadas pelo programa *TMpred* que executa predição e orientação de regiões transmembrana, as seqüências correspondentes a estes três genes de *A. mellifera* possuem hélices transmembrana. Todas as sete FPPSs mostraram ao menos um motivo transmembrana de acordo com o programa *TMpred*. Os resultados estão de acordo com a localização destas proteínas.

4.5.2 Análises de quantificação gênica

Primeiramente foram selecionados genes putativos codificadores de enzimas da via de síntese do HJ. *Primers* específicos para cada gene foram desenhados utilizando-se o programa *Primer3*. Estes *primers* foram testados em amplificações por PCR para confirmação do tamanho do fragmento, todos os *primers* foram capazes de amplificar o fragmento desejado, exceto os *primers* desenhados para a isoforma 7 do gene codificador de uma FPPS. Após, este procedimento as 6 isoformas dos genes das FPPS (*fpps1-6*) foram clonados e seqüenciados. Cada clone foi seqüenciado seis vezes, as seqüências geradas foram utilizadas para a construção de um *contig* pelo programa *SequencerTM version 4.7 for Windows (Gene Codes Corporation)*. O desenho dos *primers* para amplificação de genes codificadores de FPPSs foi dificultado devido ao fato destes genes partilharem mais de 70% de identidade. Por esta razão, foi tomado um cuidado especial para garantir que os fragmentos corretos fossem amplificados para cada par de *primers*. Foram utilizadas três análises diferentes para este fim: a temperatura de *Melting* (*T_m*) dos *amplicons*, o número de picos nas análises de dissociação e sequenciamento. Todas as evidências apontam para uma amplificação

específica dos *primers*, pois, todos os seis fragmentos tiveram T_m diferentes (dados não mostrados). Além disto, as curvas de dissociação mostraram apenas um único pico, confirmando, então, a amplificação de um único fragmento. Pequenas diferenças no número e tipo de nucleotídeos de um fragmento são capazes de produzir diferenças na T_m , assim, a amplificação de mais de um fragmento normalmente gera mais de um pico nas curvas de dissociação. A confirmação final da especificidade dos *primers* foi gerada pelas análises de sequenciamento, pois, cada fragmento foi confirmado por 100% de identidade com o respectivo gene. Todos os demais fragmentos de genes codificadores de enzimas da via de síntese do HJ utilizadas neste trabalho foram confirmados por sequenciamento.

Para as análises de quantificação gênica, foi escolhido previamente o gene de controle endógeno que melhor se adequava às análises nos CA. Quatro genes foram pré-selecionados baseados nas análises feitas por Lourenço et al. (2008). Foram coletados *pools* de CA em 10 fases do desenvolvimento larval e pupal e operárias recém-emergidas. O RNA total foi extraído e utilizado para síntese de cDNA, todo o RNA obtido de 8 pares de CA foi utilizado. Os genes de controle endógeno tiveram o número de transcritos analisados por RT-PCR em tempo real. O gene codificador da RP49 foi o único gene com variação aceitável segundo as análises do programa *BestKeeper* (DP=0,99), e portanto foi selecionado para análises de quantificação nos CA, em detrimento aos genes codificadores das proteínas TBP-AF, Actina e EF1- α , que tiveram DP igual a 2,02; 2,52 e 2,50; respectivamente.

As análises de quantificação gênica tiveram o objetivo de selecionar genes que tivessem níveis de transcritos mais altos nos CA quando comparados a outros tecidos em um momento do ciclo de vida de abelhas cujos títulos de HJ estão altos, operárias

forrageiras. Foi extraído RNA total de quatro tecidos: corpo gorduroso, cérebro, ovários e complexo *corpora allata* – *corpora cardíaca* (CA-CC). Após análises de quantificação dos níveis de transcrição por RT-PCR em tempo real foram selecionados sete genes cuja expressão foi acentuada nos CA-CC em relação a outros tecidos: *ahc1*, *ippi*, *mt*, *famet*, *hmgs*, *hmgr* e *mfe* (Figura 25). Um oitavo gene foi selecionado a partir das 7 isoformas para o gene *fpps*. Quatro *fpps* tiveram números de transcritos mais altos nos CA-CC em relação aos outros tecidos analisados: *fpps2*, *fpps3*, *fpps5* e *fpps6* (Figura 25). No entanto, os valores de Ct para o gene *fpps3* foram cerca de 10 vezes superiores aos valores obtidos para os outros três genes (dados não mostrados). Este fato, aliado às características observadas para este gene nas análises *in silico* mostram que este gene é o melhor candidato a ser o gene codificador da FPPS envolvida na síntese do HJ. No entanto, a participação dos outros genes, *fpps2*, *fpps5* e *fpps6* não podem ser descartadas, ainda que seja em menor escala. O gene correspondente à isoforma 3 foi utilizado para as análises posteriores.

Apenas dois genes tiveram transcrição exclusiva nos CA: *mfe* e *mt*; estes genes são considerados específicos da via de síntese do HJ. Os genes: *famet*, *hmgr*, *hmgs*, *ippi*, *ahc1* e *fpps3*, possuem os mais altos níveis de transcrição nos CA, mas também são transcritos em outros tecidos. Os únicos genes que aparentemente não são transcritos nos CA são: *fpps1* e *fpps4*, genes quase exclusivamente transcritos no CG; e *scd*, cuja transcrição se limita à amostra de cérebro. Os demais genes: *cs*, *mctp1*, *mctp2*, *atpcl*, *mat*, *ahc2*, *ak*, *aat*, *mk* e *pmk*, possuem expressão em aparentemente todos os tecidos analisados (Figura 25).

Figura 25 – Quantificação relativa dos níveis de genes envolvidos no metabolismo do HJ em diferentes tecidos de operárias forrageiras de *A. mellifera* por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR). (CA-CC) *corpora allata/corpora cardíaca*; (CG) corpo gorduroso; cérebro e ovário. Cada barra representa uma amostra formada de *pools* de 20-25 CA-CC ou *pools* de CG, Ce ou Ov de 10 abelhas. A expressão do gene da RP49 foi utilizada para normalização, e o maior valor de expressão foi corrigido para 1 para cada gene individualmente. Para a sigla dos genes ver tabela II.

Com o objetivo de confirmar o *status* dos oito genes selecionados previamente sobre a regulação do HJ, cinco deles foram analisados para quantificação dos níveis de mRNA nos CA-CC em quatro fases do desenvolvimento de rainhas e operárias: rainhas e operárias na fase de pupa de olho branco (Pw), quando os níveis de HJ estão basais na hemolinfa e duas fases cujos títulos de HJ estão altos, operárias forrageiras, ou estão iniciando esta fase, rainhas recém-emergidas, os altos títulos de HJ na fase adulta de operárias e rainhas estão envolvidos com a atividade de vôo (Robinson et al., 1991; Giray e Robinson, 1996; Tozetto et al., 1997). Após a quantificação por RT-PCR em tempo real, os cinco genes analisados mostraram o mesmo perfil (Figura 26A): altos níveis de transcritos estão associados a períodos de altos títulos de HJ, e baixos níveis de mRNA às fases cujos títulos de HJ são reconhecidamente baixos (Elekonich et al., 2003).

Para relacionar os níveis de transcritos com os níveis de proteína nos CA de um dos genes analisados, foram executadas análises por *western blot*, utilizando-se um anticorpo anti-HMGR de *B. germanica*. Foram utilizados extratos protéicos de CA-CC nas mesmas fases utilizadas para as investigações do número de transcritos. Os resultados revelaram uma única banca de 68KDa correspondente à HMGR de *A. mellifera*. Os níveis de proteína mostraram exatamente o mesmo perfil observado para a expressão do gene *hmgr* (Figura 26B). Estes resultados levaram a conclusão de que existe um controle liga-desliga na produção de enzimas participantes da via de síntese do HJ nos CA durante o ciclo de vida das abelhas.

Figura 26 – (A) Quantificação relativa dos níveis de genes envolvidos no metabolismo do HJ nos *corpora allata/corpora cardiaca* (CA-CC) de *A. mellifera* por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) em pupas e abelhas adultas. Cada barra é a média de três *pools* de 8 CA-CC. A expressão do gene da RP49 foi utilizada para normalização, e o maior valor de expressão foi corrigido para 1 para cada gene individualmente. Para a sigla dos genes ver tabela II. (B) Perfis de HMGR nos CA-CC, 3 µg de proteína total foram separados por SDS-PAGE e utilizados para experimentos de *western blot*. Um anticorpo anti-HMGR de *B. germanica* foi utilizado, sendo detectada uma única banda de 68 KDa. Fases: pupa de olho branco (Pw), operária forrageira (Fo) e rainhas recém-emergidas (RE).

4.5.3 Análises *in silico* das regiões 5' *upstream* dos genes

Utilizando a metodologia descrita por Cristino et al. (2006) foram realizadas análises *in silico* na região 5' *upstream* dos genes (1,5 Kb acima do *start* códon). As análises visavam à busca de três elementos de resposta em promotores já descritos em insetos com até 70% de similaridade: CF1-USP (Christianson et al., 1992), EcR-USP (Perera et al., 2005) e DmJHER1 (Kethidi et al., 2004). Uma segunda análise visou a busca de regiões conservadas na região 5' *upstream* dos genes codificadores de enzimas da via de síntese do HJ. Foram utilizadas a região 5' *upstream* de todos os genes codificadores de enzimas da via de síntese do HJ descritos neste trabalho cuja sequência estava disponível. Ao todo foram utilizadas 20 seqüências, a região 5' *upstream* do gene *ippi* e de algumas isoformas de *fpps* não estão incluídas nas análises. As análises revelaram um elemento conservado na região promotora dos genes analisados, que não é encontrado em promotores dos demais genes de *A. mellifera*. A presença desta região conservada pode indicar a existência de um elemento de resposta específico nas regiões promotoras de genes da via de síntese do HJ, a sequência consenso foi chamada de CA-JH (TraATCGAA). Este elemento foi encontrado em 7 das 20 regiões analisadas, correspondendo aos genes: *mfe*, *mt*, *fpps3*, *fpps7*, *hmgs*, *cs* e *ahc2*.

O promotor do gene *mfe* foi o único a apresentar o motivo de DNA similar ao elemento de resposta para o fator de transcrição chorion factor 1/ultraspiracle (CF1-USP). Este fator de transcrição faz parte da família de receptores de esteróides e outros receptores hormonais nucleares que agem regulando os processos de diferenciação celular, desenvolvimento, homeostase e reprodução (Christianson et al., 1992). O elemento de resposta EcR-USP foi localizado em duas seqüências: genes *famet* e *mctp1*. Já o elemento DmJHER1 ocorreu na região 5' *upstream* dos genes: *mt*, *aat* e *ahc2*.

Os resultados apontam para a descoberta de um motivo (nomeado CA-JH) que se mantém em alta colinearidade. A tabela VIII mostra os diagramas de ocorrência dos motivos em até 1500 nt *upstream* ao gene. As análises *in silico* devem ser analisadas com cuidado, pois, apesar da existência destas regiões conservadas nenhuma delas foi testada experimentalmente.

Tabela VIII – Análise da região promotora dos genes da via de síntese do hormônio juvenil. DmJHRE1 = 0 (CyckCkCwctyysyc.ctsy.ycgCt.ky); CF1-USP = 1 (GGGGTCAs); EcR-USP = 2 (rGkTCAaTGamecy) e CA-JH = 3 (TraATCGAA). As setas indicam a direção de transcrição do gene.

GENE	Diagrama da região 5'upstream	Seqüência encontrada	Posição
<i>mfe</i>	←-----3-----1-----	1 GGTGTCACG 3 TGAATCGAA	1380-1388 812-820
<i>mt</i>	←-----3----3-----0000-----	0 ACGGATGAAGGAGGGAGGGGGGAAAGAG 0 ATGAAGGAGGGAGGGGGGAAAGAGAGAG 0 GAAGGAGGGAGGGGGGAAAGAGAGAGAG 0 AGGAGGGAGGGGGGAAAGAGAGAGAGTC 3 TATATCGAA 3 TTCGATTCA	1018-1046 1022-1050 1024-1052 1026-1054 288-296 408-416
<i>famet</i>	←-----2-----	2 TGGTCATTGAACG	754-766
<i>fpps3</i>	←-----3-----	3 TTCGATATA	205-213
<i>fpps7</i>	←-----3-----	3 TTCGATTCA	1270-1278
<i>hmgs</i>	←-----3-----3-----	3 TTCGATGCA 3 TTCGATTTA	191-199 389-397
<i>cs</i>	←-----3-----	3 TGTATCGAA	544-552
<i>aat</i>	←-----00-----	0 TTCTTTCACCTTCTTCTTTCACCTCTTTC 0 CTTTCACTTCTTCTTTCACCTCTTCTG	391-419 393-421
<i>ahc2</i>	←-----3-----0-----	0 CACGCACTCTTCTTGATCTGTTTCACGC 3 TTCGATATA	848-876 548-556
<i>mctp1</i>	←2-----	2 ACTTCATTGAACT	0-12

4.6 Manipulação do alimento em abelhas adultas

Nossos resultados mostraram que os níveis de expressão de genes envolvidos na síntese do HJ nos CA podem ter um controle liga-desliga durante o ciclo de vida das abelhas melíferas. Estudos envolvendo a regulação dos níveis de HJ durante o processo de diferenciação de castas, no estágio larval de *A. mellifera*, mostraram que a nutrição tem um papel essencial na regulação deste processo (Michener, 1969; Wheeler, 1986; Winston, 1987; Rachinsky e Hartfelder, 1990; Hartfelder e Engels, 1998). O aumento na quantidade e qualidade de comida ingerida pelas larvas leva a um aumento nos títulos de HJ na hemolinfa, como é o caso de larvas que originarão rainhas (Rachinsky e Hartfelder, 1990). Baseada nesta informação, nosso objetivo foi testar se o *status* nutricional é capaz de alterar a regulação dos níveis de síntese de HJ (utilizando como indicativo a expressão de genes envolvidos neste processo) e a degradação do HJ em abelhas adultas.

Operárias recém-emergidas foram mantidas durante 7 dias em caixas e alimentadas com dois tipos diferentes de dietas: uma dieta rica em açúcar (xarope 50%) e uma dieta rica em proteínas (30% *beebread* em xarope 50%). A quantificação dos níveis de transcrito de genes envolvidos na síntese de HJ foi feita utilizando amostras de CA-CC. As análises revelaram que os genes codificadores das enzimas MFE e IPPI são regulados pelo *status* nutricional (Figura 27A). A primeira delas, metil farnesoato epoxidase, é o passo final na síntese de HJ-III em *A. mellifera*, portanto, um passo específico desta via. A outra enzima, Isopentenil-difosfato delta-isomerase, é um passo intermediário na síntese de isoprenóides (Bellés et al., 2005).

As alterações observadas na expressão dos genes da via de síntese do HJ foram opostas às alterações observadas para o processo de degradação do HJ, ou seja, quando

as abelhas foram alimentadas com uma dieta baseada em açúcar os níveis de transcritos de *mfe* e *ippi* aumentaram significativamente nos CA (*t-test*; $P=0,010$ e $P=0,043$, respectivamente – Figura 27A), enquanto os níveis de transcritos de *Amjhe* no corpo gorduroso ($P=0,005$; *t-test*; Figura 27B), e também os níveis de AmJHE e AmJHEH na hemolinfa e no corpo gorduroso, respectivamente, diminuíram (resultados por *western blot*; Figura 27C). Estes resultados sugerem que uma dieta pobre em proteínas possa ser um mecanismo regulador que cause um aumento nas taxas de síntese de HJ nos CA na vida adulta (através do aumento de cópias de enzimas da via de síntese), havendo também a diminuição da degradação deste hormônio na hemolinfa e tecidos. Este resultado é uma forte evidência que não apenas a síntese de HJ, mas também o controle de sua degradação sejam mecanismos essenciais para a manutenção dos títulos de HJ.

Figura 27 – (A) Quantificação relativa dos níveis de expressão dos genes envolvidos no metabolismo do HJ nos *corpora allata/corpora cardiaca* (CA-CC) de *A. mellifera* por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) após a manipulação da dieta em abelhas operárias adultas. Operárias recém-emergidas foram mantidas por 7 dias em caixas de confinamento e alimentadas com duas diferentes dietas consistindo em xarope 50% ou 30% de *beebread* em xarope 50%. Cada barra é a média de três *pools* de 8 CA-CC. A expressão do gene da RP49 foi utilizada para normalização, e o maior valor de expressão foi corrigido para 1 para cada gene individualmente. Para a sigla dos genes ver tabela II. (B) Expressão normalizada dos genes *jhe* e *jheh* de *A. mellifera* no corpo gorduroso por RT-PCR semiquantitativa (SqRT-PCR). As barras representam a média de três amostras constituídas de *pools* de cinco indivíduos. A expressão do gene da RP49 foi utilizada para normalização, e o maior valor de expressão foi corrigido para 1 para cada gene individualmente. (C) Perfis de JHE e JHEH na hemolinfa e corpo gorduroso, respectivamente. As análises foram feitas por *western blot*, 50 μ g de proteína total foram separados por SDS-PAGE e utilizados para os experimentos. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas nos tratamentos (*t-test*).

Ilustração: A. Fagundes; *In*: Freire, 2006.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Esterase do hormônio juvenil

Uma lista de JHE potenciais foi obtida através de análises de similaridade utilizando as seqüências de *D. melanogaster* e *T. molitor* como “queries” e o banco de dados de seqüências preditas de *A. mellifera*. As seqüências obtidas, 21 esterases, foram analisadas para busca de características típicas de JHEs. Devido ao fato de nenhuma delas ter apresentado o motivo canônico GQSAG, presente em todas as JHEs descritas até o momento, apresentando ao invés os aminoácidos: leucina, metionina, glutamato ou valina na posição 2 do motivo G-X-S-X-G, dois critérios foram aplicados para selecionar a melhor candidata para ser a JHE de *A. mellifera*: (a) presença de todos os motivos característicos de esterase-lipases e a presença de um peptídeo sinal, e (b) alta similaridade com a JHE de *D. melanogaster* devido ao fato desta JHE formar um “cluster” separado das JHEs de Lepidoptera (Kamita et al., 2003). Este conjunto de critérios identificou a seqüência correspondente ao **GB15327** como a melhor candidata para análises de expressão e estudos funcionais. O segundo melhor “match” resultante das análises feitas utilizando BLASTP foi o **GB10820**, mas esta seqüência não tem aparentemente um peptídeo sinal e tudo indica que seja uma duplicação do **GB15327**. É interessante notar que uma duplicação semelhante, do gene da JHE, ocorre também no genoma de *D. melanogaster*, mas apenas um dos genes correspondentes mostrou atividade relevante de hidrolase de um éster, convertendo HJ à HJ-ácido (Crone et al., 2007).

Durante o ciclo de vida de operárias de *A. mellifera*, os transcritos de *Amjhe* alcançam níveis máximos justamente quando níveis mínimos de HJ na hemolinfa são

detectados, na transição da fase de alimentação para a fase de tecelagem do casulo no último estágio larval. Este fato sugere que a função da enzima correspondente é de retirar o HJ da hemolinfa neste momento específico, e ainda, produzir o HJ-ácido, que foi indicado como possível agente iniciador da competência larval para muda (Ismail et al., 1998; 2000). O declínio subsequente dos níveis de transcritos de *Amjhe* no fim do quinto estágio larval pode ser interpretado como promotor da ocorrência do pico de HJ pré-pupal, em preparação para a muda larva-pupa. Após este evento, a relação inversa entre expressão da *Amjhe* e títulos de HJ na hemolinfa termina. Os títulos basais de HJ encontrados durante o estágio pupal (Elekonich et al., 2003) podem ser mais bem explicados em termos de uma parada na produção de HJ pelos CA que ocorre no final do estágio pré-pupal (Rachinsky et al., 1990). Padrões similares foram observados para outros insetos, incluindo *B. mori* (Kinjoh et al., 2007), quando os níveis de HJ na hemolinfa são controlados pelo balanço entre síntese nos CA e degradação pela JHE, seqüestro por proteínas de ligação e excreção. Uma ação coordenada entre esses processos é de extrema importância para o processo de metamorfose em insetos, em *A. mellifera* é adicionalmente essencial para a regulação das vias do desenvolvimento que levam aos fenótipos divergentes de rainhas e operárias.

As comparações entre as flutuações hormonais e os níveis de transcritos de *Amjhe* durante o desenvolvimento apontam para a hipótese de uma regulação positiva da expressão de *Amjhe* pelo HJ, e uma repressão feita pelos ecdisteróides sobre a transcrição deste gene. Ambos os efeitos foram confirmados experimentalmente “in vivo” pela aplicação tópica de HJ na fase de tecelagem do casulo, e por experimentos “in vitro” utilizando larvas em fase de alimentação e pela injeção de 20E no estágio pupal. As respostas do *Amjhe* ao tratamento com HJ e ecdisteróides foram similares às

encontradas entradas para o gene da JHE dos Lepidoptera, como: *Heliothis virescens* (Wroblewski et al., 1990), *Choristoneura fumiferana* (Feng et al., 1999) e *Trichoplusia ni* (Jones et al., 1994). Uma observação importante é que durante o estágio pré-pupal a presença de altos níveis de ecdisteróides parece sobrepor o efeito positivo do HJ sobre a expressão do gene *Amjhe* mantendo baixos níveis de transcrito neste período. Este resultado está de acordo com o reportado para *C. fumiferana*, nesta espécie 20E suprime a indução de *jhe* pelo HJ, indicando uma interação hormonal importante na regulação dos níveis de transcrição dos genes codificadores de JHE (Kethidi et al., 2005). Todos estes resultados suportam a hipótese de que o produto do gene *Amjhe* tem um papel na degradação do HJ durante o desenvolvimento larval-pupal.

A expressão temporal de *Amjhe* em operárias adultas confirma o *status* de candidata à JHE. O aumento relativo na expressão de *Amjhe* durante os primeiros dias da vida adulta pode ser explicado como uma resposta fisiológica que pode contribuir para a manutenção de baixos títulos de HJ na fase em que as operárias precisam executar tarefas intranidais, especialmente enquanto as larvas precisam de alimento glandular apropriado. A elevação dos níveis de *Amjhe* durante esta fase pode representar um componente adicional no circuito regulatório que mantém baixos níveis de HJ em operárias jovens. Os outros dois fatores contribuindo são a baixa taxa de produção de HJ pelos CA destas operárias nutrizas (Huang et al., 1991; Robinson et al., 1992) e os elevados títulos de vitelogenina que podem agir como repressores dos títulos de HJ (Guidugli et al., 2006). É interessante notar que os níveis de transcritos de *Amjhe* possuem mudanças paralelas às mudanças observadas nos níveis de vitelogenina na hemolinfa (Hartfelder e Engels, 1998) e da expressão do gene de vitelogenina na vida adulta das operárias (Piulachs et al., 2003).

No momento o conhecimento de como a vitelogenina age regulando negativamente os títulos de HJ é ainda desconhecido, mas a regulação positiva do gene da JHE, pela vitelogenina, pode ser parte deste processo. A diminuição dos níveis de vitelogenina na hemolinfa tem uma ação repressora sobre os títulos de HJ, evidenciado pela diminuição na atividade dos CA (Huang et al., 1991) e possivelmente também diminuindo a expressão de *Amjhe*. Estas mudanças estão associadas com uma troca de tarefas comportamentais, marcadas pela transição de abelhas nutrizas para abelhas forrageiras. As respostas fisiológicas e os comportamentos associados não são nem estritamente dependentes da idade nem irreversíveis. Eles podem ser acelerados ou revertidos, permitindo ajustamentos finos de comportamento de acordo com a distribuição etária ou necessidades da colônia (Huang e Robinson, 1992; 1996; Jassim et al., 2000). Além do mais, estas mudanças mostraram também uma dinâmica diferencial de acordo com o genótipo, como mostrado pelas abelhas de linhagens selecionadas para comportamento de alta e baixa estocagem de pólen (Amdam et al., 2007). A reversão de tarefas de forrageiras para nutrizas, contudo, não é ilimitada. Forrageiras jovens podem facilmente reverter sua condição para o comportamento de nutrizas se isto for uma necessidade da colônia, porém quanto mais velha fica a operária menos provável é a ocorrência desta reversão. Isto pode ser explicado pela degeneração gradual que ocorre nas glândulas hipofaringianas e pela imunosenesescência progressiva verificadas no final da vida adulta (Amdam et al., 2005). Estes eventos estão relacionados com títulos diminuídos de vitelogenina na hemolinfa, e como mostrado aqui, com a diminuição dos níveis de expressão de *Amjhe*, ambos contribuindo com o aumento e manutenção dos altos títulos de HJ observados nas operárias forrageiras.

Apesar dos níveis de expressão de *Amjhe* e de sua resposta a tratamentos hormonais serem compatíveis com a função de uma JHE de insetos, foi o silenciamento por interferência do RNA que permitiu adicionar uma função ao gene estudado. A injeção de dsRNA causou uma redução de 90% dos níveis de mRNA de *Amjhe* quando comparados com os controles e, como efeito levou a um aumento de 6 vezes nos títulos de HJ quando comparado a abelhas não tratadas. O fato de que uma redução de 80% dos níveis de *Amjhe* observado nas amostras injetadas com GFP dsRNA não alterou significativamente os títulos de HJ na hemolinfa, é a prova de que a resposta obtida para este tratamento foi um silenciamento gênico específico. A redução significativa na abundância de transcritos de *Amjhe* e a conseqüente alteração dos títulos de HJ em circulação na hemolinfa são dados que permitem afirmar que a mudança observadas no motivo G-X-S-X-G não aboliu a função de degradação do HJ por esta JHE putativa de *A. mellifera*.

O fato de não haver nenhuma carboxiesterase no genoma de *A. mellifera* contendo o motivo na conformação GQSAG, a modificação para GLSAG no gene candidato *Amjhe* pode estar na realidade relacionada ao desenvolvimento e comportamentos flexíveis relativos à organização social dos insetos. É exatamente neste aspecto que os Himenoptera sociais devem ser diferentes dos insetos modelo para a regulação da metamorfose e fisiologia reprodutiva. Os hormônios morfogenéticos, especialmente HJ e também a via de sinalização insulina/TOR são reguladores chave na divergência das vias de desenvolvimento que levam aos fenótipos de rainhas e operárias (Hartfelder e Engels, 1998; Hartfelder e Emlen, 2005; Patel et al., 2007) enquanto no estágio adulto, o HJ foi adaptado a uma nova função como regulador da divisão do trabalho na casta de operárias (Robinson e Vargo, 1997). Aparentemente, isto foi possível após sua função

no processo reprodutivo ter mudado durante o fim do estágio pupal (Barchuk et al., 2002), abrindo a possibilidade de novas funções no estágio adulto. Assim, é possível, que a grande flexibilidade associada com os processos de desenvolvimento e comportamento na evolução social também envolva mudanças em motivos funcionais da JHE, representando um refinamento nas vias de sinalização hormonal.

Todas as evidências experimentais obtidas neste trabalho apontam para o gene correspondente ao **GB15327** como o gene codificador da JHE de *A. mellifera*. No entanto, devido às diferenças encontradas em relação ao motivo GxSxG, o mecanismo de ação deste gene pode ser diferente das JHEs de outros insetos, especialmente devido aos processos de diferenciação de castas e polietismo etário, que consistem em novas funções atribuídas ao HJ. Por estas razões, a proteína codificada pelo gene em questão foi denominada como AmJHE-like (Mackert et al., 2008).

5.2 Epóxido hidrolase do hormônio juvenil

O mecanismo pelo qual a JHE age tem recebido considerável atenção devido a importante função biológica desta enzima sobre a regulação do HJ em insetos (Kamita et al., 2003). No entanto, estudos recentes sugerem que a JHEH pode ter uma função tão crítica sobre o controle dos níveis de HJ quanto a JHE (Debernard et al., 1998; Harris et al., 1999; Keiser et al., 2002).

O primeiro fragmento correspondente ao gene da JHEH de *A. mellifera* foi isolado utilizando-se *primers* degenerados desenhados com base nas seqüências de outros insetos. Este fragmento inicial de 260 pb possibilitou a identificação da seqüência completa deste gene em banco de dados contendo seqüências preditas a partir do genoma de *A. mellifera*. A AmJHEH mostrou ser homóloga à JHEHs de outros insetos, análises das seqüências de aminoácidos revelaram que elas compartilham regiões conservadas, especialmente os resíduos da tríade catalítica e aqueles compreendendo a região do *oxyanion hole* (Morisseau e Hammock, 2005). A presença e conservação dos resíduos da tríade catalítica e aqueles correspondendo ao *oxyanion hole* sugerem que a AmJHEH é uma enzima funcional e que esta deve utilizar o mesmo mecanismo de ação das mEH de mamíferos que contém um domínio α/β hidrolase em sua porção C-terminal (Lacourciere et al., 1993; Hammock et al., 1994).

O anticorpo produzido para a AmJHEH revelou uma proteína com 50 KDa que está de acordo com o tamanho esperado para uma JHEH (Keiser et al., 2002). A massa molecular calculada para a proteína foi 52 KDa (*ProtCal – JustBio Home Page*). As análises *in silico* identificaram dois motivos transmembrana para AmJHEH. As análises por *Western blot* identificaram a AmJHEH no corpo gorduroso, mas nenhuma marcação foi observada utilizando esta técnica quando foram analisadas amostras de hemolinfa.

As análises apontam para a AmJHEH como uma proteína ligada à membrana e portanto não secretada na hemolinfa, assim como as JHEHs de *M. sexta* e *B. mori* (Debernard et al., 1998; Zhang et al., 2005).

Em mamíferos, estão descritas as epóxido hidrolases citosólicas e microssomais, acredita-se que a homologia entre diferentes formas seja resultado de duplicação gênica (Beetham et al., 1995). Em insetos a presença de EH citosólicas não está bem definida. Alguns estudos apontam para a presença de ambas as formas, devido à atividade de EH encontrada no citosol e fração microssomal (Roe et al., 1996). A primeira EH encontrada em insetos foi identificada no intestino médio de larvas de *Spodoptera eridania* (Mullin e Wilkinson, 1980a). Esta enzima, no entanto, não apresentou atividade sobre o HJ (Mullin e Wilkinson, 1980b). Um dos autores sugeriu a presença de diferentes grupos de EHs em insetos, baseado em estudos de seletividade de substratos (Mullin, 1988). Em *A. mellifera* apenas um único gene codificador de EH foi encontrado no genoma, o gene denominado como JHEH neste trabalho. Assim como em *A. mellifera* o genoma de *N. vitripennis* apresentou apenas um único gene codificador de uma EH.

No processo de degradação do HJ a JHE tem revelado um papel essencial em insetos (Jesudason et al., 1992; Kamita et al., 2003). Contudo, a JHEH pode ser mais importante do que a JHE para o controle de degradação em alguns estágios do desenvolvimento de algumas espécies de insetos. Por exemplo, em ovos de *M. sexta*, a JHEH é mais ativa do que a JHE (Touhara e Prestwich, 1993). Em vários estágios do desenvolvimento larval de *M. sexta*, a formação de diol pela JHEH é a maior rota *in vivo* de degradação do HJ (Halarnkar et al., 1993). Em *Culex quinquefasciatus*, a atividade da JHEH excede a de JHE durante a maior parte do quarto estágio larval,

sugerindo que a JHEH tem um papel sobre a dinâmica da metamorfose (Lassiter et al., 1995). Durante o desenvolvimento pupal-adulto de *D. melanogaster*, JHE e JHEH participam igualmente da degradação do HJ, no entanto, em *D. virilis*, a JHEH tem atividade maior do que a JHE (Khlebodarova et al., 1996).

Os nossos dados sugerem que em *A. mellifera* a JHE e a JHEH em ação conjunta, ainda que ensaios bioquímicos não tenham sido realizados para estas enzimas, as análises de quantificação gênica e níveis de proteínas foram bastante informativas. Durante o quinto estágio larval de rainhas e operárias ambos os genes estão mais ativos em rainhas do que em operárias. Do mesmo modo, os níveis de transcritos de *Amjhe* e *Amjheh*, apresentam o mesmo perfil durante o estágio larval, e praticamente desaparecem durante o estágio pupal. A única diferença observada para a AmJHE e AmJHEH diz respeito aos níveis de proteínas durante o estágio pré-pupal, quando a AmJHE desaparece na hemolinfa, porém altos níveis de AmJHEH permanecem no corpo gorduroso. A presença de altos níveis de AmJHEH no corpo gorduroso nesta fase pode garantir a retirada do HJ neste órgão mesmo quando os níveis de HJ na hemolinfa estão altos, como é o caso da fase pré-pupal.

Enquanto a consequência biológica da hidrólise do grupo éster do HJ pela JHE pode ser reversível pela ação de metiltransferases (Khlebodarova et al., 1996), a hidrólise do grupo epóxido pela JHEH e a conjugação com fosfatos pela JHDK representam uma degradação irreversível (Halarankar e Schooley, 1990; Maxwell et al., 2002a). A significância da função da JHEH sobre o controle dos níveis de HJ é suportada pela função hormonal atribuída ao HJ-ácido durante certos estágios do desenvolvimento de lepidópteros. Manter ou retirar o HJ-ácido pode ser extremamente importante para o controle da metamorfose (Ismail et al., 1998; 2000).

Os dados de outros trabalhos e as análises obtidas neste trabalho permitem traçar a ação das enzimas de degradação do HJ durante o ciclo de vida das abelhas melíferas. O grande aumento dos níveis de transcrição da JHE e da JHEH ocorre na transição do período de alimentação (F) para o período de tecelagem de casulo (S). O aumento de expressão do gene da JHE está relacionado aos altos níveis de HJ nesta fase. Ao fim do estágio de alimentação, inicia-se uma alta atividade de degradação do HJ causando o declínio observado no estágio de tecelagem do casulo (S). A alta atividade da JHE na hemolinfa deve causar um grande aumento nos níveis de HJ-ácido, que provavelmente leva à competência larval para a muda que vem a seguir (larva-pupa). Ao mesmo tempo, nos tecidos o HJ é neutralizado pela ação da JHEH. Após este período a JHE para de ser liberada na hemolinfa e a sua produção no CG cessa totalmente, este fato aliado provavelmente à continuidade da síntese de HJ pelos CA permitem que o pico de HJ na hemolinfa durante o estágio pré-pupal ocorra. No entanto, a JHEH continua ativa no CG, e provavelmente outros tecidos, eliminando todo o HJ remanescente e provavelmente inativando qualquer molécula de HJ que seja transportado para o interior celular. A função da JHE deve estar ativamente voltada à produção de HJ-ácido e a JHEH ocuparia a função de degradar o HJ, resultado que confirma a ação em conjunto destas duas enzimas para o controle da metamorfose.

5.3 Diferenciação de castas e degradação do hormônio juvenil

Rachinsky et al. (1990) mostrou que a taxa de síntese de HJ nos CA são muito superiores em rainhas em relação às taxas de sínteses observadas em zangões e operárias durante o quinto estágio, fato que leva aos altos títulos de HJ observados na hemolinfa de rainhas (Figura 28). As análises de quantificação dos genes de degradação do HJ durante o quinto estágio larval mostraram que de forma geral a transcrição dos genes é maior em larvas de rainhas. Portanto, os altos níveis de HJ na hemolinfa de rainhas devem estar relacionados à alta taxa de síntese e não ao mecanismo de degradação em rainhas, já que a expressão dos genes codificadores das enzimas de degradação do HJ aparentemente é superior em rainhas, quando comparadas com as operárias. Os altos títulos de HJ na hemolinfa de rainhas devem atuar com regulador positivo da transcrição de *Amjhe*. Um fato interessante é a diferença nos títulos de HJ em larvas de operárias e zangões durante o quinto estágio larval (Figura 28B) quando as taxas de síntese nos CA são similares entre esses indivíduos (Figura 28A), porém os títulos na hemolinfa são superiores em zangões. Provavelmente, os níveis de degradação do HJ sejam responsáveis pela manutenção dos títulos de HJ em machos. Resultados preliminares mostram que os níveis de transcritos de *Amjhe* são superiores em zangões em relação aos níveis em operárias (dados não mostrados), corroborando com esta hipótese.

Figura 28 – Taxa de síntese do hormônio juvenil nos *corpora allata* (A) e títulos de hormônio juvenil na hemolinfa (B) durante o quinto estágio larval de operárias e rainhas. Os gráficos foram desenhados a partir de dados de Rachinsky et al. (2000).

O gene *Amjheh* parece não estar regulado pela ação dos hormônios morfogenéticos: HJ e ecdisteróides. No entanto, os níveis de AmJHEH foram alterados pelo tipo de alimento ingerido. Em abelhas adultas que receberam uma dieta rica em proteínas e lipídeos (*beebread*) os níveis de AmJHEH aumentam consideravelmente. Outro fato interessante observado em nossas análises foi a capacidade de regulação exercida pelo tipo de alimento no estágio larval sobre os níveis de AmJHEH no CG. Quando a larva consome geléia real, os níveis de AmJHEH aumentam rapidamente, mesmo que elas tenham se alimentado por um período prévio com “geléia de operárias”.

A via de sinalização por insulina é um agente central que leva informação nutricional em uma série de organismos (Ikeya et al., 2002; Nijhout, 2003). Esta via é um módulo evolutivo conservado, que modula o crescimento e tamanho dos organismos

(Oldham et al., 2002). Wheeler et al. (2006) mostraram que a expressão de um gene *insulin-like* (*AmILP-1*) é maior em larvas de rainhas, também foi observado que a expressão de genes de proteínas membros da via de insulina é dependente da qualidade da dieta ingerida, sugerindo um *link* entre o sistema de sinalização de insulina e a síntese e secreção de HJ. Patel et al. (2007) mostraram que o gene alvo da Rapamicina (*tor*) está envolvido no desenvolvimento dos fenótipos de rainhas e operárias. O tratamento com rapamicina (o inibidor de TOR) em *A. mellifera* induziu características de operárias em larvas destinadas a serem rainhas. O silenciamento de *Amtor* inibe o aumento de gorduras reduzindo o peso das larvas e resultando em um fenótipo de operárias, mesmo quando as larvas recebiam uma dieta promotora de fenótipo de rainhas. Os autores concluíram que o desenvolvimento das castas envolve a interação entre AmTOR, a via de sinalização de insulina e o hormônio juvenil. Estes dois estudos, então, apontam para o sistema de sinalização insulina/TOR como constituinte central do controle do desenvolvimento de castas, em adição ao HJ e ecdisteróides.

As EHs são enzimas presentes em todos os tipos de organismos vivos, e transformam lipídeos contendo grupos epóxido pela adição de água (Newman et al., 2005). Em *A. mellifera* um único gene codificando uma EH está presente no genoma. As análises descritas aqui apontam para este gene como codificador de uma genuína JHEH. A regulação dos níveis de JHEH não está relacionada aos níveis de hormônios morfogenéticos, no entanto, os níveis da AmJHEH respondem às mudanças nutricionais. O gene da AmJHEH pode ser alvo de regulação pela via de sinalização insulina/TOR, que responde ao *status* nutricional, isto explicaria a resposta deste gene frente a alterações nutricionais.

O HJ está envolvido na regulação do desenvolvimento dos ovários em Himenópteros primitivamente sociais como vespas *Polistes annularis* (Barth et al., 1975) e abelhas *Lasioglossum zephyrum* (Bell, 1973). Em *A. mellifera* o HJ tem papel essencial no desenvolvimento diferencial dos ovários (Schmidt-Capella e Hartfelder, 1998, 2002) e também da espermateca (Silva, 2005) de rainhas e operárias. O HJ influencia diretamente os processos de proliferação celular (Schmidt-Capella e Hartfelder, 1998; 2002) e de morte celular programada nos ovários (Hartfelder e Steinbrück, 1997).

Fêmeas de *A. mellifera* apresentam ovários do tipo meroístico-politrófico, nos quais cada oócito está interconectado a um grupo de células nutridoras ou trofócitos, formando um cisto envolto por células pré-foliculares (King, 1970). Nos primeiros estágios larvais, os ovários das futuras operárias e rainhas não diferem no tamanho e no número de ovaríolos, apresentando entre 150 e 180 ovaríolos cada um (Snodgrass, 1974). Durante o período larval, a partir do final do segundo estágio e continuando até o início do último (quinto), ocorre gradualmente um processo de diferenciação dos ovários de rainhas e operárias (Dedej et al., 1998). No final do quinto estágio larval o número de ovaríolos nos ovários de rainhas é mantido. Os ovários de operárias, ao contrário, sofrem um processo de degeneração, permanecendo apenas poucos ovaríolos funcionais (2-8 em cada ovário) (Snodgrass, 1974).

A JHE é sintetizada pelo corpo gorduroso e liberada para a hemolinfa, onde hidrolisa o HJ (Weirich et al., 1973). No entanto, o RNA mensageiro da JHE está presente também em outros tecidos (Feng et al., 1999; Vermunt et al., 1999). A atividade da JHE foi detectada em outros tecidos além do corpo gorduroso, incluindo os ovários (Lassiter et al., 1996).

A análise da expressão de *Amjhe* e *Amjheh* nos ovários mostrou diferenças entre ambas as castas e está coerente com o papel atribuído às enzimas codificadas por esses genes. O número de transcritos de ambos os genes é acentuadamente maior em ovários de operárias. Maiores quantidades destas enzimas nos ovários de operárias podem agir reduzindo os níveis de HJ, e conseqüentemente, o processo de morte celular seria maior nos ovários destas fêmeas, tendo como conseqüência a redução do número de ovários. Ao contrário, o baixo número de transcritos destes genes em ovários de larvas de rainhas sugere que ocorra uma prevenção do processo de degradação do HJ específica neste órgão, e conseqüentemente de degeneração dos ovários desta casta.

O perfil de expressão dos genes das enzimas de degradação do HJ nos ovários não é compatível com o perfil de expressão no quinto estágio larval de operárias e rainhas, quando as amostras consistiam de larvas inteiras sem o intestino. O maior sítio de produção destas enzimas é o corpo gorduroso, assim, podemos concluir que os resultados para as análises durante o quinto estágio sobrepujaram os efeitos observados para os transcritos em ovários. O mecanismo de regulação da transcrição dos genes de degradação do HJ deve ser específico nos ovários, sendo que sua regulação deve estar relacionada a outros fatores além da ação de hormônios morfogenéticos.

5.4 A via de síntese do hormônio juvenil

Na tentativa de identificar o complexo transcriptoma dos CA de insetos, vários trabalhos foram realizados utilizando *differential display* e análises de ESTs nesta glândula (Shinoda e Itoyama, 2003; Noriega et al., 2006; Helvig et al., 2004), como resultado uma lista de genes envolvidos na via de síntese do HJ está disponível. A disponibilidade do genoma de *A. mellifera* e as seqüências de genes da via de síntese do HJ geradas abriram a possibilidade de identificar ortólogos putativos para os genes envolvidos na produção de HJ pelos CA.

Os genes foram anotados e a arquitetura de cada um determinada. Interessantemente, o gene codificador da HMGS não apresentou nenhum íntron. O gene correspondente em *Dendroctonus. jeffreyi* e *Ips pini* também são genes sem íntrons. *B. germanica* é um inseto apresenta dois genes codificando para HMGS, um deles não apresenta íntrons, então, os autores sugeriram que a cópia sem íntrons surgiu a partir de um evento de retrotransposição recente originado a partir da cópia contendo íntrons (Casal et al., 2001).

O genoma de *A. mellifera* foi o primeiro do grupo dos Himenópteros a ser seqüenciado (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). Uma dentre as muitas características deste genoma que merecem atenção especial é o incrível número de genes duplicados (cerca de 60 genes) quando ortólogos de cópia única foram identificados em genomas de outros Metazoários. A fixação destas duplicações de genes outrora em cópia única é rara e tem sido associada com a emergência de funções espécie-específicas. Alguns destes genes podem ser relevantes para as diferenças do tipo de vida solitária para social (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). Um exemplo interessante de duplicação gênica é a farnesil difosfato sintase, envolvida no

metabolismo do colesterol e hormônio juvenil, que ocorre como cópia única no genoma de todos os Diptera seqüenciados, mas que possui 7 cópias em *A. mellifera* (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006).

A FPPS é uma enzima C15-produtora, membro da família das prenilttransferases; que é uma família de enzimas estruturalmente relacionadas envolvidas na biosíntese de terpenos (Onhuma et al., 1996). A FPPS é uma enzima homodimérica que cataliza o acoplamento seqüencial de dimetilalil difosfato (DMAPP) com duas moléculas de IPP, produzindo o intermediário, farnesil difosfato (FPP) (Szkopinska e Plochocka, 2005). O FPP é utilizado como precursor de uma série de compostos como dolicois, ubiquinonas, colesterol, fitoesteróides e sesquiterpenos. O mais conhecido entre eles é o sesquiterpeno, hormônio juvenil (Riddiford, 1996; de Kort e Granger, 1996; Gilbert et al., 2000). Devido a sua importância biológica na via de síntese do HJ, a FPPS foi estudada em *B. mori* (Koyama et al., 1985, Kikuchi et al., 2001), *Agrotis ipsilon* (Castillo-Gracia e Couillaud, 1999) e *Manduca sexta* (Sen e Sperry, 2002; Kinjoh et al., 2007). Em *B. mori* três diferentes FPPSs foram identificadas, sendo que duas delas têm expressão quase exclusiva nos CA (Kinjoh et al. 2007).

Apesar da existência de 7 isoformas de FPPSs em *A. mellifera*, os genes parecem ter sofrido vários processos de mutação em suas seqüências, gerando grandes deleções como é o caso da isoforma 7 que perdeu um dos éxons e consequentemente um motivo funcional de suma importância para a função de FPPS, denominado FARM (Ashby e Edwards, 1990). A isoforma 5 também perdeu parte de dois éxons e um íntron completo. As análises de estrutura gênica e de quantificação dos transcritos apontam para a isoforma 3, como sendo a maior responsável pela síntese da FPPS participante da

via de síntese do HJ, no entanto, a participação das outras isoformas não pode ser descartada, ainda que em menor escala.

Em relação ao penúltimo passo da via de síntese de HJ que envolve uma metiltransferase, foram analisados dois genes. O primeiro deles é o ortólogo da ácido farnesóico *O*-metiltransferase (FAMeT) de crustáceos e o segundo o ortólogo da HJ-ácido metiltransferase (JHAMT) de *B. mori*. A FAMeT foi estudada na abelha *Melipona scutellaris* (Vieira et al., 2008), os autores encontraram diferenças quanto à expressão deste gene entre castas, no entanto, não está claro se a FAMeT participa ou não da via de síntese do HJ. Um estudo recente sobre a FAMeT em *D. melanogaster* descartou a participação desta enzima na via de síntese do HJ (Burtenshaw et al., 2008). A FAMeT de *D. melanogaster* foi isolada e uma FAMeT recombinante (rFAMeT) clonada, expressada e um anticorpo específico foi produzido. A rFAMeT foi testada para atividade enzimática em ensaio radioquímico, mas nenhuma atividade foi detectada. O anticorpo gerado confirmou a presença da FAMeT nos CA, mas os autores concluíram que a FAMeT de *D. melanogaster* não tem nenhuma ação sobre a via de síntese de sesquiterpenóides. A FAMeT de *A. mellifera* não apresenta nenhum domínio de metiltransferase segundo análises de busca pelo *NCBI Conserved Domain*. Apesar da existência do transcrito correspondendo à FAMeT ter sido encontrado nos CA, o gene da metiltransferase ortóloga da JHAMT de *B. mori* parece reter a função de metiltransferase da via de síntese do HJ em *A. mellifera*, pois, esta enzima possui um domínio metiltransferase SAM-dependente, e tem os níveis de transcritos muito altos nos CA quando comparados a outros tecidos.

Para as análises de quantificação de genes envolvidos na via de síntese do HJ nos CA foram selecionados previamente 25 genes, incluindo as 7 isoformas de FPPS.

Estes genes foram analisados quanto ao número de transcritos em quatro tecidos diferentes de operárias forrageiras. Os dados gerados mostraram que os genes codificadores de oito proteínas têm altas taxas de transcrição nos CA: Adenosilhomocisteinase (ACH-isoforma 1), Farnesil difosfato sintase (FPPS-isoforma 3), Isopentenil-difosfato-delta-isomerase (IPPI), Hidroximetilglutaril-CoA sintase (HMGS), Hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMGR), Metil transferase do HJ-ácido (MT), *O*-metiltransferase do ácido farnesóico (FAMET) e Metil farnesoato epoxidase (MFE). As análises posteriores incluíram sete deles, com exceção do *ahc1*. O perfil de expressão destes genes foi analisado nos CA em quatro fases do desenvolvimento. Todos os genes tiveram expressão acentuada nos CA de fêmeas adultas em fases que o HJ está sendo produzido em grandes quantidades. O perfil encontrado para *fpps3* por Bomtorin (2006) é o mesmo encontrado para estes genes; neste caso o gene *ippi* não foi analisado. As análises da HMGR de *A. mellifera* por *Western blot* corroboram com os perfis observados de quantificação gênica.

Análises por micro-arranjos de DNA em camundongos recebendo diferentes dietas à base de colesterol revelaram que apenas um conjunto de genes codificadores de enzimas da via dos isoprenóides são afetados significativamente em seus níveis de transcritos, sendo eles os genes codificadores da HMGS, IPP isomerase e FPPS (Soccio et al., 2002). De maneira similar, análises por micro-arranjos de DNA mostraram que a mevalonato kinase é a enzima mais afetada por proteínas de ligação a um elemento de resposta ao esterol (Horton et al., 2003). Em nossos experimentos, nós mostramos que apenas dois genes, sofrem alterações transcricionais em resposta ao *status* nutricional, sendo eles: *mfe* e *ippi*.

Geralmente, os dados têm mostrado que os níveis de HJ podem ser compreendidos em termos de regulação coordenada de enzimas de sua síntese e controle do metabolismo (Gibbons, 2003; Keeling et al., 2004), do que em termos de um passo regulatório. Contudo, Rachinsky et al. (2000) mostraram que no início do quinto estágio larval, quando os CA sintetizam menos HJ naturalmente, que uma produção limitada dos precursores de HJ pode ser observada juntamente com um bloqueio casta e estágio específico do passo final da via de síntese do HJ, que envolve a MFE.

Neste trabalho nós mostramos que os perfis de expressão de alguns genes da via de síntese são coordenados e que o padrão de expressão acompanha os títulos de HJ. No entanto, em relação aos efeitos da dieta sobre os níveis de transcrição de genes da síntese do HJ apenas dois genes são afetados. Os nossos dados aliados aos dados publicados por Rachinsky et al. (2000) indicam a MFE como uma possível enzima limitante da síntese do HJ, mas que a maioria dos passos da via de síntese do HJ são ligados ou desligados em momentos específicos, provavelmente como uma resposta nos CA como um todo.

Nossas observações sugerem que uma mudança na alimentação de operárias adultas, que passam a receber uma dieta exclusiva de carboidratos, não só é capaz de aumentar a transcrição do passo final da via de síntese do HJ-III, como também altera os níveis de JHE e JHEH, culminando num momento biológico propício para o aumento dos níveis de HJ na hemolinfa. Nossa hipótese, é que a alimentação com açúcar mimetize os momentos que antecedem a atividade de forrageamento. Durante o desenvolvimento normal do polietismo etário este é o momento em que a operária muda de dieta e passa a alimentar-se com uma dieta rica em açúcar e sai para o campo

(Haydak, 1970). A alimentação, portanto, pode ser um processo fundamental para a mudança de função de abelha nutriz para forrageira.

Helvig et al. (2004) foram os primeiros a identificar, em *Diploptera punctata*, o gene codificador da MFE. Estes autores mostraram que a expressão do gene desta MFE é específica nos CA. As enzimas citocromo P450 (CYPs), a qual pertence a MFE, são uma grande família de proteínas, sendo que a maioria delas age como monooxigenases, catalizando reações inespecíficas (Feyereisen, 1999). No entanto, a MFE parece ter função e regulação voltada para a síntese do HJ nos CA. Os resultados encontrados até o momento apontam o gene da MFE, correspondente ao **GB15634**, que possui expressão tecido-específica nos CA de *A. mellifera*. Os dados corroboram aqueles originados de análises de filogenia molecular, que apontaram o **GB15634**, como o provável ortólogo da MFE em *A. mellifera* (Claudianos et al., 2006).

As análises realizadas sobre o promotor do gene da MFE, utilizando ferramentas de bioinformática, mostraram características únicas e interessantes para este gene. Utilizando-se a metodologia descrita por Cristino et al. (2006), foi localizada a região conservada CA-JH na região promotora de *mfe*, que aparece também em outros genes da via de síntese do HJ. Na região promotora do *mfe* foi também localizado um motivo de DNA similar ao CF1-USP. Análises “in silico” sobre a região promotora do gene codificador de uma proteína de ligação ao HJ (JHBp) em *B. mori* mostrou que um elemento detectado por análises de bioinformática participava da regulação da transcrição deste gene (Sok et al., 2008). Utilizando técnicas para análises de seqüências promotoras como *Gel mobility Shift Assay* e *footprinting* os autores mostraram que um elemento CF1-USP possui alta afinidade com a proteína USP, e que deleções na região promotora contendo o elemento CF1-USP aumentou a atividade transcricional de um

gene reporter em uma linhagem celular de *Trichoplusia ni*. A presença do elemento CF1-USP na região promotora do gene *mfe* de *A. mellifera* pode indicar um papel da proteína USP sobre a regulação dos níveis de síntese de HJ nos CA.

Dentre os fatores de regulação da síntese do HJ o controle inibitório, através das allostatinas (AS), e estimulatório, pelas alatotropinas (AT), originados no sistema nervoso e tendo como alvo os CA (Gilbert et al., 2000) tem sido extensivamente estudado em insetos.

Em *A. mellifera* vários trabalhos com o intuito de localizar e estudar as ATs e ASs foram realizados, no entanto, nenhum deles foi capaz de descrever a ação destes peptídeos sobre a regulação da atividade dos CA. Em *A. mellifera*, o peptídeo sintético Manse-AT foi capaz de estimular os CA *in vitro* (Rachinsky e Feldlaufer, 2000). No entanto, análises utilizando imunocitoquímica, não foram capazes de localizar este mesmo peptídeo nos CA durante o estágio larval (Glasscock et al., 2005). Desta forma, não está claro se este peptídeo tem atividade sobre os CA *in vivo*. Audsley et al. (2006) fez a predição da allostatina Y/FXFGL-amide a partir do genoma de *A. mellifera*. Análises posteriores por espectrometria de massa mostraram a presença das ASs Apime-AS 2, 3 e 4, correspondentes à AS predita, em extratos de cérebro de *A. mellifera*. As mesmas moléculas não foram encontradas em extratos de CA. Os autores sugeriram, então, que estas ASs não devem estar envolvidas na regulação da síntese de HJ. Além disto, Rachinsky e Feldlaufer (2000) mostraram que estas moléculas não inibem a síntese de HJ nos CA durante o estágio larval. Todos estes dados ainda não são suficientes para o esclarecimento de como ocorre a ação das ATs e ASs sobre os CA em *A. mellifera*, ou se existe um outro sistema de regulação em abelhas.

Recentemente Barchuk et al. (2007) mostraram através da metodologia de micro-arranjos de DNA que o processo de diferenciação de castas está ligado a um aumento dos genes do metabolismo nas rainhas e a ativação de genes “novos” em operárias. Estes autores sugeriram um modelo para o processo de diferenciação de castas em *A. mellifera*, envolvendo a regulação das taxas de HJ nos CA (Figura 29). Neste modelo o tipo de alimento ingerido pela larva é primeiro reconhecido pelo sistema receptor nas células epiteliais do intestino, em seguida pelo sistema de sinalização via sistema nervoso entomogástrico que então, manda informação ao complexo retrocerebral. A atividade dos CA e dos tecidos alvo são reguladas pelas moléculas de insulina/IGF secretadas pelas células neurosecretoras do cérebro. Assim, o alto estímulo alimentar em larvas que originarão rainhas resulta na ativação da via de insulina/IGF e do sistema TOR, que então aumentam a produção de HJ nos CA e ligam o sistema de comunicação via corpo gorduroso. A “geléia de operárias”, por outro lado, afeta o sistema insulina/IGF que não é capaz de ativar a síntese de HJ nos CA para os mesmos níveis verificados no desenvolvimento de rainhas (Figura 29).

Apesar do reconhecimento atual de que o sistema insulina/TOR atue sobre o processo de diferenciação de castas, não está claro como este sistema sinaliza os CA para o aumento de produção de HJ em rainhas. Este sistema pode atuar por dois caminhos: (1) diretamente via receptores de insulina (InR) localizados na membrana dos CA ou (2) indiretamente via sistema nervoso central atuando sobre a produção e regulação de agentes alato-regulatórios.

Figura 29 – Modelo geral proposto para o processo de diferenciação de castas em *Apis mellifera*. As setas representam a ação dos fatores considerados sobre seus alvos. Setas truncadas demonstram que os fatores de regulação não estão agindo. (esquema publicado por Barchuk et al., 2007).

Wheeler et al. (2006) mostraram que o padrão de expressão de genes codificadores de ILPs é alterado quando larvas de rainhas e operárias são transferidas de suas células naturais para células da outra casta, recebendo portanto, a alimentação específica da outra casta (geléia real ou geléia de operária). A interferência do RNA do gene *AmTor* em larvas de rainhas causa o bloqueio de acúmulo de gordura e resulta num fenótipo de operária ao final do desenvolvimento (Patel et al., 2007).

Em relação ao estágio adulto, a Rapamicina mostrou regular o início do forrageamento em *A. mellifera*, sendo esta outra evidência para o controle dos CA via sistema de regulação insulina/TOR. O sistema de sinalização por insulina está envolvido na regulação da divisão de trabalho em colônias *A. mellifera* e envolve a regulação de

genes codificadores de ILPs (Ament et al., 2007). Por esta razão, acreditamos que um estudo detalhado da influência do sistema de regulação por insulina sobre os CA deva ser realizado para elucidar o controle da produção do HJ pelos CA.

Até o momento as evidências apontam a nutrição como um fator de importância na regulação dos CA no estágio adulto. Tal processo já é bem entendido durante o desenvolvimento larval de fêmeas que leva à formação de dois fenótipos completamente distintos: rainhas e operárias. No entanto, este trabalho mostra evidências para o controle da nutrição sobre a atividade dos CA, e também sobre a atividade de degradação do HJ. Este controle nutricional parece regular os níveis de HJ e, portanto, deve ser parte do mecanismo regulatório do processo de polietismo etário.

No entanto, não está claro como a informação nutricional chega aos CA para a ativação ou inibição da síntese de HJ. A interferência da produção de vitelogenina pela técnica de RNA de interferência por Guidugli et al. (2006) mostrou um aumento significativo nos títulos de HJ na hemolinfa. Os autores sugeriram uma possível função da vitelogenina sobre a taxa de síntese de HJ nos CA.

A vitelogenina (Vg) é uma proteína monomérica de 180 KDa (Wheeler e Kawooya, 1990). Amdam et al. (2003b) foram capazes de identificar o receptor de Vg (VgR) na membrana da glândula hipofaringeana (HPG) em abelhas operárias adultas jovens, indicando a entrada da Vg na glândula, sendo a Vg, neste caso, considerada como fornecedora de aminoácidos. A HPG é responsável pela produção de geléia real em abelhas jovens. Amdam et al. (2003b) comprovaram que a vitelogenina entra na HPG, pois, um aminoácido marcado na molécula de Vg (^{14}C -vitelogenina) e injetado em abelhas jovens foi transferido para outros membros da colônia incluindo larvas, operárias e rainhas, provavelmente transportado pela secreção glandular regularmente

produzida e oferecida a estes membros da colônia pelas nutrízes. Uma hipótese para explicar a função da Vg como reguladora dos CA pode ser como sinalizadora da disponibilidade de aminoácidos. Assim, a diminuição da Vg que acontece naturalmente durante a transição da função de nutriz para forrageira, funcionaria como um mecanismo sinalizador da falta de aminoácidos. Como resposta ocorreria o aumento da síntese de HJ pelos CA, e como consequência o início da função de forrageamento, que leva à coleta de pólen. Neste caso, o receptor de Vg deve estar presente na membrana dos CA.

A dieta rica em açúcar ministrada para abelhas operárias não só é capaz de aumentar a transcrição do gene *mfe*, provável passo limitante da via de síntese do HJ, e diminuir os níveis de JHE e JHEH na hemolinfa e corpo gorduroso, respectivamente, como também esse tipo de alimentação diminui drasticamente os níveis de Vg na hemolinfa (Lourenço et al., 2008). Todos esses dados levam a crer que a Vg, JHE, JHEH e MFE atuam em conjunto para a regulação dos níveis de HJ no estágio adulto.

Recentemente, Kucharski et al. (2008) mostraram que a diminuição dos níveis de transcrição de uma metiltransferase envolvida no controle epigenético, *Dnmt3*, pela técnica de interferência de RNA, leva ao desenvolvimento de características de rainhas em larvas destinadas a operárias, quando estas são alimentadas com uma dieta própria para o desenvolvimento de operárias. Os autores concluíram que o controle epigenético faz parte do circuito regulatório que leva ao desenvolvimento diferencial das castas. Análises de micro-arranjos de DNA foram feitas visando a identificação de genes que tivessem aumento em seus níveis de transcritos após o silenciamento do gene *Dnmt3*. Entre os 50 genes mais expressos em larvas *knock-down* para *Dnmt3* identificados está o gene correspondente ao **GB12573**, codificador de uma citrato sintase (CS), esta

enzima é responsável pela síntese de citrato na mitocôndria. O citrato é utilizado na via de síntese do HJ para a síntese de Acetil-CoA. O gene da CS mostrou ser transcrito nos CA em nosso trabalho, podendo, então, ser um dos genes alvo para a ação do controle epigenético sobre os CA, no entanto, nenhum gene da via do mevalonato ou codificador de enzimas dos passos específicos para produção de HJ pelos CA em insetos foi identificado pelas análises feitas por Kucharski et al. (2008).

Assim, acreditamos que contribuímos de maneira significativa para o conhecimento deste sistema instigante que controla toda a homeostasia em uma colônia deste inseto social – *Apis mellifera* – no entanto, seguramente elementos importantes ainda deverão ser acrescentados a este cenário.

Ilustração: A. Fagundes; *In*: Freire, 2006.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- O gene referente ao **GB15327**, denominado *Amjhe-like*, é regulado por um balanço entre os níveis de hormônio juvenil e ecdisteróides durante o ciclo de vida de abelhas melíferas;
- A interferência nos níveis de transcrição do gene *Amjhe-like* causa aumento dos níveis de hormônio juvenil na hemolinfa e, portanto, este gene tem função sobre a regulação dos títulos de hormônio juvenil;
- O perfil de transcrição do gene *Amjhe-like* é condizente com a função de uma esterase do hormônio juvenil;
- As diferenças encontradas em relação aos motivos catalíticos da *Amjhe-like* sugerem modificações para o modo de vida social;
- O único gene codificador de uma epóxido hidrolase (EH) encontrado no genoma de *Apis mellifera* (*Amjheh*) possui função condizente com uma EH relacionada à degradação do hormônio juvenil;
- A transcrição do gene *Amjheh* não é regulada por hormônios morfogenéticos em *Apis mellifera*, porém os níveis de AmJHEH se alteram de acordo com o tipo de alimento oferecido nos estágios larval e adulto;
- Os níveis de transcrição dos genes *Amjhe-like* e *Amjheh* possuem um perfil casta-específico em *Apis mellifera*;
- O perfil de expressão de *Amjhe-like* e *Amjheh* nos ovários de rainhas e operárias durante o período crítico para a diferenciação de castas sugerem que a regulação dos níveis de hormônio juvenil neste órgão é controlada adicionalmente pelos níveis de degradação deste hormônio;

-
- Os genes da via de síntese do mevalonato são conservados em *Apis mellifera* em relação a genes de outros insetos;
 - O perfil de expressão dos genes da via de síntese do hormônio juvenil durante o ciclo de vida das abelhas sugere um controle liga-desliga dos *corpora allata*;
 - A alimentação durante o estágio adulto atua sobre o controle da transcrição de dois genes codificadores de enzimas da via de síntese do hormônio juvenil: metil farnesoato epoxidase e isopentenil difosfato isomerase, ao mesmo tempo em que controla o mecanismo de degradação do hormônio juvenil, regulando os níveis de transcrição dos genes: *Amjhe-like* e *Amjheh*;
 - Apenas um de sete genes codificadores da enzima farnesil difosfato sintase presentes no genoma de *Apis mellifera* possui transcrição acentuada nos *corpora allata*;
 - Os mecanismos de degradação e síntese nos *corpora allata* do hormônio juvenil agem em conjunto para regular os títulos deste hormônio.

Ilustração: A. Fagundes; *In*: Freire, 2006.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amdam, G.V.; Omholt, S.W. (2003) The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *J. Theor. Biol.*, 223: 451-464.
- Amdam, G.V.; Simões, Z.L.P.; Guidugli, K.R.; Norberg, K.; Omholt, S.W. (2003a) Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intraabdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnol*, 3:1:8 pages, available online: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/3/1>.
- Amdam, G.V.; Norberg, K.; Hagen, A.; Omholt, S. (2003b) Social exploitation of vitellogenin. *PNAS*, 100(4): 1799-1802.
- Amdam, G.V.; Aase, A.; Seehuus, S.C.; Fondrk, M.K.; Norberg, K.; Hartfelder, K. (2005) Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp. Gerontol.*, 40: 939-947.
- Amdam, G.V.; Nilsen, K-A.; Norberg, K.; Fondrk, M.K.; Hartfelder, K. (2007) Variation in endocrine signaling underlies variation in social life history. *Am. Nat.*, 170: 37-46.
- Ament, S.A.; Corona, M.; Pollock, H.S.; Robinson, G.E. (2007) Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *PNAS*, 105(11): 4226-4231.
- Andersen, C.L.; Jensen, J.L.; Orntoft, T.F. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, 64: 5245-5250.
- Ashbey, M.N.; Edwards, P.A. (1990) Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthase. *J. Biol. Chem.*, 265: 13157-64.
- Audsley, N.; Weaver, R.J. (2006) Analysis of peptides in the brain and corpora cardiaca–corpora allata of the honey bee, *Apis mellifera* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Peptides*, 27: 512 – 520.
- Baker, F.C.; Reuter, C.C.; Tsai, L.W.; Brindle, P.A.; Richard, D.S. (1990) Use of microderivatization techniques in combination with thin-layer chromatography, liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for investigation of juvenile hormones and related compounds. In: *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones*, ed. AR McCaffery, ID Wilson, pp. 19–31. New York: Plenum.
- Barchuk, A.R.; Bitondi, M.M.G.; Simões, Z.L.P. (2002) Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen

- and worker pupae of *Apis mellifera*. *J. Insect of Science*, 2.1:8 pages, available online [http:// www.insectscience.org/2.1](http://www.insectscience.org/2.1).
- Barchuk, A.R.; Cristino, A.S.; Kucharski, R.; Costa, L.F.; Simões, Z.L.P; Maleszka, R. (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev. Biol.*, 7: 70.
- Barron, A.B.; Oldroyd, B.P.; Ratnieks, F.L.W. (2001) Worker reproduction in honeybees (*Apis*) and the anarchic syndrome: a review. *Behavioral Ecol. Sociobiol.*, 50: 199-208.
- Barth, R.H.; Lester, L.J.; Sroka, P.; Kessler, T.; Hearn, R. (1975). Juvenile hormone promotes dominance behavior and ovarian development in social wasps (*Polistes annularis*). *Experientia*, 31: 691-692.
- Bede, J.C.; Teal, P.E.A.; Goodman, W.G.; Tobe, S.S. (2001) Biosynthetic Pathway of Insect Juvenile Hormone III in Cell Suspension Cultures of the Sedge *Cyperus iria*. *Plant Physiology*, 127: 584-593.
- Beetham, J.K.; Grant, D.; Arand, M.; Garbarino, J.; Kiyosue, T.; Pinot, F.; Oesch, F.; Belknap, W.R.; Shinozaki, K.; Hammock, B.D. (1995) Gene evolution of epoxide hydrolases and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 14: 61-71.
- Beetsma, J. (1979) The process of queen-worker differentiation in the honeybee. *Bee World*, 60(1): 24-39.
- Bell, W.J. (1973). Factors controlling initiation of vitellogenesis in a primitively social bee, *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera:Halictidae). *Insects Sociaux*, 20: 253-260.
- Bellés, X.; Martín, D.; Piulachs, M.D. (2005) The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 50:181-99.
- Bomtorin, A.D. (2006) Identificação em *Apis mellifera* do gene codificador da enzima Farnesil Difosfato Sintase, membro da via de síntese do Hormônio Juvenil. Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-54.
- Burtenshaw, S.M.; Su, P.P.; Zhang, J.R.; Tobe, S.S.; Dayton, L.; Bendena, W.G. (2008) A putative farnesoic acid O-methyltransferase (FAMeT) orthologue in *Drosophila melanogaster* (CG10527): Relationship to juvenile hormone biosynthesis? *Peptides*, 29: 242-251.
- Caetano-Anollés, G.; Gresshoff, P.M. (1994) Staining nucleic acids with silver: na alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promega Notes Magazine* 45, 13-21.

- Campbell, P.M.; Healy, M.J.; Oakshott, J.G. (1992) Characterization of juvenile hormone esterase in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 22, 665-677.
- Casals, N.; Buesa, C.; Marrero, P.F.; Belles, X.; Hegardt, F.G. (2001) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase-1 of *Blattella germanica* has structural and functional features of an active retrogene. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 425-33.
- Castillo-Gracia, M.; Couillaud, F. (1999) Molecular cloning and tissue expression of an insect farnesyl diphosphate synthase. *Eur. J. Biochem.*, 262: 365-70.
- Christianson, A.M.D.; King, D.L.; Hatzivassiliou, E.; Casas, J.E. Hallenbeck, P.L.; Nikodem, V.M.; Mitsialis, A.; Kafatos, F.C. (1992) DNA binding and heteromerization of the *Drosophila* transcription factor chorion factor 1/ultraspiracle. *PNAS*, 89: 11503-11507.
- Clark, A.J.; Bloch, K. (1959) The absence of sterol synthesis in insects. *J. Biol. Chem.*, 234: 2578-82.
- Claudianos, C.; Ranson, H.; Johnson, R.M.; Biswas, S.; Schuler, M.A.; Berenbaum, M.R.; Feyereisen, R.; Oakshott, J.G. (2006) A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 615-636.
- Cnaami, J.; Borst, D.W.; Huang, Z.Y.; Robinson, G.E.; Hefetz, A. (1997) Caste determination in *Bombus terrestris*: differences in development and rates of JH biosynthesis between queen and worker larvae. *J. Insect Physiol.*, 43(4): 373-381.
- Cristino, A.S.; Nunes, F.M.F.; Lobo, C. H.; Bitondi, M.M.G.; Simões, Z.L.P.; Fontoura-Costa, L.; Lattorff, H.M.G.; Moritz, R.F.A.; Evans, J.D.; Hartfelder, K. (2006) Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 703-714.
- Crone, E.J.; Sutherland, T.D.; Campbell, P.M.; Coppin, C.W.; Russell, R.J.; Oakshott, J.G. (2007) Only one esterase of *Drosophila melanogaster* is likely to degrade juvenile hormone *in vivo*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37: 540-549.
- de Kort, C.A.D.; Koopmanschap, A.B. (1986). High molecular weight transport proteins for JH-III in insect hemolymph. *Experientia*, 42 : 834-836.
- de Kort, C.A.D.; Koopmanschap, A.B. (1987) Specificity of binding of juvenile hormone III to hemolymph proteins of *Leptinotarsa decemlineata* and *Locusta migratoria*. *Experientia*, 43 :904-905.
- de Kort, C.A.D.; Koopmanschap, A.B. (1989) Binding of juvenile hormone III to lipophorin from the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 11: 159-172.

- de Kort, C.D.A.; Granger, N.A. (1996) Regulation of JH titers: The relevance of degradative enzymes and binding proteins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 33: 1-26.
- de Wilde, J.; Beetsma, J. (1982) The physiology of caste development in social insects. *Adv. Insect Physiol.*, 16: 167-256.
- Debernard, S.; Morisseau, C.; Severson, T.F.; Feng, L.; Wojtasek, H.; Prestwich, G.D.; Hammock, B.D. (1998) Expression and characterization of the recombinant juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH) from *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 28: 409.
- Dedej, S.; Hartfelder, K.; Aumeier, P.; Rosenkranz, P.; Engels, W. (1998) Caste determination is a sequential process: effect of larval age at grafting on ovariole number, hind leg size and cephalic volatiles in the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *J. Apicultural Res.*, 37(3): 183-190.
- Elekonich, M.M.; Jez, K.; Ross, A.J.; Robinson, G.E. (2003) Larval juvenile hormone treatment affects pre-adult development, but not adult age at onset of foraging in worker honey bees (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.*, 49: 359-366.
- Feldlaufer, M.F.; Herbert, Jr.E.W.; Svoboda, J.A.; Thompson, M.J.; Lusby, W.R. (1985) Makisterone A: The major ecdysteroid from pupa of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem.*, 15: 597-600.
- Feng, Q.L.; Ladd, T.R.; Tomkins, B.L.; Sundaram, M.; Sohi, S.S.; Retnakaran, A.; Davey, K.G.; Palli, S.R. (1999) Spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) juvenile hormone esterase: hormonal regulation, developmental expression and cDNA cloning. *Molec. Cell. Endocrinol.*, 148: 95-108.
- Feyreisen, R. (1999) Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 44: 507-33.
- Fluri, P.; Lüscher, M.; Wille, H.; Gerig, L. (1982) Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titers of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *J. Insect Physiol.*, 28: 61-68.
- Freira, A.M. (2006) Que zunzunzum é esse no sertão do Araripe: Um guia prático para o jovem apicultor/ Freire, A.M.; Maranhão, P.S.; Ilustração de Álvaro Fagundes, Recife, SEBRAE.
- Gibbons GE. (2003) Regulation of fatty acid and cholesterol synthesis: cooperation or competition? *Progr. Lipid Res.*, 42: 479-97.
- Gilbert, L.I.; Granger, N.A.; Roe, R.M. (2000) The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30:617-644.
- Giray, T.; Robinson, G.E. (1996) Common endocrine and genetic mechanisms of behavioral development in male and worker honey bees and the evolution of division of labor. *PNAS*, 93: 11718-11722.

- Glasscock, J.M.; Mizoguchi, A.; Rachinsky, A. (2005) Immunocytochemical localization of an allatotropin in developmental stages of *Heliothis virescens* and *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.*, 51: 345–355.
- Goewie, E.A.; Beetsma, J. (1976) Induction of caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera* L.) after topical application of JH III. *Proc. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschap*, 79C: 466-469.
- Goldstein, J.L.; Brown, M.S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343: 425-30.
- Guidugli, K.R.; Nascimento, A.M.; Amdam, G.V.; Barchuk, A.R.; Omholt, S.; Simoes, Z.L.P. Hartfelder, K. (2006) Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Lett.*, 579: 4961-4965
- Halarnkar, P.P.; Schooley, D.A.; (1990) Reverse-phase liquid chromatographic separation of juvenile hormone and its metabolites, and its application for an in vivo juvenile hormone catabolism study in *Manduca sexta*. *Analyt. Biochem.*, 188: 394–397.
- Halarnkar, P.P.; Jackson, G.P.; Straub, K.M.; Schooley, D.A. (1993) Juvenile hormone catabolism in *Manduca sexta*: homologue selectivity of catabolism and identification of a diol-phosphate conjugate as a major end product. *Experientia*, 49: 988-994.
- Hammock, B.D. (1985) Regulation of juvenile hormone titre: degradation. In: Kerkut GA, Gilbert LI (eds) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol 7. Pergamon, Oxford, pp 431–472.
- Hammock, B.D.; Pinot, F.; Beetham, J.K.; Grant, D.F.; Arand, M.E.; Oesch, F. (1994) Isolation of a putative hydroxyacyl enzyme intermediate of an epoxide hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 198: 850-856.
- Harris, S.; Thompson, D.; Linderman, R.J.; Tomalski, M.D.; Roe, R.M. (1999) Cloning and expression of a novel juvenile hormone-metabolizing epoxidase hydrolase of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Mol. Biol.*, 8: 85-96.
- Hartfelder, K.; Köstlin, K.; Hepperle, C. (1995) Ecdysteroid-dependent protein synthesis in caste-specific development of the larval honey bee ovary. *Roux's Arch. Devel. Biol.*, 205: 73-80.
- Hartfelder, K.; Steinbrück, G. (1997) Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. *Invert. Reprod. Devel.*, 31(1-3): 237-250.
- Hartfelder, K.; Engels, W. (1998) Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr. Topics Dev. Biol.*, 40: 45-77

- Hartfelder, K. (2000) Insect juvenile hormone: from “status quo” to high society. *Brazilian J. Med. Biol. Research*, 33: 157-177.
- Hartfelder, K.; Bitondi, M.M.G.; Santana, W.C.; Simões, Z.L.P. (2002) Ecdysteroid titers and reproduction in queens and workers of the honey bee and of a stingless bee: loss of ecdysteroid function at increasing levels of sociality? *J. Insect Physiol.*, 32: 211-216
- Hartfelder, K.; Emlen, D.J. (2005) Endocrine control of insect polyphenisms. In: Gilbert, L.I.; Iatrou, K.; Gill, S.J. (eds) *Comprehensive Insect Molecular Science*, vol. 3. Elsevier, Oxford, pp 651-703.
- Haydak, M.H. (1970) Honey bee nutrition. *Annu. Rev. Entomol.*, 15:143-156.
- Helvig, C.; Koener, J.F.; Unnithan, G.C.; Feyereisen, R. (2004) CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach corpora allata. *PNAS*, 101(12):4024-4029.
- Hinton, A.C.; Hammock, B.D. (2001) Purification of juvenile hormone esterase and molecular cloning of the cDNA from *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 32: 57-66.
- Honey Bee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera*. *Nature*, 443: 931-949.
- Horton, J.D. (2002) Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.*, 30:1091–95.
- Horton, J.D.; Shah, N.A.; Warrington, J.A.; Anderson, N.N.; Park, S.W.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L.; (2003) Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *PNAS*, 100: 12027–12032.
- Huang, Z.Y.; Robinson, G.E.; Tobe, S.S.; Yagi, K.J.; Strambi, C.; Strambi, A.; Stay, B. (1991). Hormonal regulation of behavioral development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. *J. Insect Physiol.*, 37: 733-741.
- Huang, Z.Y.; Robinson, G.E. (1992). Honeybee colony integration: worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. *PNAS*, 89: 11726-11729.
- Huang, Z.Y.; Robinson, G.E.; Borst, D.W. (1994) Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. *J. Comp Physiol A*, 174: 731-739.
- Huang, Z.Y.; Robinson, G.E. (1996) Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 39: 147-158

- Ikeya, T.; Galic, M.; Belawat, P.; Nairz, K.; Hafen, E. (2002) Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Current Biol.*, 12: 1293–1300.
- Ismail, S.M.; Satyanarayana, K.; Bradfield, J.Y.; Dahm, D.H.; Bhaskaran, G. (1998) Juvenile hormone acid: evidence for a hormonal fat body of the bean bug, *Riptortus clavatus* by mRNA differential display. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28: 181-189.
- Ismail, S.M.; Goin, C.; Muthumani, K.; Kim, M.; Dahm, K. (2000) Juvenile hormone acid and ecdysteroid together induce competence for metamorphosis of the Verson's gland in *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.*, 46: 59-68.
- Jassim, O.; Huang, Z.Y.; Robinson, G.E. (2000) Juvenile hormone profiles of worker honey bees, *Apis mellifera*, during normal and accelerated behavioral development. *J. Zool.*, 48: 169-173.
- Jesudason P.; Anspaugh, D.D.; Roe, R.M. (1992) Juvenile hormone catabolism in the plasma, integumente, midgut, fat body and brain during the last instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 20: 87-105.
- Jones, G.; Venkataraman, V.; Ridley, B.; O'Mahony, P.; Turner, H. (1994) Structure, expression and gene sequence of a juvenile hormone esterase-related protein from metamorphosing larvae of *Trichoplusia ni*. *Biochem. J.*, 302: 827-835.
- Kamikouchi, A.; Morioka, M.; Kubo, T. (2004) Identification of Honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex-and/or caste selective manner. *Zoological Science*, 21: 53-62.
- Kamita, S.G.; Hinton, A.C.; Wheelock, C.E.; Wogulis, M.D.; Wilson, D.K.; Wolf, N.M.; Stok, J.E.; Hock, B.; Hammock, B.D. (2003) Juvenile hormone (JH) esterase: why are you so JH specific? *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33: 1261-1273.
- Keeling, C.I.; Blomquist, G.J.; Tittiger, C. (2004) Coordinated gene expression for pheromone biosynthesis in the pine engraver beetle, *Ips pini* (Coleoptera: Scolytidae). *Naturwissenschaften*, 91: 324–328.
- Keiser, K.C.L.; Hinton, A.C.; Silver, G.M. (2002) Cloning, partial purification and in vivo developmental profile of expression of the juvenile hormone epoxide hidrolase of *Ctenocephalides felis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 50: 191-206.
- Kethidi, D.R.; Perera, S.C.; Zheng, S.; Feng, Q.; Krell, P.; Retnakaran, A.; Palli, S.R. (2004) Identification and characterization of a JH response region in the juvenile hormone esterase gene from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *J. Biol. Chem.*, 279(19): 19634-19642.
- Kethidi, D.R.; Xi, Z.Y.; Palli, S.R. (2005) Developmental and hormonal regulation of juvenile hormone esterase gene in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, 51: 393–400.

- Khalil, S.M.; Anspaugh, D.D.; Roe, M. (2006) Role of juvenile hormone esterase and epoxide hydrolase in reproduction of the cotton bollworm, *Helicoverpa zea*. *J. Insect Physiol.*, 52(7): 669-78.
- Khlebodarova, T.M.; Grunteko, N.E.; Grenback, L.G.; Sukhanova, M.Z.; Mazukov, M.M.; Rauschenbach, I.Y.; Tomas, B.A.; Hammock, B.D. (1996) A comparative analysis of juvenile hormone metabolizing enzymes in two species of *Drosophila* during development. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26: 829-835.
- Kikuchi, K.; Hirai, M.; Shiotsuki, T.; (2001) Molecular cloning and tissue distribution of farnesyl pyrophosphate synthase from the silkworm *Bombyx mori*. *J. Insect Biotech. Ser.*, 70: 172-176.
- Kimura, K.; Trumam, J.W. (1990). Post-metamorphic cell-death in the nervous and muscular systems of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.*, 10(2): 403-411.
- King, R.C. (1970) Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York.
- Kinjoh, T.; Kaneko, Y.; Itoyama, K.; Mita, K.; Hiruma, K.; Shinoda, T. (2007) Control of juvenile hormone biosynthesis in *Bombyx mori*: Cloning of the enzymes in the mevalonate pathway and assessment of their developmental expression in the corpora allata. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37: 808-818
- Koopmanschap, A.B.; de Kort, C.A.D. (1988) Isolation and characterization of a high molecular weight JH-III transport protein in the hemolymph of *Locusta migratoria*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 7: 105-118.
- Koyama, T.; Matsubara, M.; Ogura, K. (1985) Isoprenoid enzyme systems of silkworm I. Partial purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase, farnesyl pyrophosphate synthetase, and geranylgeranyl pyrophosphate synthetase. *J. Biochem.*, 98: 449-456.
- Kramer, K.J.; Dunn, P.E.; Peterson, R.C.; Seballos, H.L. (1976) Purification and characterization of the carrier protein for juvenile hormone from the haemolymph of the tobacco hornworm *Manduca sexta* Johannson. *J. Biol. Chem.*, 251: 4979-4985.
- Kucharski, R.; Maleszka, J.; Foret, S.; Maleszka, R. (2008) Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319(5871): 1827-30.
- Lacourciere, G.M.; Vakharia, V.N.; Tan, C.P.; Morries, D.I.; Edwards, G.H.; Moos, M.; Armstrong, R.N. (1993) Interaction of hepatic epoxide hidrolase derived from recombinant baculovirus expression system with an azarene oxide and an zaziridine substrate analogue. *Biochem.*, 32: 2610-2616.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227: 680-685.

- Lassiter, M.T.; Apperson, C.S.; Roe, R.M. (1995) Juvenile hormone metabolism during the fourth stadium and pupal stage of the Southern House Mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J. Insect Physiol.*, 41: 869-876.
- Lassiter, M.T.; Apperson, C.S.; Roe, R.M. (1996) Juvenile hormone metabolism in the ovary, gut, head and carcass after blood feeding in the Southern House Mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 11: 229-237.
- Laufer, H.; Landau, M.; Homola, E.; Borst, D.W. (1987) Methyl farnesoate; its site of synthesis and regulation of secretion in a juvenile crustacean. *Insect Biochem.*, 17: 1129-31.
- Lourenço, A.P. (2007) Genes codificadores de peptídeos antimicrobianos e de outras proteínas envolvidas na resposta imune de *Apis mellifera*. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP para obtenção do título de Doutor, área: Genética.
- Lourenço, A.P.; Mackert, A.; Cristino, A.S.; Simões, Z.L.P. (2008) Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. Aceito para publicação: *Apidologie*, 39: 372-385.
- Mackert, A.; Nascimento, A.M.; Bitondi, M.M.G.; Hartfelder, K.; Simões, Z.L.P. (2008) Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. — Expression analysis and functional assays. *Comp. Biochem. Physiol. - Part B*, 150: 33-44.
- Martinez-Gonzalez, J.; Buesa, C.; Piulachs, M.D.; Belles, X.; Hegardt, F.G.; (1993) Molecular cloning, developmental pattern and tissue expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase of the cockroach *Blattella germanica*. *European J. Biochem.*, 213: 233-241.
- Maxwell, R.A.; Weleh, W.H.; Schooley, D.A. (2002a) Juvenile hormone kinase I. Purification, characterization, and substrate specificity of juvenile hormone-selective diol kinase from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.*, 277: 21874-21881.
- Maxwell, R.A.; Weleh, W.H.; Horodyski, F.M.; Schegg, K.M.; Schooley, D.A. (2002b) Juvenile hormone kinase II. Sequencing, cloning, and molecular modeling of juvenile hormone-selective diol kinase from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.*, 277: 21882-21890.
- Michellete, E.R.F.; Soares, A.E.E. (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, 24: 431-440.
- Michener, C.D. (1969) Comparative social behavior of bees. *Ann. Review Entomol.*, 14: 299-342.
- Michener, C.D. (1974) The social behavior of the bees: a comparative study. Cambridge, Mass., Harvard Univ. Press.

- Morisseau, C.; Hammock, B.D. (2005) Epoxide hydrolases: Mechanisms, inhibitor designs and biological roles. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 311-333.
- Mullin, C.A.; Wilkinson, C.F. (1980a) Purification of an epoxide hidrolase from the midgut of the Sourthern Army Worm (*Spodoptera eridania*). *Insect Biochem.*, 10: 681-691.
- Mullin, C.A.; Wilkinson, C.F. (1980b) Insect epoxide hidrolase: properties of a purified enzyme from the Southern Army Worm (*Spodoptera eridania*). *Pest Biochem. Physio.*, 14: 192-207.
- Mullin, C.A. (1988) Adaptative relationships of epoxide hidrolase in herbivorous arthropods. *J. Chem. Ecol.*, 14: 1867-1888.
- Newman, J.D.; Morisseau, C.; Hammock, B.D. (2005) Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Progress in Lip. Res.*, 44: 1-51.
- Nijhout, H.F.; Wheeler, D.E. (1982) Juvenile hormone and physiological basis of insect polymorphism. *Quaterly Review Biol.*, 57: 109-133.
- Nijhout, H.F. (1994) Insect hormones. Princeton University Press.
- Nijhout, H.F. (2003) The control of growth. *Development*, 130: 5863–5867.
- Noriega, F.G.; Ribeiro, J.M.C.; Koener, J.F.; Valenzuela, J.G.; Hernandez-Martinez, S.; Pham, V.M.; Feyereisen, R. (2006) Comparative genomics of insect juvenile hormone biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 366–374.
- Nunes, F.M.F. et al. (2004) The use of Open Reading frame ESTs (ORESTES) for analysis of the honey bee transcriptome. *BMC Genomics*, 5: 84; *available online*: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/5/84> .
- Oakeshott, J.G.; Claudianos, C.; Campbell, P.M.; Newcomb, R.D.; Russell, R.J. (2005) Biochemical genetics and genomics of insect esterases. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (eds) *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol 5. Elsevier, San Diego, pp 309-381.
- Oldham, S.; Stocker, H.; Laffargue, M.; Wittwer, F.; Wymann, M.; Hafen, E. (2002) The Drosophila insulin/IGF receptor controls growth and size by modulating *PrdInsP3* levels. *Development*, 129: 4103–4109.
- Onhuma, S-I.; Nakazawa, T.; Hemmi, H.; Halberg, A.M.; Koyama, T.; Ogura, K.; Nishimo, T. (1996) Conversion from farnesyl diphosphate synthase to geranylgeranyl diphosphate synthase by random chemical mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 271: 10087-95.
- Patel, A.; Fondrk, M.K.; Kaftanoglu, O.; Emore, C.; Hunt, G.; Frederick, K.; Amdam, G. V. (2007) The Making of a Queen: TOR Pathway Is a Key Player in Diphenic Caste Development. *PLoS One* 2, 6: e509.

- Paulino-Simões, Z.L.; Boleli, I.C.; Hartfelder, K. (1997) Occurrence of a prothoracicotropic hormone-like peptide in the developing nervous system of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 28: 399-409.
- Perera, S.C.; Zheng, S.; Feng, Q-L.; Krell, P.J.; Retnakaran, A.; Palli, S.R. (2005) Heterodimerization of Ecdysone Receptor and Ultraspiracle on Symmetric and Asymmetric Response Elements. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 60: 55-70.
- Pfall, M.W.; Tichopad, A.; Prgomet, C.; Neuvians, T.P. (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Bestkeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26: 509-515.
- Pinto, L.Z.; Hartfelder, K.; Gentile-Bitondi, M.M.; Paulino-Simões, Z.L. (2002) Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J. Insect Physiol.*, 48: 783-790.
- Piulachs, M.D.; Guidugli, K.R.; Barchuk, A.R.; Cruz, J.; Simões, Z.L.; Belles, X. (2003) The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(4): 459-65.
- Rachinsky, A.; Hartfelder, K. (1990) Corpora allata activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titre in honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). *J. Insect Physiol.*, 66, 189-194.
- Rachinsky, A.; Strambi, C.; Strambi, A.; Harfelder, K. (1990) Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honey bee larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 79: 31-38.
- Rachinsky, A. (1994) Octopamine and serotonin influence on corpora allata activity in honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *J. Insect Physiol.*, 40: 549-554.
- Rachinsky, A.; Engels, W. (1995) Caste development in honey bees (*Apis mellifera*): juvenile hormone turns on ecdysteroids. *Naturwissenschaften*, 82: 378-379.
- Rachinsky, A.; Hartfelder, K. (1998) *In vitro* biosynthesis of juvenile hormone in larval honey bees: comparison of six media. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 34: 646-648.
- Rachinsky, A.; Feldlaufer, M.F. (2000) Responsiveness of honey bee (*Apis mellifera* L.) corpora allata to alltoregulatory peptides from four insect species. *J. Insect Physiol.*, 46: 41-46.
- Rachinsky, A.; Tobe, S.S.; Feldlaufer, M.F. (2000) Terminal steps in JH biosynthesis in the honey bee (*Apis mellifera* L.): developmental changes in sensitivity of JH precursor and allatotropin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 729-737.
- Ratnieks, F.L.W. (1993) Egg-laying, egg-removal, and ovary development by workers in queenright honey bee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 32: 191-198.

- Rawson, R.B. (2003) The SREBP pathway-insights from insects and insects. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4: 631-40.
- Reginato, R.D.; Cruz-Landim, C. (2002) Morphological characterization of cell death during the ovary differentiation in worker honey bee. *Cell Biol. Internat.*, 26(3): 1193-1202.
- Rembold, H.; 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.; Karmer, J.P.; Ulrich, G.M. (1980) Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 11: 29-38.
- Rembold, H. (1987) Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* 17: 1003-1006.
- Rembold, H.; Czoppelt, C.; Grüne, M.; Lackner, B.; Pfeffer, J.; Woker, E. (1992) Juvenile hormone titers during honey bee embryogenesis and metamorphosis. In: *Insect Juvenile Hormone Research, Fundamental and Applied Approaches* (Eds. Mauchamp B., Couillaud F. and Baehr J.C.), Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. pp. 37-43.
- Riddiford, L. M. (1980a) Insect endocrinology: action of hormones at the cellular level. *Annu. Rev. Physiol.*, 42: 511-28.
- Riddiford, L.M. (1980b) Interactions of ecdysteroids and juvenile hormone in the regulation of larval growth and metamorphosis of the tobacco hornworm. In: Hoffman, J.A. (Ed), *Recent Advances in Comparative Arthropod Morphology, Physiology, and Development*, vol. 1. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ, 127-179.
- Riddiford, L.M. (1996) Juvenile hormone: the status of it status quo action. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 32: 271-286.
- Robinson, G.E. (1987) Regulation of the honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 120: 329-338.
- Robinson, G.E.; Strambi, A.; Strambi, C.; Paulino-Simões, Z.L.; Tozetto, S.O.; Barbosa, J.M.N. (1987) Juvenile hormone titers in European and Africanized honey bees in Brazil. *General Comparat. Endocrinol.*, 66: 457-459.
- Robinson, G.E.; Strambi, C.; Strambi, A.; Feldlaufer, M.F. (1991) Comparison of juvenile hormone and ecdysteroid titers in adult worker and queen honey bees (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.*, 37: 929-935.
- Robinson, G.E.; Strambi, C.; Strambi, A.; Huang, Z.Y. (1992) Reproduction in worker honey bees is associated with low juvenile hormone titers and rates of biosynthesis. *General Comparat. Endocrinol.*, 87: 471-480.

- Roe, R.M.; Venkatesh, K. (1990) Metabolism of juvenile hormones: degradation and titer regulation. In: Rutgers, G. A. (Ed.), *Morphogenetic Hormones of Arthropods*, vol. 1. University Press, New Brunswick, pp. 126-179.
- Roe, R.M.; Kallapur, V.; Linderman, R.J.; Viviani, F.; Harris, S.V.; Walker, E.A.; Thompson, D.M. (1996) Mechanism of action and cloning of epoxide hidrolase from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 32: 527-535.
- Santos, A.M. (2004) Estrutura do gene da Esterase do Hormônio Juvenil de *Apis mellifera* e seu papel durante o desenvolvimento pós-embriônico e a diferenciação de castas. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP para obtenção do título de Mestre, área: Genética.
- Schmidt-Capella, I.C.; Hartfelder, K. (1998) Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J. Insect Physiol.*, 44: 385-391.
- Schmidt-Capella, I.C.; Hartfelder, K. (2002) Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of larval honey bee ovary. *Cell Tissue Res.*, 307: 265-272.
- Schooley, D.A.; Judy, K.J.; Bergot, B.J.; Hall, M.S.; Siddall, J.B. (1973) Biosynthesis of the juvenile hormones of *Manduca sexta*: labelling pattern from mevalonate, propionate, and acetate. *PNAS*, 70: 2921-2925.
- Schooley, D.A. & Baker, F.C. (1985) Juvenile hormone biosynthesis. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, ed. LI Gilbert, 7:363-89. Oxford: Pergamon
- Schwartz, L.M.; Smith, S.W.; Jones, M.E.E.; Osborne, B.A. (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 980-984.
- Sen, S.E.; Sperry, A.E. (2002) Partial purification of a FPPsynthase from whole-body *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 889-899.
- Shinoda, T.; Itoyama, K. (2003) Juvenile hormone acid methyltransferase: a key regulatory enzyme for insect metamorphosis. *PNAS*, 100: 11986-91.
- Silva, J.E.B. (2005) Desenvolvimento diferencial da espermateca de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Tese apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP para obtenção do título de Doutor, área: Entomologia.
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150: 76-85.
- Snodgrass, R.E. (1984). *Anatomy of the honey bee*. Cornell University Press Ltd., London. pp. 280-289.

- Soccio, R.E.; Adams, R.M.; Romanowski, M.J.; Sehayek, E.; Burley, S.K.; Breslow, J.L.; (2002) The cholesterol-regulated tarD4 gene encodes a StAR-related lipid transfer protein with two closely related homologues, StarD5 and StarD6. *PNAS*, 99: 6943–6948.
- Sok, A.J.; Andruszewska, G.; Niewiadomska-Cimicka, A.; Grad, I.; Rymarczyk, G.; Pajdzik, D.; Orłowski, M.; Schmidt, M.; Grajek, W.; Ożyhar, A.; Kochman, M. (2008) Regulatory elements in the juvenile hormone binding protein gene from *Galleria mellonella* — Topography of binding sites for Usp and EcRDBD. *Biochim. Biophys. Acta*, doi:10.1016/j.bbagr.2008.04.009.
- Spradling, A.C.; Rubin, G.M. (1992) Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science*, 218: 341–7.
- Szkopinska, A.; Plochocka, D. (2005) Farnesyl diphosphate synthase of product specificity. *Acta Biochimica Polonica*, 52: 45-55.
- Tobe, S.S.; Stay, B. (1985) Structure and regulation of the corpus allatum. *Adv. Insect Physiol.*, 18: 305-432.
- Touhara, K.; Prestwich, G.D. (1993) Juvenile hormone epoxide hydrolase. Photoaffinity labeling, purification, and characterization from tobacco hornworm eggs. *J. Biol. Chem.*, 268: 19604-19609.
- Touhara, K.; Prestwich, G.D. (1994) Role of juvenile hormone binding protein in modulating function of JH epoxide hydrolase in eggs of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 24: 641-646.
- Tozetto, S.O.; Rachinsky, A.; Engels, W. (1997) Juvenile hormone promotes flight activity in drones *Apis mellifera carnica*). *Apidologie*, 28: 77-84.
- Trautmann, K.H.; Masner, P.; Schuler, A.; Suchi, M.; Wipf, H.K. (1974) Evidence of the JH methyl (20E, 6E-10,11-epoxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadienoate (JH-III)) in insects of 4 order. *Z. Naturforsch.* 29c: 161-168.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3, research0034.
- Vermunt, A.M.W.; Koopmanschap, J.M.; Vlak, J.M.; de Kort, C.A.D. (1999). Expression of the juvenile hormone esterase gene in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: photoperiodic and juvenile hormone analog response. *J. Insect Physiol.* 45: 135-142.
- Vieira, C.U.; Bonetti, A.M.; Simões, Z.L.P.; Maranhão, A.Q.; Costa, C.S.; Costa, M.C.R.; Siquieroli, A.C.S.; Nunes, F.F.F. (2008) Farnesoic Acid O-Methyl Transferase (FAMeT) Isoforms: Conserved Traits and Gene Expression Patterns Related to Caste Differentiation in the Stingless Bee, *Melipona scutellaris*. *Arch. Insect Biochem. Physio.*, 67: 97–106.

- Ward, V.K.; Bonning, B.C.; Huang, T.L.; Shiotsuki, T.; Griffeth, V.N.; Hammock, B.D. (1992) Analysis of the catalytic mechanism of juvenile hormone esterase by site-directed mutagenesis. *Int. J. Biochem.*, 24: 1933-1941.
- 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.
- Weirich, G.; Wren, J.; Sidall, J.B. (1973) Developmental changes of the juvenile hormone esterase activity in haemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem.*, 3: 397-407.
- Wheeler D. E.; Kawooya J. K. (1990) Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 14: 253-267.
- Wheeler, D.E. (1986) Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. *American Naturalist*, 128: 13-34.
- Wheeler, D.E.; Buck, N.; Evan, 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.
- Winston, M.L. (1987) The biology of the Honey Bee. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Wroblewski, V.J. ; Harshman, L.G. ; Hanzlik, T.N. ; Hammock, B.D. (1990) Regulation of juvenile hormone esterase gene expression in the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). *Arch. Biochem. Biophys.*, 278 : 461-466.
- Zapata, R.; Martin, D.; Piulachs, M.D.; Belles, X. (2000) Effects of hypocholesterolaemic agents on the expression and activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in the fat body of the German cockroach. *Arch Insect Biochem Physiol.*, 49(4):177-86.
- Zapata, R.; Piulachs, M.D.; Belle's, X. (2002) Ovarian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in *Blattella germanica* (L.): pattern of expression and critical role in embryogenesis. *J. Insect Physiol.*, 48: 675-681.
- Zhang, Q-R.; Xu, W-H.; Chen, F-S.; Li, S. (2005) Molecular and biochemical characterization of juvenile hormone epoxide hydrolase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biology*, 35: 153-164.

Ilustração: A. Fagundes; *In*: Freire, 2006.

ANEXOS

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1 – Tabela de *primers* utilizados

Propósito	Gene	Nome do Primer	Sequência 5'-3'
Amplificação do primeiro fragmento do gene <i>Amjheh</i>	<i>jheh</i>	JHEHP1-F	TNCANGSNGGNGAYTGGGG
		JHEHP2-R	GTRTCNGGYTTNGTNGCYTG
qRT-PCR/ SqRT-PCR	<i>aat</i>	AAT-F	GGCCTCAAACGACTCTTCAA
		AAT-R	CGTGCCAGTGGTGTAAGTTG
	<i>hmgs</i>	HMGS-F	CCGTATCTTGGGTAGAAAGC
		HMGS-R	GATGATCTCACTCCACGATC
	<i>hmgr</i>	HMGR-F	CCTGCACAGAATGTTGGAAG
		HMGR-R	GTGCAGGAAGAATAGTTCCG
	<i>mk</i>	MK-F	TTCCGCTTCTTTTGCAGTTT
		MK-R	TTCCAGATGGATTACCATGC
	<i>pmk</i>	PMK-F	CTCATTGGGCCAAATCTCAT
		PMK-R	TATCTAGAGCCGCACGACAA
	<i>ippi</i>	IPPI-F	GCTGAAGCTACTTTGCAGCTA
		IPPI-R	GCTCGATGAAGTAAACTTGTCC
	<i>fpps1</i>	FPPS1-F	GAAGATCAGTACCAATTGTAATC
		FPPS1-R	CATGCGACGAAATCAACCAAC
	<i>fpps2</i>	FPPS2-F	GAGATCAGTATCGCTTATAGTC
		FPPS2-R	CATGCGACGAAATCAACCAAC
	<i>fpps3</i>	FPPS3-F	GGGAAGACGAAGATCAATATCAC
		FPPS3-R	CATGCGACGAAATCAACCAAC
	<i>fpps4</i>	FPPS4-F	GCGCATGGTGAATGTTTAGA
		FPPS4-R	CGAAACGCATAGCAAGACTG
	<i>fpps5</i>	FPPS5-F	CGAAAGGAGGAAAACGAAGA
		FPPS5-R	CTGCCATTGTGTGAAGTCT
	<i>fpps6</i>	FPPS6-F	CATCGATAGATTTCGGGAAAGA
		FPPS6-R	ATCGATTATGCCAGCGAAAC
	<i>fpps7</i>	FPPS7-F	AATTGCTGGCGTCTCAAGAT
		FPPS7-R	GATCAAAATTTCGCTTCTTCCTC
	<i>scd</i>	SCD-F	AGAGCTATCGCTGCTCTTGC
		SCD-R	AGAGCTATCGCTGCTCTTGC
	<i>famet</i>	FAMeT-F	GTAAAGAAGGTGAGCCAAGTG
		FAMeT-R	CGATTAACCATTACACAGAAG
qRT-PCR/ SqRT-PCR	<i>mt</i>	MT-F	CCTTCACTGGTGCCAAAAC
		MT-R	TGGCCTATATCGAGGATTCTG
	<i>mfe</i>	MFE-F	GGAATCATTTCTTGCGGAGA
		MFE-R	GTTATGCGCGCTATGGAAAT
	<i>cs</i>	CS-F	AATGAATGGTTTGGCTGGAC
		CS-R	GAACGACTTGACCGCTCTTC
	<i>mctp1</i>	MCTP1-F	TTGATTGTTTTGTGCGCATT
		MCTP1-R	TGTCAACACCACCAAGGAAA

qRT-PCR/ SqRT-PCR	<i>mctp2</i>	MCTP2-F	GAAATTTGGCTTCTGGTGGA
		MCTP2-R	CAATCACCCAGACCTTTGAA
	<i>atpcl</i>	ATPCL-F	CTGGCGCTTATGTTCTGAT
		ATPCL-R	ACCAAGTTCCTAGCCCAAT
	<i>mat</i>	MAT-F	TGCAAAAGTGGCTTGTGAGA
		MAT-R	GCCAATCGAATCCTTTTGAA
	<i>ahc1</i>	AHC1-F	TGGATGAAGCATCACGAAAA
		AHC1-R	TGCAACATCAATTTTCGCAGT
	<i>ahc2</i>	AHC2-F	GCCGAAGATAAGCCATTGAA
		AHC2-R	CAGCAGCCACTTCATTTTGA
Amplificação das seqüências parciais dos genes JHE e JHEH para expressão <i>in vitro</i> em células de bactérias (seqüência do sítio <i>attB</i> em negrito)	<i>jhe</i>	GAT-JHE-F	CAAAAAAGCAGGCTTCATGGGTG CCGAAGATTGTCTGTA
		GAT-JHE-R	CAAGAAAGCTGGGTGTTAACTGG TAACTCCTGTAACCC
	<i>jheh</i>	GAT-EH-F	CAAAAAAGCAGGCTTCATGATAG AAATCCGACCTTTCAAAATT
		GAT-EH-R	CAAGAAAGCTGGGTGTTAAATTA AGAAGGACAAAATTTCACTC
		ATTB-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTTC
		ATTB-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTG
	Experimentos de RNAi (seqüência do sítio T7 em negrito)	RNAiJHE-F	TAATACGACTCACTATAGGGCGA CGTTACCTCCAGTTGGGAAA
		RNAiJHE-R	TAATACGACTCACTATAGGGCGA TGGATTACCACCGAACCATT
		GFP-F	TAATACGACTCACTATAGGGCGA AGTGGAGAGGGTGAAGGTGA
		GFP-R	TAATACGACTCACTATAGGGCGA GGTAAAAGGACAGGGCCATC
SqRT-PCR	<i>jhe</i>	JHEP1-F	GTTATCGCTTCTGATATGGCT
		JHEP2-R	GATGGGAAATAGGTACCGAC
qRT-PCR	<i>jhe</i>	JHEP3-F	GCTTTTCAATTAGGTAGTGG
		JHEP4-R	GAATGGATTATAATAGAATCG
SqRT-PCR qRT-PCR	<i>jheh</i>	JHEHP3-F	GCTTTTCAATTAGGTAGTGG
		JHEHP4-R	GATGGGAAATAGGTACCGAC
SqRT-PCR	<i>vg</i>	Vg-F	GCAGAATACATGGACGGTGT
		Vg-R	GAACAGTCTTCGGAAGCTTG

Amplificação de carboxiesterases de <i>A. mellifera</i> (controle dos experimentos de RNAi)	<i>co</i>	GB11403-F	ATGGCACAATATCGAAGAGTCC
		GB11403-R	TAATTCCTCTTTTCCTCGATAT
	<i>co</i>	GB10820-F	GCACAGACGAAGCATGCTC
		GB10820-R	GAAATCGCCAACAGCTTGTG
	<i>co</i>	GB13062-F	ATGGCGAGTGAATAACAATC
		GB13062-R	CAATTTATTTTAATTCTGTTCC
Controle endógeno nas reações de quantificação de número de transcritos dos genes	<i>act</i>	ACT-F	TGCCAACACTGTCCTTTCTG
		ACT-R	AGAATTGACCCACCAATCCA
	<i>rp49</i>	RP49-F	CGTCATATGTTGCCAACTGGT
		RP49-R	TTGAGCACGTTCAACAATGG
	<i>ef1α</i>	EF1 α -F	GGAGATGCTGCCATCGTTAT
		EF1 α -R	CAGCAGCGTCCTTGAAAGTT
	<i>tbp-af</i>	TBPaf-F	TTGGTTTCATTAGCTGCACAA
		TBPaf-R	ACTGCGGGAGTCAAATCTTC

8.2 Anexo 2 – Artigo publicado

Available online at www.sciencedirect.com

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 150 (2008) 33–44

www.elsevier.com/locate/cbpb

Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. — Expression analysis and functional assays

Aline Mackert^{a,*}, Adriana Mendes do Nascimento^b, Márcia Maria Gentile Bitondi^b,
Klaus Hartfelder^c, Zilá Luz Paulino Simões^b

^a Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

^b Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

^c Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

Received 30 October 2007; received in revised form 17 January 2008; accepted 21 January 2008

Available online 26 January 2008

Abstract

Tight control over circulating juvenile hormone (JH) levels is of prime importance in an insect's life cycle. Consequently, enzymes involved in JH metabolism, especially juvenile hormone esterases (JHEs), play major roles during metamorphosis and reproduction. In the highly eusocial Hymenoptera, JH has been co-opted into additional functions, primarily in the development of the queen and worker castes and in age-related behavioral development of workers. Within a set of 21 carboxylesterases predicted in the honey bee genome we identified one gene (*Amjhe-like*) that contained the main functional motifs of insect JHEs. Its transcript levels during larval development showed a maximum at the switch from feeding to spinning behavior, coinciding with a JH titer minimum. In adult workers, the highest levels were observed in nurse bees, where a low JH titer is required to prevent the switch to foraging. Functional assays showed that *Amjhe-like* expression is induced by JH-III and suppressed by 20-hydroxyecdysone. RNAi-mediated silencing of *Amjhe-like* gene function resulted in a six-fold increase in the JH titer in adult worker bees. The temporal profile of *Amjhe-like* expression in larval and adult workers, the pattern of hormonal regulation and the knockdown phenotype are consistent with the function of this gene as an authentic JHE.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Juvenile hormone esterase; Honey bee; Age polyethism; Metamorphosis; RNAi

1. Introduction

In the life cycle of the highly eusocial honey bee, *Apis mellifera* L., juvenile hormone (JH) has come to occupy a prominent regulatory role in the development of the strongly divergent phenotypes, queens and workers, representing the castes in the

female sex, and also in the behavioral development of the adult workers (Hartfelder and Engels, 1998). This caste polyphenism is not genetically determined, but is established by differential feeding of the bipotent young larvae. Differential feeding triggers not only a divergence in larval growth dynamics (Wang, 1965) but also results in a caste-specific activation pattern of the endocrine system, especially the juvenile hormone (JH) producing corpora allata (Rachinsky et al., 1990). The respective caste-specific endocrine signature subsequently directs the developmental trajectories of internal organs, primarily of the ovaries, and the differentiation of external morphological characters during metamorphosis, thus setting the stage for the different roles played by the adult queen and the workers in the context of the social environment.

In the adult stage, the sequence of tasks performed by a worker bee has a strong age-related component, where high risk tasks,

Abbreviations: 20E, 20-hydroxyecdysone; dsRNA, double strand RNA; EST, expressed sequence tag; GFP, green fluorescent protein; JH, juvenile hormone; JH-III, juvenile hormone III; JHE, juvenile hormone esterase; qPCR, quantitative (real-time) PCR; Sq RT-PCR, Semiquantitative RT-PCR; RNAi, RNA interference.

* Corresponding author. Departamento de Genética, FMRP-USP, Avenida Bandeirantes 3900, CEP 14041-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel.: +55 16 3602 4332; fax: +55 16 3633 3633 0069.

E-mail address: mackert@fmrp.usp.br (A. Mackert).

1096-4959/\$ - see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cbpb.2008.01.004

like guarding and especially foraging for nectar, pollen and water are primarily executed by older bees. This age polyethism, however, is not fixed, since sociality also requires that individuals can flexibly adjust to shifting colony needs. Such flexibility has elegantly been demonstrated in honey bee colonies with strongly skewed age demographics. Under such conditions, workers can either become precocious foragers when there are too few foragers, or delay the onset of foraging when more nurse bees are needed (Huang et al., 1994; Huang and Robinson 1996; Jassim et al., 2000). Amongst the factors that regulate an individual's transition from intranidal tasks to foraging, JH has long been shown to be an important component. Whereas in many solitary insects and in primitively eusocial bees such as the bumble bees, a high JH titer in adult females is generally associated with reproductive activity (Bloch et al., 2000), this ancient JH function has been split or shifted in the highly eusocial honey bee from that of a reproductive hormone to a modulator of worker behavior. In this caste, an artificially elevated JH titer actually represses vitellogenin synthesis in young bees (Pinto et al., 2000) and an elevated JH titer due to enhanced JH biosynthesis by the corpora allata becomes associated with the nurse bee to forager transition (Huang et al., 1991; Robinson et al., 1991; Robinson et al., 1992).

The inversion in the relationship between JH and vitellogenin from a positive regulator of reproduction, as typically observed in solitary insects and the primitively eusocial hymenopterans, to a negative regulator in adult honey bee workers, has been modeled onto the honey bee life cycle as a double repressor system (Amdam and Omholt 2003). Subsequent experiments have confirmed this predicted mutually inhibitory action between vitellogenin and JH (Guidugli et al., 2005; Amdam et al., 2007). The question, thus, becomes, what are the targets of vitellogenin signaling in JH biosynthesis or metabolism. Juvenile hormone esterases (JHEs) are such potential targets due to the role they play in the regulation of the JH titer, by clearing it from hemolymph during development and reproduction in insects (Hammock 1985; Gilbert et al., 2000).

JH-specific esterases are members of the carboxylesterase family that are synthesized primarily by the fat body and released into the hemolymph where they exist in low amounts, but where they degrade JH with high affinity, even in the presence of JH-specific binding proteins (Hammock 1985; Ward et al., 1992; Campbell et al., 1998). JHE gene structure and biochemical characterization of the enzymes have been elucidated for representative species in the Lepidoptera and Diptera (Hanzlik et al., 1989; Jones et al., 1994; Feng et al., 1999; Shiotsuki et al., 2000; Thomas et al., 2000; Campbell et al., 2001; Hinton and Hammock, 2001). Lepidopteran JHEs are composed of a single polypeptide of approximately 63–67 kDa and show a high affinity for the hormone (20–200 nM K_m), combined with moderate turnover (Kamita et al., 2003; Goodman and Granger, 2005; Oakeshott et al., 2005). Sequence homology modeling studies on insect JHEs have identified a series of motifs that functionally characterize these carboxylesterases, especially the G-X-S-X-G nucleophilic elbow around the catalytic serine residue and an amphipathic α -helix (Thomas et al., 1999; Oakeshott et al., 2005).

The first honey bee JHE-like sequence fragments were identified in EST libraries (Nunes et al., 2004). Since then, the *A. mellifera* genome sequence information (The Honey Bee

Genome Sequencing Consortium, 2006) has made it possible to annotate a large suite of putative carboxylesterases (Claudianos et al., 2006). We used this available genome information to identify a putative JHE encoding gene in the honey bee, *A. mellifera* because of the important role of JHEs in the control of circulating hormone levels in insect development and reproduction in general, and in particular due to the hormone's co-option into novel roles in the life cycle of social insects. Since similarity analyses and motif comparisons alone cannot ascertain whether any of these predicted genes is an authentic JH-specific esterase, we selected the most promising candidate gene for expression analysis in honey bees and performed *in vivo* assays to corroborate its functionality.

2. Materials and methods

2.1. Identification of a candidate juvenile hormone esterase gene

The honey bee (*A. mellifera*) genome database (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>) was searched for JHE orthologs using the *Drosophila melanogaster* (GenBank accession number: AAK07833) and *Heliothis virescens* (GenBank accession number: AAL41023) genes as queries in TBLASTN analyses. The esterase status of the predicted honey bee genes was confirmed by a mutual-best-hit analysis against GenBank sequences and by the presence of catalytic esterase-lipase motifs. Esterase functions were classified according to Claudianos et al. (2006) and molecular mass and pI were calculated using PROTCALC (<http://www.justbio.com/protcalc/index.php>).

The manual features annotation procedure of the Artemis 7.0 platform (Rutherford et al., 2000) was used to map genome coordinates to ESTs, ORFs and putative exon/intron splice sites for the best matching esterase (GB15327, Honey Bee Official Gene Set number in Amel4.0). This gene, subsequently referred to as *Amjhe-like*, was subsequently used in functional analyses employing *in vivo* strategy.

2.2. Bees — sampling of developmental stages

Worker larvae and pupae were collected from brood frames of Africanized honey bees and staged according to the criteria established by Michelette and Soares (1993). Adult workers of defined age were obtained by paint marking newly emerged bees, returning them to experimental hives, and collecting them at the desired age. In the larval samples we removed the gut and in adult workers we also removed the heads before immersion into TRIzol reagent (Invitrogen). The extracted RNA was incubated in the presence of RNase-free DNase I (Promega) for 30 min at 37 °C to eliminate contaminating DNA. First-strand cDNA was synthesized from a standard amount of total RNA (1 µg) using Superscript II (Invitrogen) and an oligo(dT)_{12–18} primer.

2.3. Hormone treatment

For the analysis of JH effects on *Amjhe-like* expression, cocoon-spinning 5th instar larvae were removed from their brood

cells to receive a topical application of 10 µg JH-III (Fluka, diluted in 1 µL acetone). Controls were topically treated with 1 µL acetone, or were left untreated. Treated and untreated larvae were maintained in an incubator at 34 °C and 80% relative humidity for 24 h before extraction of RNA in a TRIzol protocol.

The role of ecdysteroids in the regulation of *Amjhe-like* expression was investigated by injecting brown-eyed worker pupae with 1 µg 20-hydroxyecdysone (20E) (Sigma), diluted in ethanol/saline (1:3, v/v). One control group consisted of pupae injected with 1 µL of ethanol/saline, and the second of untreated pupae. The pupae were kept in an incubator (34 °C, 80% rh.) for 24, 48, or 72 h. Total RNA was extracted from pools of four or five abdomens.

2.4. Quantitative real-time PCR

Gene-specific quantitative real-time PCR (qPCR) analyses were performed on a 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems). Primers JHEP1-F and JHEP2-R (Table 1) were used for qPCR detection of the candidate honey bee JHE, and RP49F and RP49R for amplification of the endogenous control gene *rp49* (honey bee ribosomal protein 49, GenBank accession number NM_001011587). Reactions were performed in a final volume of 25 µL, containing 10 pmol of each primer; 1× SYBR Green (Applied Biosystems) and 1 µL of first strand cDNA. Specificity of the PCR products was assessed by melting curve analysis for all samples and, additionally, the products were also verified for correct size by agarose gel electrophoresis. Serial 1:10 dilutions of cDNA samples were performed to correct for differences in amplification efficiencies. Each sample was assayed in triplicate and mean Ct values were transformed into relative *Amjhe-like* transcript quantities using the comparative Ct method (Applied Biosystems, user bulletin #2).

2.5. Semiquantitative RT-PCR analysis

Initially, aliquots of first strand cDNA products from worker larvae and pupae were used in PCR protocols employing the primers JHEP3F and JHEP4R (see Table 1 for primer sequences). Primers ACT-F and ACT-R were used for amplification of an

endogenous control gene, *A. mellifera actin* (GenBank accession number AB023025). PCR conditions for the amplification of *Amjhe-like* transcripts were: 2 min at 94 °C followed by 35 cycles (30 s at 94 °C, 45 s at 54 °C, 1 min at 72 °C) and a final extension step at 72 °C for 7 min. PCR conditions for *actin* cDNA amplification were: 2 min at 94 °C followed by 25 cycles (30 s at 94 °C, 30 s at 60 °C, 30 s at 72 °C) and a final extension step at 72 °C for 7 min. The amplified products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gels that were stained with ethidium bromide.

For gain in sensitivity, in the case of the 20E-treated pupae, we employed a Southern blot protocol where the electrophoretically separated amplification products were transferred to a nylon membrane (Biodyne B Membrane, Invitrogen) by capillary blotting (10× SSC for 16 h). The membranes were subsequently hybridized with a probe consisting of a fluorescein-labeled 502 bp *Amjhe-like* cDNA fragment (Gene Images™ Random Prime Labeling Module, GE-Healthcare). After processing according to the protocol for Gene Images CDP-Star Detection Module (GE-Healthcare) the blots were exposed to X-ray film (Hyperfilm ECL, GE-Healthcare).

2.6. Silencing of juvenile hormone esterase expression

As an *in vivo* strategy to investigate functionality of the putative *A. mellifera* JHE-like gene we used an RNA interference approach (RNAi) to silence gene activity, followed by RIA analysis of the JH titer in adult worker bees. Double-stranded *Amjhe-like* RNA was prepared as previously described by Amdam et al. (2003). The gene-specific primers JHEP5-F and JHEP6-R were fused with the T7 promoter sequence (Table 1, T7 sequence is underlined). PCR reactions were performed according to the following protocol: 2 min at 94 °C, 40 cycles (30 s at 94 °C, 30 s at 60 °C and 45 s at 72 °C) and a final extension of 7 min at 72 °C. PCR products were purified using the QIAquick™ PCR purification kit (Qiagen) and used for dsRNA synthesis in the Promega RiboMax™ T7 system (Promega). Run-off synthesized dsRNA was extracted in TRIzol LS reagent (Invitrogen), redissolved in nuclease-free water, heated to 95 °C for 1 min and left to cool at room temperature. The product was diluted with nuclease-free water to a final concentration of 10 µg/µL. As a treatment control (sham group) we injected dsRNA

Table 1
Primers used in quantitative (q) PCR analysis, semiquantitative (Sq) RT-PCR and RNAi-mediated silencing of the *Amjhe-like* gene (GB15327-RA)

Gene primer	Purpose	Sequence 5'-3'
JHEP1-F	qPCR — forward	GTTATCGCTTCTGATATGGCT
JHEP2-R	qPCR — reverse	GATGGGAAATAGGTACCGAC
RP49F	qPCR — forward	CGTCATATGTTGCCAACTGGT
RP49R	qPCR — reverse	TTGAGCACGTTCAACAATGG
JHEP3-F	Sq RT-PCR — forward	GCTTTTCAATTAGGTAGTGG
JHEP4-R	Sq RT-PCR — reverse	GAATGGATTATAATAGAATCG
ACT-F	Sq RT-PCR — forward	TGCCAACACTGCTCTTCTG
ACT-R	Sq RT-PCR — reverse	AGAAITGACCCCAATCCA
JHEP5-F	RNAi — forward	TAATACGACTCACTATAGGCGACGTTACTCCAGTTGGAAA
JHEP6-R	RNAi — reverse	TAATACGACTCACTATAGGCGATGGATTACCAACCGAACCAAT
GFP-F	RNAi — forward	TAATACGACTCACTATAGGCGAAGTGGAGAGGGTGAAGGTGA
GFP-R	RNAi — reverse	TAATACGACTCACTATAGGCGAGGTAAAAGGACAGGGCCATC
Vg-F	qPCR — forward	GCAGAATACATGGACGGTGT
Vg-R	qPCR — reverse	GAACAGTCTTCGGAAGCTTG

The T7-promotor sequence in the RNAi primers is underlined.

Table 2
Motif analysis and biochemical characteristics of 21 carboxylesterases predicted in the honey bee genome

GB number	Catalytic esterase-lipase motifs					SP	Predicted Function (BLASTP)	Esterase classification	Predicted	
	RF	DQ	GxSxG version	E	GxxHxxD/E				M (kDa)	pI
GB15327	+	+	GLSAG	+	+	+	EL/CO	β -esterases/pheromone esterases	64	6.13
GB10820	+	+	GMSAG	+	–	+	EL	β -esterases/pheromone esterases	56.3	9.56
GB13602	+	+	GESAG	+	+	–	EL/CO	xenobiotic metabolism	61.2	6.27
GB18657	+	+	GESAG	+	+	+	EL/CO	NI	61.1	4.56
GB14478	+	+	GESAG	+	+	+	EL/CO	xenobiotic metabolism	64.1	9.29
GB11403	+	+	GESAG	+	+	+	EL/CO	β -esterases/pheromone esterases	65.8	8.41
GB16342	+	+	GESAG	+	+	+	EL/CO	xenobiotic metabolism	61.0	4.62
GB12572	+	+	GESAG	+	–	+	EL	NI	55.7	8.47
GB14873	+	+	GESAG	+	+	+	ACH	Acetylcholinesterase	69	5.34
GB18414	+	+	GESAG	+	+	–	EL/CO	Acetylcholinesterase	58.9	5.12
GB15030	+	–	GVSAG	+	+	–	EL/CO	xenobiotic metabolism	58.8	7.25
GB13591	+	–	GVSAG	+	+	–	EL/CO	xenobiotic metabolism	59.2	5.55
GB19866	+	–	GVSAG	+	+	–	EL/CO	xenobiotic metabolism	59.7	5.56
GB10854	+	–	GVSAG	+	–	–	EL	xenobiotic metabolism	69.9	8.34
GB16889	+	+	GYSAG	+	–	+	EL/CO	integument esterases	65.3	6.12
GB18660	+	–	GHSAG	–	–	+	EL/CO	JHE	57	5.88
GB14049	+	–	GHSAG	–	–	+	EL	NI	57.9	5.88
GB18901	+	+	GHSSG	+	+	+	EL/CO	uncharacterized group	69.9	5.67
GB11064	–	+	GDSSG	+	+	+	EL/CO	xenobiotic metabolism	61.8	4.81
GB15536	+	+	–	+	–	+	EL/CO	uncharacterized group	73.4	9.22
GB18290	+	+	–	+	+	+	EL/CO	neural function	88.9	6.76

corresponding to a green fluorescent protein (GFP) gene. GFP-derived dsRNA does not share close homology with any *A. mellifera* gene and, thus, should not trigger an RNAi response. Primers used to produce GFP dsRNA are shown in Table 1. GFP dsRNA was prepared in the same way as described above.

For dsRNA injection, cold anesthetized 4 day-old workers were immobilized on a piece of styrofoam with two crossed needles and were kept at 8 °C during the procedure. In this position they received an injection of 1 μ L *Amfhe-like* dsRNA solution (10 μ g/ μ L, $N=20$) or of 1 μ L GFP dsRNA solution (10 μ g/ μ L, $N=20$) with a Hamilton micro syringe, needle G 30 (Becton Dickinson), laterally between the 5th and 6th abdominal segment. Another control group consisted of bees that were untreated ($N=20$). Individuals showing signs of hemolymph leakage after withdrawal of the needle were discarded. The bees stayed in this fixed position for 1 h before introduction into the maintenance cage (8 × 11 × 13 cm) where they had free access to a pollen/sugar diet and water. The cages were kept in an incubator at 32 °C with 80% humidity. After five days, the bees were sampled and briefly anesthetized on ice (Lin et al., 2004) for hemolymph collection. The volume of hemolymph obtained from a lateral incision into the abdomen was estimated within a calibrated 5 μ L microcapillary (Brandt) and a 1 μ L aliquot of each sample was drawn into a glass vial containing 0.5 mL acetonitrile. The vials were sealed with Teflon-lined screw caps and stored at –20 °C until JH extraction.

2.7. Juvenile hormone titer analysis

The JH extraction procedure followed a liquid-phase separation protocol established for honey bee hemolymph (Huang et al., 1994). Briefly, 1 mL NaCl (0.9%) and 1 mL hexane were added to the acetonitrile extract. After vigorous vortexing, the phases were

separated by centrifugation (700 g). The hexane phase was collected and the extraction was repeated twice by hexane addition to the aqueous phase. The pooled hexane phases were dried by vacuum centrifugation and the residues were redissolved in 100 μ L toluene and transferred to RIA glass vials. Before starting the RIA, the solvent was removed by vacuum centrifugation.

The JH-specific antiserum was diluted 1:1250 in phosphate buffer supplemented with bovine serum albumin (0.1%) and rabbit immunoglobulin G (0.1%). The assays were performed with [10 - 3 H(N)]-juvenile hormone III (spec. activity 19.4 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences), diluted in phosphate buffer to 6000–6500 cpm/50 μ L. Juvenile hormone III (Fluka) was used as non-radioactive ligand. Standard curves were set up to cover a 50 pg to 10 ng range.

The RIA procedure performed in a 250 μ L volume followed the protocol established by Goodman et al. (1990). Samples were incubated overnight at 4 °C before separation of antibody-bound JH from free JH by addition of saturated ammonium sulfate (50% final conc.) and centrifugation at 7500 g for 15 min. After washing with 50% ammonium sulfate and centrifugation, the pellets were redissolved in 80 μ L water before addition of 5 mL liquid scintillation cocktail (Optiphase Hisafe3, Perkin Elmer). Standard curve values were log/logit transformed so that JH titers of unknown samples could be calculated by linear regression and be expressed as JH-III equivalents (pg/ μ L hemolymph).

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were carried out with Jandel SigmaStat 3.1 software (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA), using one way ANOVA with *post hoc* Dunn's test for comparisons of

Fig. 1. Sequence characteristics of *Apis mellifera* juvenile hormone esterase-like gene (*Anyhe-like*). (a) Multiple alignment (ClustalW 1.83) of JHE sequences from several insect species with GB15327-PA, the putative AmJHE-like protein. The five diagnostic motifs (I, II, III, IV, V) are marked and conserved amino acids for all JHEs are shaded. Amino acid position is indicated at the right side. (b) Schematic representation of the predicted coding sequence (GenBank accession number, AY647436); exons were manually annotated to the corresponding genomic scaffold using Artemis 7.0 tools. The numbers under boxes correspond to the first and last nucleotide positions of each exon. P1 and P2 represent the positions of the qPCR-RT primers JHEP1-F and JHEP2-R, respectively. P3 and P4 represent the positions of primers JHEP3-F and JHEP4-R used in Sq RT-PCR. P5 and P6 represent the positions of primers used to produce *Anyhe-like* dsRNA in RNAi experiments.

Amjhe-like dsRNA treatments (Fig. 4) and *t*-test for comparing JH effects on *Amjhe-like* expression (Fig. 3).

3. Results

3.1. Identification of a honey bee juvenile hormone esterase candidate gene

The first partial sequence information for a putative JHE encoding gene in the honey bee emerged from an EST project (Nunes et al., 2004) initiated just before the start of the honey bee genome sequencing project. The *Amjhe-like* sequences obtained therein formed a 502 nucleotide contig which showed a perfect match with a previously deposited *A. mellifera* carboxylesterase sequence (Kamikouchi et al., 2004) described as a drone-preferential antennal protein (D-AP1) (GenBank accession number: protein, BAC541301 and cDNA, AB083009).

Subsequently, the release of the honey bee genome sequence (The Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) permitted a genome-wide search for carboxylesterases (Claudianos et al., 2006) which included a prediction for a JHE-like enzyme (GB18660). Since this predicted JHE gene showed discrepancies with respect to canonical JHE motifs (Oakeshott et al., 2005), we used a homology search approach directed towards honey bee carboxylesterases presenting similarity with the *D. melanogaster jhe* gene and checked their catalytic esterase–lipase motifs. The results of this search are shown in Table 2.

Within the suite of esterases predicted in the honey bee genome sequence (Claudianos et al., 2006) we analyzed a set of 21 carboxylesterases that showed similarity to esterases from *D. melanogaster* and *T. molitor*. Among these, the predicted honey bee gene GB15327 showed the best match (BLASTP) to *D. melanogaster* and *T. molitor* JHEs, which are model JHEs for non-lepidopteran insects (Kamita et al., 2003). Like all other esterases in this list, it has the G-X-S-X-G motif, which is a critical element of the catalytic site. However, none of these honey bee esterases had this motif in the GQSAG configuration, which is considered a canonical distinctive element of insect JHEs (Table 1). The question therefore is, could GB15327-PA (GenBank accession number: AAU81605) be considered a genuine honey bee JHE, even in the absence of this critical motif? The evidence is as follows: (a) in a molecular phylogeny tree it grouped with JHEs from seven insect species for which full length JHE sequences are characterized (data not shown); (b) it showed the best match with *D. melanogaster* and *T. molitor* JHEs (53% and 52%, respectively); (c) it has a signal peptide (residues 1–16) flanked by a putative cleavage site at the residues 16–17, necessary for its secretion into hemolymph; (d) similar to *D. melanogaster jhe* (GenBank accession number CG8425), which has a neighboring duplicated gene (GenBank accession number CG8424), such a duplication was also found in the honey bee genome encoding a closely related gene (GB10820) with an amino acid sequence that lacks a signal peptide sequence; (e) except for the GQSAG motif it has all the other motifs typical of JHEs, RF, DQ, E, GxxHxxD/E (Sussman et al., 1991; Ollis et al., 1992; Ward et al., 1992; Cyler et al.,

1993) (see Fig. 1a), and (f) ESTs covering this esterase were sequenced in the previous transcriptome project already corroborating that this gene is expressed (Nunes et al., 2004).

Based on the nucleotide sequence of the predicted gene GB15327 we mapped this gene to chromosome LG3 in the scaffold Group3.25 (in the genome version Amel4.0) using the Artemis 7.0 platform. The gene is composed of seven exons (Fig. 1b); nucleotide number 1 corresponds to the start site of the coding sequence. Also shown are the nucleotide positions of predicted exon/intron splice sites flanked by canonical GT/AG pairs (Deutsch and Long 1999). The gene encodes a 567 amino acid polypeptide with an estimated molecular mass of 64 kDa and a pI value of 6.13, as calculated by PROTCALC. The predicted gene GB15327 has hence been termed *Amjhe-like* to denote its similarity to insect *jhe* genes and at the same time calling attention to this difference in the canonical GQSAG motif.

3.2. *Amjhe-like* gene expression in the life cycle of worker honey bees

The gene-specific primers for *Amjhe-like* used for qRT-PCR expression studies (P1 and P2) are situated within the first exon amplifying a fragment of 121 bp. The semi-quantitative and quantitative PCR protocols used to analyze *Amjhe-like* transcript levels during post-embryonic development of honey bee worker – from the 2nd larval instar up to the end of the pupal stage – revealed high expression in the 5th larval instar, especially in feeding and in early cocoon-spinning larvae (Fig. 2a). The highest amount of *Amjhe-like* transcripts was detected at the end of the larval feeding phase (F3). Subsequently, expression declined and only low transcript levels were observed in prepupae and during the entire pupal stage.

When the *Amjhe-like* gene expression profile of worker larvae was compared to published morphogenetic hormone titers, an inverse relationship between *Amjhe-like* transcript levels and the JH titer was clearly apparent. Especially the decline in the JH titer after the transition to the 5th larval instar was accompanied by a gradually increasing *Amjhe-like* expression which reached a peak at the end of the larval feeding period (F3). Shortly thereafter, *Amjhe-like* transcript levels decreased again, apparently permitting that the JH titer increases to attain its prepupal peak levels. This marked negative correlation between *Amjhe-like* gene expression and the hemolymph JH titer is consistent with a JH degrading function of the *Amjhe-like* gene product which, thus, would be important for JH clearance during larval–pupal metamorphosis.

In addition to this apparent JH-dependent regulation of *Amjhe-like* expression, a comparison with the ecdysteroid titer during larval–pupal development suggested that *Amjhe-like* transcription may be down-regulated by ecdysteroids. This may be the case especially in prepupal and pupal stages when a high ecdysteroid titer coincided with the absence or low levels of *Amjhe-like* gene expression.

The quantitative PCR results for the adult life cycle of honey bee workers are shown in Fig. 2b, where relative expression values are calibrated against the highest expression level

Fig. 2. *Amjhe-like* transcript levels in the life cycle of honey bee workers compared to published JH and ecdysteroid hemolymph titers. (a) Semicquantitative RT-PCR analysis using an *A. mellifera actin* gene as endogenous control. Insert: quantitative real-time PCR analysis for transcript level quantification using an *A. mellifera* ribosomal gene, *rp49*, for normalization. Each column represents a mean value of two independent samples, each prepared from three worker larvae. L2, L3 and L4 represent the 2nd, 3rd, and 4th larval instars, respectively. The 5th larval instar is subdivided into progressive feeding (F1, F2, F3), cocoon-spinning (S1, S2, S3) and prepupal (PP1, PP2, PP3) phases. Pw, Pp, Pb, Pbl, Pbm and Pbd are the consecutive phases of the pupal stage marked by progressive eye and cuticle pigmentation. The representation of larval JH and ecdysteroid titers is based on data from Rembold (1987) and Elekonich et al. (2003) (for the 2nd, 3rd, and 4th larval instars), and Rachinsky et al. (1990) (for the 5th larval instar). The graph showing pupal ecdysteroid and JH titers represents data from Pinto et al. (2002) and Elekonich et al. (2003), respectively. (b) Relative *Amjhe-like* expression levels in adult workers determined by quantitative Real-time RT-PCR analysis of RNA samples from 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 day-old workers. Each column represents a mean value of two independent samples, each prepared from three adult workers. An *A. mellifera* ribosomal gene, *rp49*, was used for normalization. The JH and ecdysteroid titers depicted below are based on data from Huang et al. (1991), Robinson et al. (1991), Jassim et al. (2000) and Hartfelder et al. (2002).

observed in 5 day-old bees. The *Amjhe-like* mRNA levels increased shortly after the worker bees emerge from the brood cells and reached the maximum levels between days 5 and 10, a period when bees primarily perform brood rearing functions. Subsequently, the mRNA levels declined coinciding with a shift from intranidal to foraging activities which typically starts around day 15 in European honey bees (Winston 1987). The low levels of this mRNA continued during the rest of the life period, when a bee performs mainly foraging activities. A further decline in *Amjhe-like* mRNA levels was observed at the

end of the adult life cycle of a worker. This temporal expression profile of the best JHE candidate is consistent with changes observed in the JH titer of adult workers where a low titer is maintained in young bees by a low JH biosynthesis rate in the corpora allata (Huang et al., 1991; Robinson et al., 1992), in concert with increased expression of this JHE candidate gene. Once the bees undergo the nurse-to-forager transition the JH levels increase (Huang and Robinson 1996; Amdam and Ornholt 2003) and these high levels are maintained throughout the rest of the adult life cycle. Judging from the hemolymph titer

levels, ecdysteroids should not be playing a regulatory role in adult workers.

3.3. Effects of experimental hormone manipulations on *Amjhe-like* gene expression

The regulatory action of JH and ecdysteroids on *Amjhe-like* gene expression suggested by the correlative analysis of transcript levels with the corresponding hormone titers in larval and pupal hemolymph were validated by hormone application experiments. To investigate whether a high JH level induces *Amjhe-like* expression we topically treated early spinning-stage larvae (S1) with 10 μ g JH-III. As shown in Fig. 2a, *Amjhe-like* transcript levels are still high but decay during the next 24 h as they become S2 larvae. We hypothesized that in case of a JH-positive effect, the *Amjhe-like* levels in S2 would be higher in JH-treated than in untreated larvae. This hypothesis was corroborated by qPCR analysis of JH-treated and control larvae (Fig. 3a). *Amjhe-like* transcript levels differed significantly between JH-III treated and control larvae (*t*-test, $P < 0.001$) indicating that an elevated JH titer in defined larval stages triggers the enhanced transcription of the *Amjhe-like* gene, which in turn, could promote the degradation of protein-bound JH in the hemolymph of honey bee larvae. Controls were pooled since there was no statistically significant difference between the acetone-treated and untreated control group.

In a separate set of experiments we investigated whether an experimentally increased ecdysteroid titer might negatively affect *Amjhe-like* expression, as suggested by the developmental prepupal and pupal profiles shown in Fig. 2a. This hypothesis was tested by injecting 1 μ g 20E into brown-eyed pupae (Pb), where ecdysteroid titers normally are declining to allow progression of the pupal–adult transition. Pb pupae were selected for this experiment because unlike prepupae they have only a basal level of JH in their hemolymph (Fig. 2a), and thus JH should not interfere in this analysis. By Southern blot analysis we observed a decrease in *Amjhe-like* gene expression during the first 24 h after 20E-treatment (Fig. 3b), followed by a gradual recovery of transcription at 48 h until 72 h after 20E injection. These results indicate not only a repressor effect of the high pupal ecdysteroid titer on *Amjhe-like* expression, but also that the injected synthetic hormone is gradually inactivated during the three day period following the start of the experiment. A third conclusion that can be drawn is that the negative action of ecdysteroids on the levels of *Amjhe-like* transcripts may be counterbalancing the positive effect of JH, a finding that would explain the low *Amjhe-like* transcript levels in prepupae where the endocrine milieu is marked by the coincidence of a JH peak with an ecdysteroid peak.

3.4. RNAi-mediated silencing of *Amjhe-like* gene function — effects on JH titer and vitellogenin expression

For this approach we synthesized dsRNA using the Promega RiboMax™ T7 system with primers corresponding to positions P5 and P6 shown in Fig. 1b. This dsRNA fragment of GB15327 was injected into 4 day-old worker bees, while controls received

Fig. 3. Effects of JH and 20-hydroxyecdysone (20E) on *Amjhe-like* gene expression. (a) 5th instar larvae topically treated with 10 μ g of JH-III at the beginning of the cocoon-spinning phase (S1). RNA was extracted and quantified by qPCR 24 h later. Controls were left untreated or were treated with the JH-solvent acetone. An asterisk indicates a statistically significant difference in *Amjhe-like* transcript levels between JH-III treated and control larvae (*t*-test, $P < 0.001$). The controls are pooled in this graph. (b) Pb phase pupae received an injection of 1 μ g 20E and samples were taken after 24, 48 and 72 h for extraction of total RNA. Transcript levels analyzed by RTPCR using a Southern blot transfer and detection by an *Amjhe-like*-specific probe revealed a repression of *Amjhe-like* transcription at 24 h followed by a gradual recovery until 72 h. Controls were left untreated (C), or were injected with the 20E-solvent, ethanol/saline (Et). An *A. mellifera actin* gene was used as endogenous control for normalization.

either an injection of a GFP dsRNA fragment or remained untreated. We injected 4 day-old workers since these showed much better resistance to dsRNA injections than newly emerged bees used in previous studies (Amdam et al., 2003). The high mortality initially observed when injecting newly emerged bees (data not shown) may have been due to the need of building up a small JH peak that typically occurs in hemolymph of worker bees between days 2 and 3 after emergence (Jassim et al., 2000). The function of this small JH peak is still not fully elucidated, but it may be related to adult maturation.

As expected, *Amjhe-like* dsRNA injection significantly reduced *Amjhe-like* mRNA levels when compared to its levels in GFP dsRNA-injected or untreated bees (Fig. 4a; ANOVA and *post hoc* test Dunn's, $P < 0.001$). The levels of JH in the hemolymph of *Amjhe-like* dsRNA-injected bees were three-fold higher when compared to the JH levels in GFP dsRNA-injected bees and six times higher than in untreated controls (Fig. 4b, ANOVA and *post hoc* test Dunn's, $P < 0.001$) suggesting that a long-term reduction of *Amjhe-like* gene function can dramatically affect the JH titer in honey bee workers.

In order to rule out the possibility that the dsRNA synthesized for targeting *Amjhe-like* mRNA may have non-specifically silenced the expression of other esterase genes, we performed multiple alignment comparisons on regions covered by the primer pair P5–P6 in the corresponding genes. Uninterrupted alignments longer than 20 bp with the dsRNA fragment generated from the GB15327 sequence were only found for GB10820, which is the putative duplication of GB15327. This is strong *in silico* evidence but it does not rule

Fig. 4. Effects of RNAi-mediated silencing of *Amjhe-like* gene function on hemolymph JH titer and vitellogenin expression; (a) quantitative PCR of *Amjhe-like* mRNA levels in 4 day-old bees injected with 10 μg *Amjhe-like* dsRNA or GFP dsRNA (sham control) and in untreated control bees. The bees were collected 5 days after the treatment; (b) hemolymph JH titers measured by radioimmunoassay and (c) vitellogenin transcript levels. Represented are means ± SEM; sample size (N) is shown above bars; different letters indicate significant differences between groups (ANOVA on ranks, Dunn's *post hoc* test, $P < 0.001$).

out secondary structure effects, and to test this we also performed SqPCR analyses for the *Amjhe-like* silenced samples using gene-specific primers for three esterases (GB10820, GB11403 and GB13602) that are most similar to GB15327. We could not detect a major reduction in transcript levels for any of these genes when we analyzed the amplification products on ethidium bromide stained 1% agarose gels (data not shown). While this further confirms the specificity of the RNAi-mediated silencing of the honey bee JHE candidate gene, we cannot rule out an off-target reduction in transcript levels of one of the other carboxylesterases that are less similar to GB15327 in their respective amino acid sequences.

A noteworthy observation was the reduction in *Amjhe-like* mRNA levels after GFP dsRNA injection, which was significant when compared to untreated bees. This is an effect similar to that observed in other studies where we targeted the honey bee vitellogenin gene by RNAi (Amdam et al., 2007). Due to a tight regulatory interaction between the hemolymph JH titer and vitellogenin protein levels, the dsGFP injection as a control for *Amjhe-like* gene silencing may have had a collateral

effect on vitellogenin transcript levels. For this reason we tested the samples using honey bee vitellogenin-specific primers in quantitative PCRs. When compared to untreated bees, the GFP dsRNA-injected workers showed significantly reduced vitellogenin transcript levels, but these were not different from those of the *Amjhe-like* knockdown bees (Fig. 4c; ANOVA – *post hoc*: Dunn's; $P < 0.001$).

4. Discussion

The list of potential candidates for a honey bee JHE retrieved from similarity searches in the honey bee genome using *D. melanogaster* and *T. molitor* JHEs as queries was searched for JHE-characteristic motifs within the candidate sequences. Since none of the honey bee sequences showed the canonical GQSAG motif, but rather presented a leucine, methionine, glutamate or valine at position 2 of the G-X-S-X-G consensus sequence we applied two criteria to select the best candidate: (a) presence of all other characteristic esterase–lipase motifs, plus presence of a signal peptide sequence, and (b) closest similarity to *D. melanogaster* JHE due to the separate clustering of JHEs from lepidopteran and non-lepidopteran holometabolous taxa (Kamita et al., 2003). This set of criteria identified GB15327 as the best candidate gene for expression and functional studies. The second best BLASTP match was GB10820, but this sequence has no apparent signal peptide and appears to be a duplication of GB15327. It is of interest to note that a duplication of a JHE gene has also occurred in the *D. melanogaster* genome, but only one of the corresponding genes showed relevant physiological ester hydrolase activity converting JH to JH acid (Crone et al., 2007).

In the life cycle of a honey bee worker, *Amjhe-like* transcript levels reach a first maximum just as the hemolymph JH titer drops to a minimum at the transition from feeding to cocoon-spinning in the last larval instar, strongly suggesting a function of the corresponding enzyme in clearing JH from the hemolymph. The subsequent decrease in *Amjhe-like* expression at the end of the 5th larval instar can be interpreted as promoting the occurrence of the prepupal peak of JH in preparation for the larval–pupal molt. After this event, the inverse relationship between *Amjhe-like* gene expression and the JH titer ceases, and the basal JH titer during the pupal stage (Elekovich et al., 2003) is best explained in terms of a shut down of corpora allata activity that initiates at the end of the prepupal stage (Rachinsky et al., 1990). Similar patterns have been observed in other insects, including *Bombyx mori* (Kinjoh et al., 2007), where the JH titer in hemolymph is controlled by the balance of its biosynthesis in the corpora allata, degradation by JHE, sequestration, and excretion. Coordination between these processes is of extreme importance for metamorphosis processes in insects, and in the honey bee it is additionally essential for the regulation of the divergent developmental pathways into the queen and worker phenotypes in the female sex.

From the comparison of *Amjhe-like* transcript levels to hormone titer fluctuations in the larval instars of honey bee workers we hypothesized that JH may up-regulate *Amjhe-like* gene expression, whereas ecdysteroids may repress its transcription. Both effects were experimentally confirmed by topical JH application to

spinning-stage larvae and by injection of 20E into pupae. The responses in *Amjhe-like* gene expression to JH and ecdysteroids are similar to the responses of JHE encoding genes described in Lepidoptera, e.g. *H. virescens* (Wroblewski et al., 1990), *Choristoneura fumiferana* (Feng et al., 1999) and *Trichoplusia ni* (Jones et al., 1994). An interesting observation in this context is that during honey bee prepupal development the presence of high levels of ecdysteroids apparently overrides the positive effect of JH on *Amjhe-like* gene expression and maintains *Amjhe-like* gene expression at relatively low levels. This result is in accordance with those reported for *C. fumiferana* where 20E suppressed *jhe* induction by JH, indicating an important hormonal interaction in the regulation of JHE encoding genes (Kethidi et al., 2005). All these results support the hypothesis that the *Amjhe-like* gene product has a role in degrading JH in larval–pupal development.

The temporal expression profile of *Amjhe-like* gene in adult honey bee workers further confirmed its JHE candidate status. The increase in relative expression levels during the first days of adult life can be explained as a physiological response that should contribute to keeping JH hemolymph titers low during the phase when bees need to perform intranidal activities, especially while providing larvae with appropriate glandular food. Elevated *Amjhe-like* gene expression during this phase could represent an additional component within the regulatory circuitry that keeps the JH titer low in young bees. The other two factors are a low rate of JH biosynthesis in nurse bees (Huang et al., 1991; Robinson et al., 1992) and an elevated vitellogenin titer which acts as a repressor on JH levels (Guidugli et al., 2005). Interestingly, *Amjhe-like* transcript levels closely parallel the changes observed in the hemolymph vitellogenin titer (Hartfelder and Engels, 1998) and in vitellogenin gene expression in adult worker bees (Piulachs et al., 2003).

At present we do not know how vitellogenin acts to downregulate the JH titer, but upregulating expression of a gene with JHE function could be part of this pathway. With decreasing vitellogenin protein levels in hemolymph its repressor action on the JH titer diminishes, as evidenced by increased corpora allata activity (Huang et al., 1991) and possibly also by the diminished expression of *Amjhe-like*. These changes are associated with a switch in behavioral tasks, marked by the transition from the nurse bee to the forager stage. Yet, the physiological response and associated behaviors are neither strictly age-dependent nor irreversible. They can be accelerated or reversed, permitting fine adjustments in behavioral roles to colony age demography and colony needs (Huang and Robinson 1992; Huang and Robinson 1996; Jassim et al., 2000). Furthermore, they also show differential dynamics according to genotype, as shown for honey bee strains selected for high versus low pollen hoarding behavior (Amdam et al., 2007). Task reversion from foraging to nursing, however, is not unlimited. Whereas young foragers can still easily revert to nursing behaviors if colony needs require this, the older a worker gets the less probable does this switch become. This may be explained by the gradual degeneration of the hypopharyngeal glands and progressive immunosenescence (Amdam et al., 2005), events which are causally related to decreasing vitellogenin titers and, as shown now here, possibly also to decreasing expression levels of *Amjhe-like* gene, both contributing to an increasing JH titer as bees grow older.

While the life cycle expression pattern of the *Amjhe-like* gene and its responses to hormones are compatible with that of an insect JHE, it was the RNAi-mediated silencing of this gene that permitted to disclose its functionality. The dsRNA approach caused an over 90% reduction in *Amjhe-like* mRNA when compared to controls and, in turn led to a six-fold increase in the JH titer when compared to untreated bees. The fact that the 80% reduction in *Amjhe-like* mRNA levels observed in GFP dsRNA-injected workers did not significantly affect the hemolymph JH titer is further proof of the specificity of the knockdown response. The results also show that the modified G-X-S-X-G motif did not abolish the JH degrading function of this putative honey bee JHE.

The fact that we could not find a single carboxylesterase in the honey bee genome with a canonical binding/catalytic site motif GQSAG, the modification to GLSAG in the candidate gene *Amjhe-like* may actually be related to developmental and behavioral flexibility inherent to social organization in insects. It is exactly in these aspects that social Hymenoptera most differ from the main insect model organisms for metamorphosis regulation and reproductive physiology. Morphogenetic hormones, especially JH and also the insulin/TOR signaling pathway are key regulators in the divergence of developmental pathways leading to the queen and worker phenotypes (Hartfelder and Engels 1998; Hartfelder and Emlen 2005; Patel et al., 2007) and in the adult stages, JH has been co-opted into a novel function as a regulator in division of labor of the hymenopteran worker caste (Robinson and Vargo 1997). Apparently, this has become possible after its function in reproductive processes had been shifted into the late pupal phase (Barchuk et al., 2002), opening its adoption into novel functions in the adult stage. It is, thus, quite feasible, that the greater flexibility associated with developmental processes and behavioral roles in socioevolution also involved changes in functional motifs of a JHE encoding gene, representing a possibly more fine-tuned function in hormonal signaling pathways.

Acknowledgements

We thank Luiz Roberto Aguiar for technical assistance in the apiary of Ribeirão Preto. We are grateful to Maria Helena Goldman (Univ. São Paulo, Ribeirão Preto) for supplying a GFP clone for use in RNAi experiments, to Walter G. Goodman (Univ. Wisconsin, Madison) for a generous gift of JH antibody, and to Subba Reddy Palli and Hua Bai (Univ. Kentucky, Lexington) for commenting on an earlier version of the manuscript. Financial support, including a doctoral fellowship to A.M., was provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 05/03926-5).

References

- Amdam, G.V., Omholt, S.W., 2003. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *J. Theor. Biol.* 223, 451–464.
- Amdam, G.V., Simões, Z.L.P., Guidugli, K.R., Norberg, K., Omholt, S.W., 2003. Disruption of Vitellogenin Gene Function in Adult Honeybees by

- Intraabdominal Injection of Double-stranded RNA. BMC Biotechnol 13:18 pages, available online: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/3/1>.
- Amdam, G.V., Aase, A., Seehuus, S.C., Fondrik, M.K., Norberg, K., Hartfelder, K., 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp. Gerontol.* 40, 939–947.
- Amdam, G.V., Nilsen, K.-A., Norberg, K., Fondrik, M.K., Hartfelder, K., 2007. Variation in endocrine signaling underlies variation in social life history. *Am. Nat.* 170, 37–46.
- Barchuk, A.R., Bitondi, M.M.G., Simões, Z.L.P., 2002. Effects of Juvenile Hormone and Ecdysone on the Timing of Vitellogenin Appearance in Hemolymph of Queen and Worker Pupae of *Apis mellifera*. *J. Insect Sci.* 2:1–8 pages, available online www.insectscience.org/2.1.
- Bloch, G., Borst, D.W., Huang, Z.Y., Robinson, G.E., Cnaani, J., Hefetz, A., 2000. Juvenile hormone titers, juvenile hormone biosynthesis, ovarian development and social environment in *Bombus terrestris*. *J. Insect Physiol.* 46, 47–57.
- Campbell, P.M., Oakeshott, J.G., Healy, M.J., 1998. Purification and kinetic characterisation of juvenile hormone esterase from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 501–515.
- Campbell, P.M., Harcourt, R.L., Crone, E.J., Claudianos, C., Hammock, B.D., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 2001. Identification of a juvenile hormone esterase gene by matching its peptide mass fingerprint with a sequence from the *Drosophila* genome project. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 513–520.
- Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., Feyereisen, R., Oakeshott, J.G., 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.* 15, 615–636.
- Crone, E.J., Sutherland, T.D., Campbell, P.M., Coppin, C.W., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 2007. Only one esterase of *Drosophila melanogaster* is likely to degrade juvenile hormone *in vivo*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 540–549.
- Cyler, M., Schrag, J.D., Sussman, J.L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M.G., Doctor, B.P., 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Prot. Sci.* 2, 366–382.
- Deutsch, M., Long, M., 1999. Intron–exon structures of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acids Res.* 27, 3219–3228.
- Elekovich, M.M., Jez, K., Ross, A.J., Robinson, G.E., 2003. Larval juvenile hormone treatment affects pre-adult development, but not adult age at onset of foraging in worker honey bees (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* 49, 359–366.
- Feng, Q.L., Ladd, T.R., Tomkins, B.L., Sundaram, M., Sohi, S.S., Retnakaran, A., Davey, K.G., Palli, S.R., 1999. Spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) juvenile hormone esterase: hormonal regulation, developmental expression and cDNA cloning. *Mol. Cell. Endocrinol.* 148, 95–108.
- Gilbert, L.I., Granger, N.A., Roe, R.M., 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 617–644.
- Goodman, W.G., Coy, D.C., Baker, F.C., Xu, L., Toong, Y.C., 1990. Development and application of a radioimmunoassay for the juvenile hormones. *Insect Biochem.* 20, 357–364.
- Goodman, W.G., Granger, N.A., 2005. The juvenile hormones. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 3. Elsevier, San Diego, pp. 320–408.
- 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. *FEBS Lett.* 579, 4961–4965.
- Hammock, B.D., 1985. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Regulation of juvenile hormone titre: degradation*. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 7. Pergamon, Oxford, pp. 431–472.
- Handzik, T.N., Abdel-Aal, Y.A.I., Harshman, L.G., Hammock, B.D., 1989. Isolation and sequencing of cDNA clones coding for juvenile hormone esterase from *Heliothis virescens*: evidence for a catalytic mechanism for the serine carboxylesterase. *J. Biol. Chem.* 264, 12419–12425.
- Hartfelder, K., Engels, W., 1998. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr. Top. Dev. Biol.* 40, 45–77.
- Hartfelder, K., Emlen, D.J., 2005. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Endocrine control of insect polyphenisms*. *Comprehensive Insect Molecular Science*, vol. 3. Elsevier, Oxford, pp. 651–703.
- Hartfelder, K., Bitondi, M.M.G., Santana, W.C., Simões, Z.L.P., 2002. Ecdysteroid titers and reproduction in queens and workers of the honey bee and of a stingless bee: loss of ecdysteroid function at increasing levels of sociality? *J. Insect Physiol.* 32, 211–216.
- Hinton, A.C., Hammock, B.D., 2001. Purification of juvenile hormone esterase and molecular cloning of the cDNA from *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 57–66.
- Huang, Z.Y., Robinson, G.E., 1992. Honeybee colony integration — worker–worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 89, 11726–11729.
- Huang, Z.Y., Robinson, G.E., 1996. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 39, 147–158.
- Huang, Z.Y., Robinson, G.E., Tohe, S.S., Yagi, K.J., Strambi, C., Strambi, A., Stay, B., 1991. Hormonal regulation of behavioral development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. *J. Insect Physiol.* 37, 733–741.
- Huang, Z.Y., Robinson, G.E., Borst, D.W., 1994. Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. *J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Behav. Physiol.* 174, 731–739.
- Jassim, O., Huang, Z.Y., Robinson, G.E., 2000. Juvenile hormone profiles of worker honey bees, *Apis mellifera*, during normal and accelerated behavioural development. *J. Insect Physiol.* 46, 243–249.
- Jones, G., Venkataraman, V., Ridley, B., O'Mahony, P., Turner, H., 1994. Structure, expression and gene sequence of a juvenile hormone esterase-related protein from metamorphosing larvae of *Trichoplusia ni*. *Biochem. J.* 302, 827–835.
- Kamikouchi, A., Morioka, M., Kubo, T., 2004. Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex-and/or caste selective manner. *Zool. Sci.* 21, 53–62.
- Kamita, S.G., Hinton, A.C., Wheelock, C.E., Wogulis, M.D., Wilson, D.K., Wolf, N.M., Stok, J.E., Hock, B., Hammock, B.D., 2005. Juvenile hormone (JH) esterase: why are you so JH specific? *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1261–1273.
- Kethidi, D.R., Xi, Z.Y., Palli, S.R., 2005. Developmental and hormonal regulation of juvenile hormone esterase gene in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 51, 393–400.
- Kinjo, T., Kaneko, Y., Itoyama, K., Mita, K., Hiruma, K., Shinoda, T., 2007. Control of juvenile hormone biosynthesis in *Bombyx mori*: cloning of the enzymes in the mevalonate pathway and assessment of their developmental expression in the corpora allata. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 808–818.
- Lin, H.R., Dusset, C., Huang, Z.Y., 2004. Short-term changes in juvenile hormone titers in honey bee workers due to stress. *Apidologie* 35, 319–327.
- Michélette, E.R.D., Soares, A.E.E., 1993. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 24, 431–440.
- Nunes, F.M.F., Valente, V., Sousa, J.F., Cunha, M.A.V., Pinheiro, D.G., Maia, R.M., Araújo, D.D., Costa, M.C.R., Martins, W.K., Carvalho, A.F., Monesi, N., Nascimento, A.M., Peixoto, P.M.V., Silva, M.F.R., Ramos, R.G.P., Reis, L.F.L., Dias-Neto, E., Souza, S.J., Simpson, A.J.G., Zago, M.A., Soares, A.E.E., Bitondi, M.M.G., Espinosa, E.M., Espindola, F.S., Paco-Larson, M.L., Simões, Z.L.P., Hartfelder, K., Silva, W.A., 2004. The use of Open Reading Frame ESTs (ORFESTs) for Analysis of the Honey Bee Transcriptome. *BMC Genomics* 5:84; available online: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/5/84>.
- Oakeshott, J.G., Claudianos, C., Campbell, P.M., Newcomb, R.D., Russell, R.J., 2005. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Biochemical genetics and genomics of insect esterases*. *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 5. Elsevier, San Diego, pp. 309–381.
- Ollis, D.L., Cheach, E., Cyger, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G., Goldman, A., 1992. The a/b hydrolase fold. *Prot. Eng.* 5, 197–211.
- Patel, A., Fondrik, M.K., Kaftanoglu, O., Emore, C., Hunt, G., Frederick, K., Amdam, G.V., 2007. The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. *PLoS One* 2 (6), e509.

- Pinto, L.Z., Bitondi, M.M.G., Simões, Z.L.P., 2000. Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *J. Insect Physiol.* 46, 153–160.
- Pinto, L.Z., Hartfelder, K., Bitondi, M.M.G., Simões, Z.L.P., 2002. Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J. Insect Physiol.* 48, 783–790.
- Piulachs, M.D., Cruz, J., Simões, Z.L.P., Bellés, X., 2003. The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*, structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 459–465.
- Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A., Hartfelder, K., 1990. Caste and metamorphosis — hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 31–38.
- Rembold, H., 1987. Caste-specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* 17, 1003–1006.
- Robinson, G.E., Strambi, C., Strambi, A., Feldlaufer, M.F., 1991. Comparison of juvenile hormone and ecdysteroid hemolymph titers in adult worker and queen honey bees (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* 37, 929–935.
- Robinson, G.E., Strambi, C., Strambi, A., Huang, Z.Y., 1992. Reproduction in worker honey bees is associated with low juvenile hormone titers and rates of biosynthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 87, 471–480.
- Robinson, G.E., Vargo, E.L., 1997. Juvenile hormone in adult eusocial hymenoptera: Gonadotropin and behavioral pacemaker. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 35, 559–583.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A., Barrell, B., 2000. Artemis: sequence visualisation and annotation. *Bioinformatics* 16, 944–945.
- Shiozaki, T., Bonning, B.C., Hirai, M., Kikuchi, K., Hammock, B.D., 2000. Characterization and affinity purification of juvenile hormone esterase from *Bombyx mori*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64, 1681–1687.
- Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, L., 1991. Atomic structure of acetylcholine esterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253, 872–879.
- The Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931–949.
- Thomas, B.A., Church, W.B., Lane, T.R., Hammock, B.D., 1999. Homology model of juvenile hormone esterase from the crop pest, *Heliothis virescens*. *Proteins* 34, 184–196.
- Thomas, B.A., Hinton, A.C., Moskowitz, H., Severson, T.F., Hammock, B.D., 2000. Isolation of juvenile hormone esterase and its partial cDNA clone from the beetle, *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 529–540.
- Wang, D.L., 1965. Growth rates of young queen and worker honeybee larvae. *J. Apic. Res.* 4, 3–5.
- Ward, V.K., Bonning, B.C., Huang, T.L., Shiozaki, T., Griffith, V.M., Hammock, B.D., 1992. Analysis of the catalytic mechanism of juvenile hormone esterase by site-directed mutagenesis. *Int. J. Biochem.* 24, 1933–1941.
- Winston, M.L., 1987. The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Wroblewski, V.J., Harshman, L.G., Hanzlik, T.N., Hammock, B.D., 1990. Regulation of juvenile hormone esterase gene expression in the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). *Arch. Biochem. Biophys.* 278, 461–466.