UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**Morfogênese do tegumento em *Apis mellifera* :
construindo o exoesqueleto adulto.**

Moysés Elias Neto

Orientação: Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi

Dissertação apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: Biologia
Comparada.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2008

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

Elias-Neto, Moysés

Morfogênese do tegumento em *Apis mellifera*: construindo o
exoesqueleto adulto. Ribeirão Preto, 2008.

70 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:
Biologia Comparada.

Orientador: Bitondi, Márcia Maria Gentile.

1. *Apis mellifera*. 2. tegumento. 3. lacases. 4. muda.
5. metamorfose.

“

A natureza tem um tempo ilimitado para viajar por caminhos tortuosos rumo a destinos desconhecidos. A mente do homem é medíocre demais para discernir de onde vem e para onde vai o caminho, e tem de se contentar em conseguir enxergar apenas pedaços do caminho, por menores que eles sejam.

”

Karl von Frisch (1886-1982)

Palavras humildes do zoólogo austríaco, ganhador do prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, em 1973, por suas descobertas sobre padrões de comunicação no comportamento social de abelhas.

O tempo pra gente passa em passos diferentes...

À Cachim... noiva, esposa, eterna namorada... por nossos sonhos e realizações.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Márcia M.G. Bitondi, exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa, meu franco reconhecimento pela valiosa orientação.

Aos Professores Doutores Zilá L.P. Simões e Klaus H. Hartfelder, pelas contribuições imprescindíveis.

À Vera L.C. Figueiredo, pelo auxílio indispensável no laboratório.

À Michelle P.M. Soares, pelas importantes contribuições na parceria em estudos do tegumento em abelhas.

À Anete P. Lourenço, pelo apoio no experimento de silenciamento gênico.

À Mônica M. Florecki, Érica D. Tanaka e Vani M.A. Correa, pela assistência nas técnicas de histologia.

Ao Francis M. F. Nunes, pela referência nas análises de bioinformática.

Ao Luiz R. Aguiar, pelo apoio técnico no apiário experimental.

A todos os pesquisadores e amigos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas (LBDA), pelo privilégio de um convívio enriquecedor.

A todos os professores, alunos, técnicos e funcionários que fizeram e fazem do Bloco A da Genética em Ribeirão Preto uma referência no estudo de abelhas, representados aqui na figura exímia de seu fundador: Doutor Warwick E. Kerr.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio científico e financeiro.

À Universidade de São Paulo, em particular ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, pelo fortalecimento de minha formação acadêmica através da obtenção de um conhecimento amplo, estimulante e desafiador.

À Renata A.A. Cavallari, pelo competente suporte no secretariado da pós-graduação.

A todos os amigos pós-graduandos, em especial aos participantes do grupo de discussão sobre Evolução e aos organizadores do I Encontro de Biologia do Desenvolvimento da USP e do III Encontro da Biologia Comparada.

A todos os professores da Pós-Graduação, pelos sábios ensinamentos.

À inesquecível 39^a turma de Biologia da USP Ribeirão. Saudades...

À minha amada Priscila (*Cachim*) e seus familiares, em especial aos meus sogros (Gilberto e Izilda) e à minha cunhada (Letícia).

À minha família, a mais profunda gratidão por tudo aquilo que sou e que ainda possa vir a ser, em especial aos meus avós (Moysés e Doca; Pedro e Nina), meus pais (Paulo e Tânia) e meus irmãos (Tatiana, Tamara e Eduardo).

Ao meu Deus, a Vida, pela inspiração...

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
1) O tegumento em metamorfose	3
2) Ecdisteróides	8
3) <i>Apis mellifera</i> como modelo experimental	12
OBJETIVOS	15
MATERIAIS E MÉTODOS	16
1) Material biológico	16
2) Dissecção do tegumento	16
3) Ligadura abdominal	17
4) Radioimunoensaio para ecdisteróides	17
5) Silenciamento gênico	19
6) Histologia do tegumento	21
7) Estudo de expressão por RT-PCR semiquantitativa	21
7.1) Extração do RNA total	21
7.2) Síntese da primeira fita de cDNA por RT (<i>Reverse Transcription</i>)	22
7.3) Amplificação por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	22
7.4) Análise por eletroforese em agarose 1%	23
RESULTADOS e DISCUSSÃO	24
1) Categorização do material biológico	24
2) Morfogênese do tegumento adulto	27
3) Identificação e caracterização do gene <i>Amlac 2</i>	34
4) Transcrição diferencial de <i>Amlac 2</i>	35
5) Ligadura Abdominal: bloqueio na diferenciação do tegumento	36
6) Um novo modelo endócrino para a diferenciação do adulto em <i>Apis mellifera</i>	41
7) Silenciamento gênico pós-transcricional de <i>Amlac 2</i>	45
8) Análise comparativa entre as castas e os sexos	51
CONCLUSÃO	55
BIBLIOGRAFIA	58

RESUMO

O exoesqueleto (ou cutícula) é um dos responsáveis pelo sucesso evolutivo dos insetos, não só pela proteção e suporte que lhes confere, mas também pela interface que representa entre o animal e o meio ambiente. A construção do exoesqueleto do inseto adulto envolve um processo de diferenciação denominado *tanning*, caracterizado pela melanização e pela esclerotização. Às enzimas lacases classicamente tem sido atribuído um papel fundamental no *tanning* cuticular, em particular na esclerotização. O presente trabalho consiste no estudo da função e regulação do gene *Amlac 2* codificador da Lacase 2 de *Apis mellifera*, no âmbito da relação entre a expressão deste gene e a morfogênese do tegumento (cutícula e epiderme) do adulto. Através de RT-PCR semi-quantitativa, a abundância de transcritos foi contrastada entre diferentes estágios da ontogênese e entre distintas regiões do corpo (tórax, asas e abdome). A transcrição se acentua logo após a apólise pupal-imaginal, e se mantém alta durante todo o desenvolvimento do adulto farato. Embora haja um padrão de expressão comum entre as três regiões do corpo estudadas, nota-se um relativo atraso do início da transcrição desse gene no tegumento abdominal. Este resultado é consistente com o menor grau de esclerotização da cutícula do abdome em comparação com a do tórax e das asas. Uma análise comparativa entre abelhas operárias, zangões e rainhas revelou ainda padrões casta e sexo-específicos de diferenciação do tegumento adulto. Experimentos de silenciamento gênico pós-transcricional resultaram no comprometimento da melanização e da esclerotização cuticulares e não conclusão do ciclo de muda, efeitos que influenciaram drasticamente a viabilidade dos adultos. Análises histológicas do tegumento de abelhas submetidas ao silenciamento de *Amlac 2* revelaram ainda má formação da cutícula, com alterações principalmente em sua espessura e arquitetura. Tais resultados evidenciam uma importante contribuição da enzima Lacase 2 na diferenciação do exoesqueleto adulto de *Apis mellifera*, fenômeno esse fundamental na ontogênese plena da abelha. Experimentos de ligadura abdominal em pupas iniciais, procedimento que impede o fluxo de hormônios ecdisteróides provenientes das glândulas protorácicas para o abdome, resultaram em inibição do aumento do título de ecdisteróides, repressão temporária da transcrição do gene *Amlac 2* e bloqueio do processo de diferenciação cuticular. Tais efeitos sugerem fortemente que esses hormônios controlam a expressão do gene *Amlac 2*, por sua vez envolvido no processo de maturação da cutícula. Ainda, a detecção inesperada de quantidades crescentes de ecdisteróides no abdome de pupas, após o terceiro dia de ligadura, nos levou a propor um novo modelo endócrino para o desenvolvimento do adulto de *Apis mellifera*.

ABSTRACT

The evolutionary success of the insects is to a large extent due to the structural and mechanical properties of the integument, which is made up of an outer cuticle layer and the subjacent epidermis. As an effective interface between the insect soft body and the environment, the integument performs all the functions of a skin and of an exoskeleton. It not only supports the insect, but gives it its shape, means of locomotion, and provides protection against desiccation, besides being involved in defense strategies towards predators and pathogenic agents. Building and maturation of the adult exoskeleton include complex biochemical pathways where the enzymes Laccases (E.C. 1.10.3.2) may have a key role. Laccases have been characterized mainly in fungi and bacteria. In insects, the function of these enzymes has been linked to cuticle tanning (pigmentation and sclerotization) and stabilization of the protein-based exoskeleton. It was our aim to identify and investigate the function and regulation of the gene, *Amlac 2*, which encodes the enzyme Laccase 2 in the honeybee, *Apis mellifera*. Semi-quantitative RT-PCR analyses evidenced that *Amlac 2* is highly expressed in the integument of pharate adults in correlation with cuticle pigmentation and sclerotization. Transcription increases in thoracic, abdominal and wing integuments immediately after pupal-imaginal apolysis, and remains abundant all through pharate adult development. Consistent with the different degree of sclerotization in cuticle areas recovering distinct body parts, the increase in the levels of *Amlac2* transcripts occurs later in abdominal than in thoracic and wing integuments. A comparative approach using honeybee workers, queens and drones also revealed caste and sex-specific patterns of adult integument differentiation. Post-transcriptional *Amlac2* gene silencing resulted in abnormalities in cuticle structure, melanization and sclerotization, as revealed by histological analyses, and drastically affected the adult molt. Such results clearly indicate a critical role of Laccase 2 in the differentiation of the adult exoskeleton in the honeybee. Experiments using a ligature to prevent the increase in ecdysteroid titer in abdomen resulted in inhibition of *Amlac 2* transcription and severely impaired cuticular differentiation. These results strongly indicate that *Amlac 2* expression is controlled by ecdysteroids, and has a crucial role in the differentiation and maturation of the adult cuticle. Moreover, a radioimmunoassay using hemolymph from ligated abdomens suggested the existence of an alternative source of ecdysteroids, in addition to prothoracic glands, thus leading us to propose a new endocrine model for differentiation of the adult honeybee.

INTRODUÇÃO

1) O tegumento em metamorfose

O fenômeno da metamorfose consiste em uma drástica reorganização do desenvolvimento na qual uma forma larval imatura se transforma em uma adulta reprodutivamente ativa (Gilbert, 1996). A larva possui características únicas muito diferentes das do adulto, frequentemente assumindo formas especializadas para o exercício de alguma função, como o crescimento. Durante a metamorfose, os processos do desenvolvimento reagem a hormônios específicos, e o organismo muda sua forma, fisiologia e comportamento para se preparar a um novo modo de existência (Gilbert, 2006).

O processo metamórfico nos insetos ocorre dentro do contexto dos ciclos de crescimento caracterizados por mudas, ou seja, substituição periódica da velha cutícula por uma nova, recém sintetizada. A transição larval-imaginal ocorre através de dois ciclos de muda: a pupação (muda metamórfica) e a diferenciação do adulto (muda imaginal). Em Insecta são observadas basicamente três condições metamórficas, com crescentes graus de modificações morfológicas: ametábola, hemimetábola e holometábola. Os insetos ametábolos possuem desenvolvimento direto, no qual o adulto assemelha-se à forma do juvenil. Em hemimetábolos e holometábolos o desenvolvimento é indireto. No primeiro caso há modificação parcial do indivíduo jovem eclodido do ovo (ninfá), evidenciada pelo desenvolvimento de algumas estruturas imaginiais, como as asas e os órgãos genitais. Nos últimos a metamorfose é completa, na qual uma forma imatura (larva) passa por uma reorganização drástica da ontogênese, que resulta na formação do organismo adulto (Nijhout, 1994). Em particular,

Holometabola corresponde a um grupo reconhecidamente monofilético e compreende mais de 80% das espécies de insetos, destacando-se, portanto, como a linhagem mais diversificada dentre todos os animais vivos (Kristensen, 1981).

O exoesqueleto (cutícula) é considerado um dos grandes responsáveis pelo sucesso evolutivo dos insetos. Isso se deve não só à proteção e ao suporte que lhes confere, mas também à interface que representa entre o animal e o meio ambiente. Pode ser dividido em duas camadas: a epicutícula, fina, de composição extremamente complexa (lipídeos e uma variedade de proteínas); e internamente a procutícula, espessa, contendo proteínas e o polissacarídeo estrutural quitina (Hepburn, 1985). Toda essa estrutura é produto de secreção da camada celular epidérmica subjacente, sendo, portanto, fisiologicamente indissociável dela. O conjunto formado pela epiderme e a cutícula é denominado tegumento, cenário de grandes modificações durante a metamorfose.

A cutícula apresenta uma série de particularidades inerentes à espécie biológica, à etapa do desenvolvimento e à localização no corpo do animal (**Figura 1**). Tamanho varia se relaciona às pressões pelas quais passam os diferentes organismos ao longo de seus ciclos de vida e de sua diversificação evolutiva.

Figura 1: Diversidade cuticular em abelhas. Da esquerda para a direita, são mostradas etapas sucessivas na diferenciação do exoesqueleto adulto em (A) *Apis mellifera* e (B) *Frieseomelitta varia*. Notar o contraste entre cutículas de diferentes fases do desenvolvimento, ou entre as que recobrem o tórax e o abdome. Observar ainda diferenças interespecíficas, como a heterocronia no padrão de maturação cuticular em relação à muda imaginal (indicada pelas setas). Obs: fotos de *F. varia* gentilmente cedidas por Dallacqua, R.

Ontogeneticamente podem ser distinguidos dois tipos básicos de cutícula: a incolor, flexível e reativa, e a pigmentada, rígida e estabilizada. O segundo tipo deriva necessariamente do primeiro, que se diferencia por um processo denominado “*tanning*” (“curtimento”), caracterizado pelo escurecimento (melanização) e pelo enrijecimento (esclerotização).

Desde trabalhos pioneiros como os de Pryor (1940) e Fraenkel e Rudall (1940), a diferenciação cuticular tem sido estudada sob abordagens químicas, físicas e biológicas. Com significativa relevância podem ser citadas algumas das revisões mais recentes sobre o assunto: Hopkins e Kramer (1992), Sugumaran (1998) e Andersen (2005). Entretanto, são escassos e relativamente antigos os trabalhos que utilizaram a abelha *Apis mellifera* como modelo biológico em estudos da cutícula. Thompson (1978) descreveu a histologia da cutícula durante o desenvolvimento do adulto de *Apis mellifera adansonii* (raça africana). Em uma abordagem comparativa, também foram investigadas algumas propriedades químicas e mecânicas da cutícula dessa sub-espécie (Thompson e Hepburn, 1978; Andersen *et al.*, 1981). Devido às poucas informações existentes, novas investigações se fazem necessárias na busca pelo entendimento da morfogênese do tegumento da abelha.

O *tanning* do exoesqueleto é uma característica marcante da metamorfose, particularmente no que diz respeito à diferenciação do inseto adulto. A idéia de “curtimento” cuticular, introduzida por Pryor (1940), defendia a reação entre uma proteína e um composto fenólico (catecol), ambos secretados na cutícula em formação, gerando um produto rígido e escurecido denominado “esclerotina”. Tendo como base essa hipótese inicial, Kramer *et al.* (2001) apresentaram um refinado modelo químico para a esclerotização: a conjugação oxidativa de catecóis com proteínas cuticulares, catalisada por enzimas denominadas fenoloxidasas, atribuição geral às enzimas lacases

[(EC 1.10.3.2), *p*-difenol: O₂ oxido-redutases] e tirosinases [(EC 1.10.3.1), *o*-difenol: O₂ oxido-redutases]. Trata-se de uma modificação pós-traducional chamada catecolação, a qual resulta no aparecimento de verdadeiras pontes covalentes entre proteínas estruturais da cutícula, ou mesmo entre estas e polímeros de quitina, e, por meio delas, ocorre a formação de uma malha molecular entrelaçada, resistente e inerte. Recentemente esse modelo de esclerotização cuticular foi reforçado por experimentações *in vitro* (Suderman *et al.*, 2006).

A melanização e a esclerotização, mecanismos gerais de diferenciação da cutícula, possuem uma base química comum, representada na molécula de dopamina, sintetizada a partir do aminoácido tirosina (**Figura 2**). Dessa forma, o escurecimento e o enrijecimento da cutícula são fenômenos articulados e precisamente regulados por mecanismos locais de diferenciação, podendo ser considerados como diferentes aspectos de um mesmo processo (Cottrell, 1964).

Figura 2: Base química comum da melanização e esclerotização cuticulares.

O aminoácido tirosina é convertido em DOPA (3,4-dihidroxi-fenilalanina) por hidroxilação. A descarboxilação de DOPA origina a dopamina, precursora tanto de agentes esclerotizantes (catecóis) como de pigmentos (melanina). Tal via bioquímica é mediada pelas enzimas (1) tirosina-hidroxilase, (2) dopa-descarboxilase e (3) fenoloxidas. Esquema modificado de Andersen (2005).

Dentre as fenoloxidasas, às lacases, e não às tirosinases, classicamente tem sido atribuído um papel fundamental no *tanning* cuticular (Barrett e Andersen, 1981). A importância funcional das tirosinases, por sua vez, tem sido relacionada a processos de cicatrização e resposta imune (Ashida e Brey, 1995), embora não seja descartada a possibilidade de sua contribuição na diferenciação do exoesqueleto. As lacases são produzidas pelas células epidérmicas e secretadas em sua forma ativa na cutícula em desenvolvimento. Já as tirosinases são sintetizadas por células da hemolinfa (hemócitos) sob a forma de precursores inativos (profenoloxidasas), ativados por proteólise em consequência de danos físicos e invasões microbianas ou parasíticas (Ashida e Brey, 1998). Podem ainda ser transportadas para a cutícula por intermédio da epiderme (Asano e Ashida, 2001a,b).

A atividade catalítica das lacases é relacionada à presença de sítios específicos ligadores de cobre, basicamente três tipos principais, dos quais um em especial lhes confere uma típica cor azul, sendo elas enquadradas filogeneticamente num grupo de enzimas coletivamente chamadas *multicopper – blue copper oxidases* (Solomon *et al.*, 1996). Têm sido intensamente estudadas em fungos e, em menor escala, em plantas superiores (Mayer e Staples, 2002), assim como em bactérias (Claus, 2003) e em alguns poucos insetos. Presume-se que sejam universalmente distribuídas nos mais diversos domínios da vida, dada sua versatilidade e a essencialidade da reação que catalisam (Claus, 2004). Também têm despertado interesse por seu potencial biotecnológico e econômico em uma série de aplicações industriais, como a biorremediação e a estabilização do vinho (Durán *et al.*, 2002).

Pouca atenção tem sido dada às lacases de insetos, sendo escassos os estudos com foco em genética, bioquímica e fisiologia destas enzimas. Sua atividade enzimática já foi caracterizada no tegumento de alguns Diptera (Barrett e Andersen, 1981; Barrett,

1987a,b; Binnington e Barrett, 1988; Sugumaran *et al.*, 1992). Mais recentemente algumas publicações se detiveram na análise molecular de seus genes codificadores em espécies de Diptera (*Anopheles gambiae*), Lepidoptera (*Manduca sexta*) e Coleoptera (*Tribolium castaneum*) (Dittmer *et al.*, 2004; Arakane *et al.*, 2005). Em Hymenoptera há um único trabalho (Parkinson *et al.*, 2003), que descreve uma lacase atípica no veneno da vespa parasitóide *Pimpla hypochondriaca*. Particularmente em relação à *Apis mellifera* nenhum registro foi encontrado.

2) Ecdisteróides

“Ecdisteróides” corresponde a um termo genérico utilizado para denominar um conjunto de substâncias com atividade hormonal sobre o processo de muda em insetos (Goodwin *et al.*, 1978). A ecdisona e a 20-hidroxiecdisona (20E) são exemplos típicos desse grupo de moléculas.

As mudas ocorrem na forma de eventos similares, recorrentes em um padrão cíclico, nos quais a nova cutícula é sintetizada sob a antiga, a qual é subsequentemente eliminada. Esse processo permite o crescimento de organismos envoltos por um rígido exoesqueleto, além de propiciar mudanças diversas não somente ao nível do tegumento, como também relacionadas ao desenvolvimento de maneira geral. O ciclo de muda consiste em uma seqüência de eventos que resultam, essencialmente, na digestão das porções re-aproveitáveis da velha cutícula e na síntese de uma nova (Nijhout, 1994). O perfil seqüencial de cada ciclo pode ser resumido em 4 etapas principais: 1) APÓLISE, que consiste na separação entre a epiderme e a cutícula antiga; 2) proliferação celular e rearranjo espacial da camada epidérmica; 3) síntese da nova cutícula concomitantemente à digestão da antiga; 4) ECDISE, ou eliminação da porção não re-

aproveitável da velha cutícula. Ressalta-se a importância da apólise como marco inaugural do ciclo de muda, e consequentemente de um novo estágio de vida (Jenkin e Hinton, 1966). O período de morfogênese do inseto situado entre a apólise e a ecdise é denominado farato (encoberto, mascarado), quando uma nova forma ontogenética se diferencia ainda envolvida pela cutícula da forma anterior (Hinton, 1946).

Toda essa dinâmica característica dos ciclos de muda se relaciona intimamente às oscilações do título de ecdisteróides na hemolinfa (**Figura 3**).

Figura 3: Relação entre os eventos característicos do ciclo de muda e o título de ecdisteróides na hemolinfa. Os esquemas foram redesenhados a partir dos trabalhos de Riddiford (1985) e Nijhout (1994). **A**- epicutícula; **B**- procutícula; **C**- epiderme.

O Lepidoptera *Manduca sexta* é sem dúvida o modelo biológico mais utilizado na Endocrinologia da muda e da metamorfose em insetos. Tal prestígio científico se deve em parte a atributos interessantes dessa mariposa como o grande tamanho e o ciclo de vida relativamente curto. Além disto, devido aos danos econômicos que provoca como praga do tabaco, tem sido também estudada com a finalidade de auxiliar o combate à sua própria proliferação.

Os títulos de ecdisteróides já foram caracterizados nas diferentes fases do desenvolvimento desse inseto (Bollenbacher *et al.*, 1981). As interações dos mesmos com outros reguladores do ciclo de muda também já foram descritas (Truman, 1981; Riddiford *et al.*, 2003). É nesse contexto fisiológico que se baseiam os conhecimentos anunciados a seguir.

Os ecdisteróides são produzidos pelas glândulas protorácicas, localizadas, como o nome indica, na região do primeiro segmento do tórax. A regulação da biossíntese e da secreção desses hormônios se dá por meio da ação de um neuro-hormônio, o PTTH (hormônio protoracicotrópico, na sigla em inglês), um polipeptídeo produzido por células neurosecretoras do cérebro e liberado por um órgão neuro-hemal (na grande maioria dos casos o *corpus cardiacum*). A síntese e liberação de PTTH, por sua vez, se subordinam a variáveis ambientais relacionadas ao crescimento e à nutrição, como temperatura, umidade, fotoperíodo, feromônios, presença de determinados compostos no alimento, entre outros (Nijhout, 1994). Os ciclos de muda são caracterizados por picos de ecdisteróides únicos e simétricos, padrão que coordena e sincroniza diversas modificações nos mais diferentes tecidos, fazendo com que esses hormônios atuem como verdadeiros “regentes” da “orquestra” do desenvolvimento (Schwartz e Truman, 1983).

A ação molecular dos ecdisteróides se dá ao nível da expressão gênica. É intermediada por receptores nucleares, as proteínas EcR (*Ecdysteroid Receptor*) e Usp (*Ultraspiracle*), que se associam para formar heterodímeros que atuam como fatores de transcrição de genes específicos (Riddiford *et al.*, 2001; Riddiford *et al.*, 2003; King-Jones e Thummel, 2005). As respostas aos ecdisteróides são coordenadas temporalmente, nos diferentes estágios do desenvolvimento, como também espacialmente, nos diversos órgãos e tecidos dos insetos (Truman *et al.*, 1974). Em modelo proposto e já recorrentemente comprovado (Ashburner *et al.*, 1974; Ashburner, 1990), o complexo formado pela ecdisona e seu receptor heterodimérico afetaria a diferenciação celular por meio de elaboradas cascatas gênicas. De forma simplificada, num momento inicial alguns genes seriam ativados (*early genes*, ou genes iniciais) enquanto outros seriam reprimidos (*late genes*, ou genes tardios). O acúmulo do produto dos primeiros inibiria sua própria síntese, ao mesmo tempo em que ativaria a transcrição desses últimos. Esses, por sua vez, afetariam a expressão de outros genes ainda mais tardios, e assim sucessivamente.

É dessa maneira que, durante a metamorfose, os ecdisteróides atuam, inicialmente no direcionamento do estado de determinação das células epidérmicas (inativação irreversível de genes larvais e preparação para a expressão de genes imaginais), e em seguida na ativação da muda propriamente dita (início da expressão de genes imaginais) (Riddiford, 1982).

Embora esse seja o panorama comumente aceito e historicamente referenciado, há de se reconhecer o grau de complexidade que permeia o controle endócrino exercido por ecdisteróides. Alguns desvios desse enredo clássico se revelam, por exemplo, na possibilidade da existência de fontes alternativas de ecdisteróides além das glândulas

protorácicas e na descoberta de vias ecdisiotrópicas paralelas às do PTTH (Gilbert *et al.*, 2002).

3) *Apis mellifera* como modelo experimental

A abelha *Apis mellifera* (Holometabola, Hymenoptera, Apidae) possui um rico histórico como organismo experimental, tendo sido estudada sob perspectivas tão diferentes como a de um apicultor e a de um biólogo molecular. Tamanha notabilidade sobre a chamada “rainha dos insetos” se deve à sua natureza singular associada a interesses econômicos não apenas pelos recursos aproveitáveis das colméias (cera, mel, própolis, geléia real, pólen, entre outros), mas também por seu potencial agrícola polinizador (Winston, 2003). Além disso, representa um ícone dentre os chamados insetos eussociais, ou “verdadeiramente” sociais, caracterizados por três qualidades básicas: o cuidado com a cria, a divisão de trabalho reprodutiva e a sobreposição de pelo menos duas gerações (Wilson, 1971; Michener, 1974). Recentemente essa espécie esteve em evidência no cenário científico internacional com o anúncio do sequenciamento de seu genoma (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006).

A diferenciação do exoesqueleto de *Apis mellifera* ocorre essencialmente durante o período farato que precede a ecdise imaginal. Os processos progressivos de esclerotização e melanização da cutícula constituem um dos aspectos mais evidentes dessa etapa do desenvolvimento.

A ontogênese da abelha se desdobra na produção de três formas típicas de indivíduos adultos morfológica e funcionalmente diferentes: o zangão (macho), a rainha (fêmea reprodutiva) e a operária (fêmea infértil, porém com potencial reprodutivo)

(**Figura 4**). De um modo geral, as fêmeas são provenientes de ovos fecundados enquanto os machos são originados partenogeneticamente a partir de ovos não fertilizados. Rainhas e operárias se originam de larvas submetidas a regimes alimentares distintos, que resultam em padrões casta-específicos de regulação endócrina e expressão gênica (Hartfelder e Engels, 1998; Evans e Wheeler, 1999; Evans e Wheeler, 2000). É importante ressaltar que tal explicação simplificada para a diferenciação dos sexos e das castas nessas abelhas omite fenômenos extremamente complexos, muitos dos quais ainda não completamente elucidados, com diversas exceções ao caminho normal do desenvolvimento. Como alguns exemplos, pode-se citar os machos diplóides, as fêmeas partenogenéticas e as inter-castas (Winston, 2003).

Figura 4: Determinação dos sexos e das castas em *Apis mellifera*.

Os machos (zangões) se desenvolvem por partenogênese a partir de ovos não fecundados. As fêmeas se distinguem em duas castas (operária e rainha), as quais são determinadas por alimentação diferencial ainda durante o estágio larval.

Os diferentes estágios do desenvolvimento pré-imaginal das castas e sexos de *Apis mellifera* já foram caracterizados (Rembold *et al.*, 1980; Michelette e Soares, 1993; Nunes-Silva *et al.*, 2006; Tozetto *et al.*, 2007). Também são conhecidos os títulos de ecdisteróides que regem o último estágio larval das fêmeas (Rachinsky *et al.*, 1990) e o estágio pupal de fêmeas e machos (Feldlaufer *et al.*, 1985; Pinto *et al.*, 2002; Tozetto *et al.*, 2007).

Tal suporte tem servido de base para uma linha de pesquisa estabelecida no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas (Departamento de Biologia da FFCLRP – USP), da qual se ramifica o presente trabalho. Os estudos ali desenvolvidos visam à caracterização de fenoloxidasas e seus genes codificadores, com ênfase na variação da atividade enzimática e da expressão gênica durante a diferenciação do tegumento regulada pela flutuação do título de ecdisteróides. Com esse objetivo foi caracterizada uma tirosinase (Zufelato, 2004) assim como o gene que codifica sua proforma inativa (Lourenço, 2003). Tanto a atividade da enzima como a abundância do produto de transcrição gênica evidenciaram correlação com o grau de maturação cuticular, sugerindo um papel não usualmente atribuído às tirosinases na formação do exoesqueleto (Zufelato *et al.*, 2004; Lourenço *et al.*, 2005). A presença da proteína precursora, a profenoloxidase, foi confirmada em tegumentos cultivados *in vitro* (Colonello *et al.*, 2003). Também foram estabelecidos os perfis de proteínas estruturais do tegumento nas diversas fases que caracterizam o desenvolvimento farato do adulto (Santos *et al.*, 2001). Três genes codificadores de proteínas cuticulares foram identificados, seqüenciados e caracterizados (Soares, 2007; Soares *et al.*, 2007). Manipulações experimentais dos títulos hormonais foram realizadas com o objetivo de testar influências sobre a expressão de genes cuticulares e seus produtos. A aplicação de 20E na fase imediatamente anterior ao início da pigmentação cuticular resultou no adiamento da sucessão de mudanças no padrão de proteínas da epiderme, culminando em uma inibição parcial dos eventos de melanização (Zufelato *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2001).

É a essa temática que se insere a atual investigação de uma lacase (Lacase 2) e de seu gene codificador (*Amlac 2*) como possíveis protagonistas da complexa trama da construção do exoesqueleto adulto em *Apis mellifera*.

OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho envolve o estudo da morfogênese do tegumento adulto de *Apis mellifera*, em um contexto morfológico, fisiológico e genético.

Em particular, no campo da genômica funcional, foi proposta a investigação da estrutura, função e regulação do gene *Amlac 2*. Desse modo, procurou-se buscar evidências que melhor esclarecessem a participação da enzima Lacase 2 nos processos de melanização e esclerotização do exoesqueleto (*tanning* cuticular), tendo como foco o desenvolvimento adulto de abelhas operárias.

Mais especificamente, em caráter comparativo, planejou-se contrastar o exoesqueleto de diferentes regiões corporais com distintos graus de maturação, bem como o tegumento de operárias, rainhas e zangões no âmbito da diferenciação dos sexos e das castas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Material biológico

Pupas e adultos faratos de operárias, rainhas e zangões de *Apis mellifera* africanizada foram coletados no apiário experimental da Universidade de São Paulo (USP) – Campus Ribeirão Preto.

A identificação das diferentes fases do desenvolvimento farato se baseou nos trabalhos de Thompson (1978) e de Michelette e Soares (1993), cujos critérios levam em consideração os sucessivos graus de pigmentação dos olhos e do tórax.

2) Dissecção do tegumento

A porção dorsal do tegumento torácico e abdominal de pupas e adultos faratos em desenvolvimento foi dissecada e submetida a uma lavagem rápida em solução de Ringer (NaCl 0,17M; KCl 0,01M; CaCl₂ 0,003M), onde foram isolados, o quanto possível, de corpo gorduroso e músculos. Após isso foram então colocados imediatamente em Trizol (Invitrogen), com o número estipulado de 3 (rainhas e zangões) ou 6 (operárias) tegumentos por amostra.

As asas de operárias também foram utilizadas como fonte de tegumento de diferentes fases do desenvolvimento adulto farato. Nesse caso, após destacadas do corpo, as asas foram imediatamente incluídas em Trizol e homogeneizadas. Um total de 15 pares de asas anteriores foram adicionados em cada amostra.

Todo o material foi armazenado a -80°C , sendo assim estocado por no máximo 30 dias até sua utilização.

3) Ligadura abdominal

Em uma série de 3 experimentos independentes, um total de 240 pupas de operárias foram submetidas à ligadura abdominal. Para tanto, foram apoiadas ventralmente em suportes de plástico individuais e subordinadas a uma força de constrição permanente (exercida por um elástico ortodôntico) na zona corpórea que limita as regiões torácica e abdominal. Tal procedimento objetivou impedir a passagem de ecdisteróides endógenos provenientes das glândulas protorácicas para o abdome. Um grupo igualmente representado de pupas controle não sofreu nenhum tipo de intervenção. Todos os indivíduos foram mantidos em estufa a 34°C e 80 % de umidade relativa (condições similares às verificadas nas colméias) para que o desenvolvimento adulto farato pudesse ser acompanhado.

Indivíduos ligados e controles foram selecionados diariamente. Alguns tiveram as regiões torácica e abdominal separadas e homogeneizadas individualmente em Trizol para posterior estudo de expressão. Uma outra parcela foi encaminhada para a retirada de hemolinfa abdominal visando à quantificação de ecdisteróides por radioimunoensaio.

4) Radioimunoensaio para ecdisteróides

O Radioimunoensaio (RIA) representa um importante método analítico para a quantificação de ecdisteróides. Consiste essencialmente em um experimento de diluição de isótopos no qual ligantes marcados radioativamente e não-marcados competem por um mesmo sítio de ligação em uma proteína de alta afinidade (Reum e Koolman, 1989).

Após pequenas incisões laterais na parede do abdome de operárias (pupas e adultas faratas), a hemolinfa foi coletada com o auxílio de microcapilares, transferida para tubos Eppendorf e em seguida centrifugada (2000rpm a 4°C por 4 minutos) para remoção de hemócitos e de células do corpo gorduroso.

Para a extração dos ecdisteróides, a cada 2µl das amostras coletadas foram adicionados 200µl de metanol gelado (-20°C). Tais misturas foram vigorosamente agitadas e mantidas a 4°C por um tempo mínimo de 24 horas, quando foram então centrifugadas (7500rpm a 5°C por 10 minutos) para a remoção das proteínas precipitadas. Após transferência do sobrenadante para tubos de ensaio de vidro de 1,5ml, o solvente foi removido por evaporação em centrifugação a vácuo (sistema *Speed Vac*). Paralelamente, para a confecção da curva padrão, foram produzidas amostras em duplicata contendo de 25 a 2000 pg de 20E a partir de uma solução mãe de concentração 50pg/µl de metanol.

A cada amostra foram adicionados 100µl de solução de ecdisona marcada radioativamente (^3H -ecdisona com atividade de 5000-6500 cpm por 100µl de tampão borato 0,1M – ácido bórico 0,1M / tetraborato de sódio 0,1M / NaCl 0,075M / pH 8,4); bem como 100 µl de anti-soro específico contra ecdisona (produzido em coelhos e doado pelo Professor W. Bollenbacher – University North Carolina, Chapel Hill – contendo 0,05% de anticorpo específico e 10% de soro de coelho não imunizado – soro controle – em tampão borato 0,1M). Ao controle zero da curva padrão acrescentou-se 100µl de soro controle (10% de soro não imunizado em tampão borato 0,1M) com o intuito de verificar possíveis ligações inespecíficas. Ainda, um segundo controle foi preparado para a verificação do máximo de ligação, no qual estavam ausentes moléculas de 20E não marcadas. Todas as soluções preparadas foram agitadas vigorosamente, sendo os tubos armazenados a 4°C por aproximadamente 24 horas, quando efetivamente havia sido atingido o equilíbrio de ligação entre os ecdisteróides marcados ou não e os anticorpos específicos.

Para a separação dos complexos antígeno-anticorpo em relação aos antígenos livres, a todos os tubos foram adicionados 200µl de solução saturada de sulfato de

amônio, seguido de agitação, precipitação a 4°C por 30 minutos e centrifugação (7500rpm a 5°C por 15 minutos). Os sobrenadantes foram descartados por sucção utilizando-se bomba a vácuo. Esta seqüência de procedimentos foi repetida na lavagem do material por meio de ressuspensão em 400µl de solução de sulfato de amônio 50% em água destilada, precipitação, centrifugação e descarte do sobrenadante.

Adicionou-se aos precipitados 40µl de água destilada, em seguida transferindo-se todo o material para frascos de cintilação líquida, aos quais foram acrescentados 5 ml de líquido de cintilação (HiSafe 3 – Wallac-Packard). Por fim procedeu-se à contagem de emissões beta em espectrômetro de cintilação líquida (Beckman, LS 6000). As leituras obtidas foram lançadas em programa Excel, no qual foram convertidas em concentrações de 20E em pg/µl de hemolinfa.

5) Silenciamento gênico

O silenciamento gênico pós-transcricional (RNA de interferência – RNAi) consiste num mecanismo natural de regulação da expressão gênica em resposta ao RNA dupla-fita, ou dsRNA (Fire *et al.*, 1998; Hannon, 2002). Baseadas nesse fenômeno, técnicas moleculares foram desenvolvidas e utilizadas em diferentes tipos de organismos visando à manipulação experimental da expressão gênica.

Tendo em vista a produção de dsRNA codificador de Lacase 2, primeiramente foram desenhados *primers* específicos para um fragmento do gene *Amlac 2* a partir de *contigs* depositados no *GenBank* pelo *Baylor College of Medicine* (GB11321), aos quais foi adicionada a seqüência do promotor T7 (em negrito): **F: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAC TTC CGC AGG GTG TTG TAT** e **R: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAT GAG ACA GAT TCG GCT GTT 3'**. O fragmento escolhido, de aproximadamente 450 pb, foi amplificado por PCR nas seguintes

condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; seguida por 40 ciclos (desnaturação/anelamento/extensão) de 94°C, 30 segundos / 60°C, 45 segundos / 72°C, 50 segundos; e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto da reação foi purificado através do uso do *kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega). O dsRNA foi preparado por meio do *kit Ribo Max™ Large Scale RNA Production Systems* (Promega). O RNA dupla-fita produzido foi então extraído segundo o protocolo recomendado pelo fabricante do Trizol LS (Invitrogen). Por fim o dsRNA foi ressuspense em água livre de nucleases, aquecido por 1 minuto a 95°C e resfriado em temperatura ambiente.

Pupas de operárias foram injetadas com 2µl de solução (3µg/µl) de dsRNA *Amlac 2*, ou 2µl de solução (3µg/µL) de dsRNA *GFP - green fluorescent protein*, inexistente em *Apis mellifera* (controle do efeito do dsRNA), ou ainda 2µl de água livre de nucleases (controle do efeito da injeção). As injeções foram intra-abdominais, seguindo-se o mesmo procedimento utilizado por Amdam *et al.* (2003), e efetuadas com auxílio de uma seringa Hamilton. Um terceiro grupo controle (“branco”) não sofreu nenhuma intervenção.

As pupas foram acondicionadas em estufa a 34°C e 80% de umidade relativa para que o desenvolvimento adulto farato pudesse ser acompanhado. Como forma de validação do silenciamento do gene *Amlac 2*, indivíduos representantes de todos os grupos foram estocados isoladamente em Trizol por no máximo 30 dias para posterior extração de RNA e análise comparativa da abundância de transcritos codificadores da Lacase 2 por RT-PCR semi-quantitativa. Paralelamente foi realizada uma cuidadosa busca por evidências morfológicas resultantes do “nocaute” gênico que acusassem uma suposta função dessa enzima na diferenciação do tegumento.

6) Histologia do tegumento

Tegumentos de pupas e adultos de operárias, rainhas e zangões devidamente dissecados foram fixados por 24 horas a 4°C em solução de 4% de paraformaldeído em tampão fosfato (0,1M; pH 7,3). Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série de soluções de concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 95%), permanecendo 30 minutos em cada solução. Após a desidratação, os tegumentos foram infiltrados por 24 horas em solução metacrilato (Historesina Leica) e transferidos para fôrmas apropriadas contendo resina de polimerização (Historesina), onde permaneceram por mais 24 horas à temperatura ambiente. Após a secagem completa dos blocos, estes foram retirados das fôrmas para a realização de cortes histológicos de 5µm com navalhas de vidro. Os cortes foram montados em lâminas de vidro e deixados em estufa a 50°C por cerca de 2 horas. Após este período, as lâminas foram coradas com uma solução de azul de metileno e fucsina básica por 3 minutos, lavadas rapidamente em água destilada e seladas com lamínula em Entellan. Os cortes de tegumento foram então examinados e fotografados em microscópio óptico (Axioskop II, Zeiss).

7) Estudo de expressão por RT-PCR semiquantitativa

7.1) Extração do RNA total

O protocolo utilizado para essa etapa foi o recomendado pelo fabricante do Trizol, que consiste, resumidamente, em 4 passos principais: 1) tratamento com clorofórmio, separando a solução em uma fase orgânica rósea e outra aquosa transparente (contendo o RNA); 2) isolamento da fase aquosa e precipitação do RNA total através da adição de álcool isopropílico; 3) “lavagem” do material pelo uso de uma solução 75% de etanol em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC); e 4) ressuspensão do RNA isolado em água de DEPC para evitar degradação. As amostras

foram lidas em *Gene Quant* no intuito de quantificar o RNA e verificar possíveis impurezas e/ou contaminantes (Ausubel *et al.*, 1995). A partir da leitura a 260nm foi calculada a concentração de RNA total.

7.2) Síntese da primeira fita de cDNA por RT (*Reverse Transcription*)

Após tratamento com DNase I (desoxirribonuclease que digere DNA de fita simples ou dupla), a primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de uma quantidade padronizada de 6 µg de RNA total extraído de tegumento, utilizando-se o sistema de síntese da *SuperScriptTM II* (Invitrogen). Por este método, apenas a primeira fita do cDNA é sintetizada através de transcrição reversa (RT), utilizando-se *primer* Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5µg/µl), *SuperScriptTM II* (DNA polimerase que sintetiza DNA complementar a partir de RNA), e *RNase Out* (enzima inibidora de ribonucleases), seguindo-se as instruções sugeridas pelo fabricante.

7.3) Amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Para as amplificações por PCR (Applied Biosystems, geneAmp[®], PCR System 9700) foram utilizados os cDNAs sintetizados a partir do RNA total extraído de diferentes amostras e *primers* específicos para o gene *Amlac 2* (E: **5'** GGT ACG CAC TTC TGG CAC G e R: **5'** CGT CAT GAA ACC GGT GTT G **3'**) , desenhados a partir de *contigs* depositados no *GenBank* pelo *Baylor College of Medicine* (GB11321). As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; seguida por 30 ciclos (desnaturação/anelamento/extensão) de 94°C, 30 segundos / 58°C, 45 segundos / 72°C, 50 segundos; e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A reação foi realizada com 1µl de cada *primer* (10µM), 1µl de cDNA, 12,5µl de *Eppendorf Master Mix 2,5x* [contendo: *Taq DNA Polymerase* 1.25U; 50 mM KCl; 30mM Tris-HCl (pH 8,3); 1,5 mM MgCl₂; 0,1% Igepal-CA630; 200µM de cada dNTP (dTTP; dATP; dGTP e dCTP)]; totalizando um volume de 25µl com água bidestilada e autoclavada. O

controle da amplificação foi realizado utilizando-se *primers* específicos para um gene codificador de actina de *Apis mellifera*, de expressão constitutiva (Lourenço *et al.*, 2008), *Amact* (AB023025) (F: 5' TGC CAA CAC TGT CCT TTC TG 3' e R: 5' AGA ATT GAC CCA CCA ATC CA 3'). Neste caso, as condições de amplificação seguiram os mesmos padrões das usadas para *Amlac 2*, com exceção dos valores específicos para a temperatura de anelamento dos *primers* (62° C) e do número de ciclos (27).

É importante ressaltar que o número de ciclos das reações de amplificação, tanto de *Amlac 2* como de *Amact*, foi testado e definido de modo a evitar saturação.

7.4) Análise por eletroforese em agarose 1%

O cDNA amplificado por PCR foi analisado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (0,01µl/ml de gel de agarose) em tampão 1x TBE (0,45M Tris Base; 0,45M Ácido Bórico; 0,5M EDTA, pH 8,0). Após a eletroforese, cada gel foi visualizado digitalmente com o uso de um foto-documentador KODAK EDAS 290. Um marcador de peso molecular com intervalo de 100 pares de base foi utilizado em uma das pistas de cada gel.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

1) Categorização do material biológico

A ecdise tem sido convenientemente utilizada na delimitação dos diferentes estágios de vida em Holometabola por consistir em um evento súbito, definido e facilmente identificável. A apólise, no entanto, tem sido negligenciada neste propósito, apesar de sua importância na caracterização do estado ontogenético do organismo. A utilidade desses dois processos na definição de *instar* em insetos foi amplamente discutida por H.E. Hinton e V.B. Wigglesworth em uma das mais intrigantes controvérsias da Entomologia (Hinton, 1971, 1973; Wigglesworth, 1973). Enquanto o primeiro considerou a apólise como um marco entre os diferentes estágios, o último manteve a terminologia de Lineu e delimitou o *instar* pela ecdise.

A metamorfose da abelha *Apis mellifera* já foi investigada em diferentes épocas sob diversas abordagens (Bertholf, 1925; Oertel, 1930; Myser, 1954; Snodgrass, 1956; Jay, 1963; Thompson, 1978; Rembold *et al.*, 1980; Michelette e Soares, 1993; Nunes-Silva *et al.*, 2006). Entretanto, há ainda certa confusão a respeito da terminologia do ciclo de vida e da descrição da condição ontogenética em estudos do desenvolvimento.

Algumas revisões sobre a metamorfose de *Apis mellifera* foram analisadas no que diz respeito à utilização dos eventos de apólise e de ecdise como marcos do desenvolvimento, bem como ao uso da nomenclatura “pré-pupa” ou “pupa farata” (**Tabela I**). Embora a apólise tenha sido relativamente mencionada nos trabalhos em questão (coluna A), sua importância na ontogênese tem sido sistematicamente desprezada (coluna A*). O mesmo não acontece com a ecdise, a qual é bem aceita como marco do desenvolvimento (colunas E e E*). Como exceções, Snodgrass (1956) e Thompson (1978) reconheceram a importância de ambos os processos. A tabela também mostra que o termo “pré-pupa”

absolutamente tem prevalecido sobre o alternativo “pupa farata”, com exceção de Thompson (1978), que optou por esse último. Particularmente, Jay (1963) definiu ambos os termos como sinônimos, mas optou pelo uso da nomeação “pré-pupa”.

Tabela I: Reconhecimento dos eventos de apólise e ecdise e utilização da terminologia “pré-pupa” ou “pupa farata” em estudos da metamorfose de *Apis mellifera*. As colunas **A** (Apólise) e **E** (Ecdise) indicam se estes eventos foram mencionados (+) ou não (-) nos respectivos trabalhos. As colunas **A*** e **E*** indicam se estes eventos foram considerados (+) ou não (-) como marcos do desenvolvimento.

Referência	Apólise		Ecdise		Pré-pupa	Pupa farata
	A	A*	E	E*		
Bertholf (1925)	+	-	+	+	+	-
Oertel (1930)	+	-	+	+	+	-
Myser (1953)	+	-	+	+	+	-
Snodgrass (1956)	+	+	+	+	+	-
Jay (1963)	-	-	+	+	+	-
Thompson (1978)	+	+	+	+	-	+
Rembold et al. (1980)	+	-	+	+	+	-
Michelette e Soares (1993)	+	-	+	+	+	-
Nunes-Silva et al. (2006)	-	-	+	+	+	-

Devido à recorrente inconsistência na terminologia utilizada na descrição da metamorfose de *Apis mellifera* e à latente necessidade de uma categorização biológica em estudos do desenvolvimento, é proposta no presente trabalho a distinção de dois conceitos ontogenéticos: 1) o estágio de vida (larval, pupal ou imaginal), que compreende o intervalo de tempo entre duas ecdises e é definido pelo tipo de cutícula em contato com o ambiente externo; e 2) o estado ontogenético (larva, pupa ou adulto), ou *instar*, que corresponde ao

organismo em diferenciação e é definido pelo tipo de cutícula aderida à epiderme, sendo assim delimitado pelos eventos de apólise (**Figura 5**).

Figura 5: Metamorfose da abelha *Apis mellifera*.

- (A) Estágios de vida (larval, pupal e imaginal), definidos pelo tipo de cutícula em contato com o ambiente externo, cada um compreendendo o intervalo de tempo entre ecdises (pontas de seta).
- (B) Estado ontogenético (larva, pupa e adulto), definido pelo tipo de cutícula aderida à epiderme e delimitado pelos eventos de apólise (setas). A fase farata situa-se entre a apólise e a ecdise e representa o ciclo de muda (período morfogenético no qual a nova forma de vida se diferencia ainda sob a cutícula do *instar* anterior).
- (C) Documentação de operárias em vista lateral (larva e pupas faratas) e dorsal (pupa, adultos faratos e adulto).
- (D) Representações esquemáticas de adultos faratos com os atributos de identificação (modificado de Costa *et al.*, 2006). Da esquerda para a direita: pigmentação dos olhos (leve, intermediária e forte) e pigmentação do dorso do tórax (leve, intermediária e forte).

Conveniências à parte, em estudos do desenvolvimento se faz necessária uma categorização condizente com a realidade ontogenética do organismo. Dada a relevância de ambos os processos, tanto a apólise quanto a ecdise devem servir como referências em tal propósito.

Ainda, o termo “pré-pupa” é impróprio e deve ser substituído por “pupa farata”. Essa fase do desenvolvimento corresponde a uma sub-divisão ontogenética da pupa, e não da larva de último *instar*. O entomologista R.E. Snodgrass, respeitável autoridade no

assunto, escreveu na página 9 de seu livro *“Anatomy of the honey bee”* (1956) a seguinte afirmação: *“The so-called propupa, ..., is merely the pupa in its early developmental stages within the moulted skin of the larva”*. Um pouco mais tarde, o mesmo autor reitera o conceito em um glossário de termos entomológicos (Snodgrass, 1960): *“The pharate stage of the pupa is quite incorrectly called the ‘prepupal stage of the larva’, since in this case the insect ceased to be a larva with the moult to the pupa.”* (Obs: “molting”, nesse caso, é o termo que o autor utilizava para designar a apólise, e não a ecdise).

O desenvolvimento do adulto farato, o qual ocorre durante o estágio pupal entre a apólise e a ecdise imaginal, incorpora a diferenciação do tegumento e é um alvo estratégico em nossa análise dos processos e componentes envolvidos na maturação cuticular.

2) Morfogênese do tegumento adulto

O tegumento dorsal torácico e abdominal de pupas e adultos faratos foi dissecado e submetido a preparações convencionais para análise em microscopia óptica (**Figura 6**). Tendo como ponto de partida o tegumento da pupa (**Figura 6A**), as preparações seguintes mostram que a diferenciação do tegumento adulto ocorre essencialmente durante o desenvolvimento farato, período em que são observadas todas as etapas características do ciclo de muda. Após a apólise, ou desprendimento da cutícula pupal (**Figura 6B**), a epiderme se reorganiza por proliferação celular e pseudo-estratificação e inicia a síntese do exoesqueleto imaginal (**Figura 6C**). Em seguida, é observado um período de deposição cuticular que coincide com o intervalo de pigmentação dos olhos (**Figura 6D e 6E**). Essa etapa é então sucedida por um período de diferenciação cuticular, marcado pela melanização e pela intensificação do processo de esclerotização (**Figura 6F a 6J**).

Figura 6: Morfogênese do tegumento adulto de operárias de *Apis mellifera*

Preparações totais em glicerol e cortes sagitais do tegumento torácico dorsal e do tergito do terceiro segmento abdominal. Os cortes sagitais (5 µm) foram corados com solução de azul de metileno e fucsina básica. **A:** tegumento pupal; **B:** apólise; **C:** reorganização epidérmica e início da síntese da cutícula do adulto; **D/E:** deposição da cutícula do adulto; **F:** primeiros indícios de pigmentação na cutícula torácica (setas); **G:** primeiros indícios de pigmentação na cutícula abdominal (setas); **H/I:** intensificação do *tanning* cuticular; **J:** tegumento do adulto recém-emergido da célula de cria. **cp** (cutícula da pupa); **ca** (cutícula do adulto); **ep** (epiderme); **mus** (músculo); **cg** (corpo gorduroso).

Pode-se dividir o período farato em duas fases distintas (uma de síntese e outra de diferenciação cuticular), com base no próprio padrão morfogenético do tegumento. Duas ou mais subdivisões de cada um desses períodos podem ou não ser utilizadas, dependendo da conveniência, levando-se em consideração a gradação de cor característica da pigmentação dos olhos e do corpo, respectivamente.

Nota-se que a cutícula que recobre o abdome é menos espessa, menos escura e se diferencia mais lentamente que aquela que reveste o tórax. Uma possível explicação é que a estrutura do exoesqueleto associada ao vôo possui seletivamente um acentuado grau de diferenciação (melanização e esclerotização), dada a importância da robustez dessa região no suporte dos movimentos alares (Andersen *et al.*, 1981). Além disso, há diferenças ontogenéticas entre a epiderme torácica e a abdominal, e consequentemente entre as cutículas por elas secretadas. Em *Drosophila melanogaster*, por exemplo, existem precursores epidérmicos distintos para o tórax (discos imaginais) e para o abdome (ninhos de histoblastos) (Fristrom e Fristrom, 1993).

O trabalho de Thompson (1978), de especial relevância, fornece uma descrição do desenvolvimento do exoesqueleto adulto em *Apis mellifera adansonii*. Segundo ele, o processo completo de apólise, que ocorre da região anterior para a posterior, dura aproximadamente 15 horas. Dessa forma, tal evento pode ser utilizado como referência na escala ontogenética, a qual em geral é medida em dias! Também constatou que a cutícula abdominal se diferencia mais lentamente e menos intensamente que a torácica. Entretanto, o artigo é pobre quanto à documentação das modificações sofridas pelo tegumento, contendo apenas algumas representações esquemáticas.

Myser (1954) já havia apresentado uma cuidadosa análise histológica e morfológica da larva e da pupa, porém não investigou a diferenciação do adulto e tampouco focou seus estudos no tegumento.

3) Identificação e caracterização do gene *Amlac 2*

O cDNA parcial utilizado nas investigações subseqüentes foi isolado por transcrição reversa a partir de amostras de RNA total extraído de tegumentos de pupas e adultos faratos e amplificado por PCR utilizando-se *primers* específicos para o gene *Amlac 2* (**Figura 7**).

Figura 7: Identificação do gene *Amlac 2*.

A: Representação esquemática do gene *Amlac 2*. *Exons* e *introns* são indicados por caixas e linhas, respectivamente, cada qual com o número de nucleotídeos correspondente. Em destaque, a região codificadora do cDNA de trabalho, formado por uma grande porção do terceiro *exon* e uma pequena parte do quarto. A seta indica a direção da transcrição, sendo mostrados os códons de início e de término. A arquitetura do gene foi obtida utilizando-se as seqüências do genoma publicado de *Apis mellifera* (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee>) e a plataforma *Artemis 7* (Rutherford *et al.*, 2000).

B: Validação do cDNA de trabalho (273 pb) por sequenciamento gênico parcial. Os *primers* específicos para este fragmento estão sublinhados.

C: RT-PCR semi-quantitativa visualizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando o cDNA parcial *Amlac 2*.

(M- marcador de peso molecular com intervalo de 100 pares de bases).

4) Transcrição diferencial de *Amlac 2*

A transcrição do gene *Amlac 2* foi analisada no tegumento de pupas e adultos faratos, através da avaliação da abundância relativa de transcritos por RT-PCR semi-quantitativa. Também foram contrastados tegumentos provenientes de diferentes regiões do corpo (tórax, asas e abdome) (**Figura 8**).

Figura 8: Transcrição diferencial de *Amlac 2* no tegumento de *Apis mellifera*.

Transcritos codificadores de Lacase 2 em amostras de tegumentos do dorso do tórax, das asas anteriores e do dorso do abdome, em pupas e adultos faratos. A seta indica a apólise. RT-PCR semi-quantitativa visualizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A transcrição do gene *Amact* (codificador de actina em *Apis mellifera*) foi utilizada como controle da amplificação devido ao seu padrão constitutivo característico.

O perfil transcricional gerado evidenciou correspondência com os processos de diferenciação do tegumento. Há o predomínio de transcritos no período farato. A transcrição atinge seus níveis mais elevados ainda durante a pigmentação dos olhos, mantém-se alta na fase de diferenciação cuticular e se atenua nas vésperas da ecdise. Um padrão de transcrição similar já foi caracterizado para o gene *Mslac 2*, do Lepidoptera *Manduca sexta* (Dittmer *et al.*, 2004), e para o gene *Tclac 2*, do Coleoptera *Tribolium castaneum* (Arakane *et al.*, 2005). Tais investigações, porém, não abrangeram tegumentos provenientes de diferentes regiões do corpo.

Embora o perfil geral de variação de transcritos de *Amlac 2* seja semelhante entre as três regiões do corpo estudadas, nota-se um relativo atraso no início da transcrição desse gene no tegumento abdominal.

Tais resultados de transcrição diferencial de *Amlac 2*, tanto no tempo como no espaço, evidenciam fortemente uma relação entre a ação da enzima Lacase 2 e a diferenciação do exoesqueleto imaginal.

5) Ligadura Abdominal: bloqueio na diferenciação do tegumento

Os eventos que levam à formação da cutícula do adulto mostram sintonia com a oscilação do título de ecdisteróides na hemolinfa, o qual, em *Apis mellifera*, atinge um pico característico na primeira metade do período farato, e depois declinam novamente em direção a níveis basais (Feldlaufer *et al.*, 1985; Pinto *et al.*, 2002). A variação de transcritos de *Amlac 2* no tegumento em diferenciação sugeriu uma possível regulação da expressão desse gene exercida por ecdisteróides. Tal hipótese foi testada por meio de um procedimento denominado ligadura abdominal, que permitiu a avaliação da transcrição de *Amlac 2* num ambiente supostamente livre da presença desses hormônios: o abdome ligado, ou seja, separado das regiões anteriores (tórax e cabeça) por meio de uma constrição (**Figura 9**).

Figura 9: Inibição temporária da transcrição de *Amlac 2* em abdômes ligados.

Análise da abundância de transcritos codificadores de Lacase 2 no tórax e no abdome de adultos faratos controles (C) e submetidos a ligadura abdominal (L). A transcrição foi analisada do primeiro ao sexto dia (1 a 6) após ligadura na fase de pupa. Os resultados dispostos nas porções superior e inferior da figura foram gerados em dois experimentos independentes. RT-PCR semi-quantitativa visualizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A transcrição do gene *Amact* (codificador de actina em *Apis mellifera*) foi utilizada como controle da amplificação devido ao seu padrão constitutivo característico.

O procedimento de ligadura resultou na inibição da transcrição de *Amlac 2* em abdômes ligados, fato que sugere uma possível regulação por ecdisteróides. Para nossa surpresa, esse quadro não se manteve e os níveis de transcritos aumentaram consistentemente após o quinto ou o sexto dia de experimento. Dessa maneira, foi observado um atraso no início da transcrição de *Amlac 2* (inibição temporária), mas não uma repressão permanente desse gene. Já os níveis de transcritos codificadores de Lacase 2 no tórax de indivíduos ligados foram semelhantes aos controles e também àqueles detectados no tegumento de adultos faratos (**Figura 8**).

Foi de nosso interesse também investigar os possíveis efeitos morfológicos da ligadura abdominal na diferenciação do tegumento. Para tanto, o desenvolvimento farato de adultos ligados foi cuidadosamente acompanhado até o décimo dia após a ligadura em comparação com adultos não ligados (controles). Indivíduos de ambos os grupos foram documentados e suas cutículas analisadas em microscópio óptico (**Figura 10**). Foi observada uma nítida inibição da intensificação da esclerotização e do início da pigmentação cuticular no tegumento de abdômes ligados.

Figura 10: Inibição da diferenciação do tegumento em abdômes ligados.

Dois adultos faratos controles (esquerda) e dois ligados (direita) foram documentados em vista dorsal no décimo dia após ligadura abdominal. Também foram produzidas lâminas semi-permanentes em glicerol contendo preparações totais da região central do tegumento torácico dorsal e da região terminal do tegumento abdominal dorsal de ambos os grupos, visualizadas por foto-microscopia óptica. A intensificação da esclerotização e o início da pigmentação cuticular foram inibidos no tegumento de abdômes ligados.

Como forma de verificar se houve ou não um bloqueio efetivo à passagem de ecdisteróides do tórax para o abdome, decorrente do procedimento de ligadura, amostras individuais de hemolinfa abdominal de adultos faratos controles e ligados foram submetidas à radioimunoensaio (RIA) (**Figura 11**).

Figura 11: Redução do título de ecdisteróides em abdomes ligados.

Título de ecdisteróides (em pg/μl) na hemolinfa de adultos faratos controles (em preto) e ligados (em vermelho) do primeiro ao sexto dia após procedimento de ligadura. Amostras individuais de hemolinfa abdominal foram submetidas a RIA para dosagem de ecdisteróides. Pontos, barras e parênteses representam, respectivamente, as médias, erros padrões e tamanhos amostrais. Os asteriscos marcam as diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos para o segundo e o terceiro dias de investigação (teste *t* de Student, $p < 0,05$). Os dados foram analisados com auxílio do programa BioEstat 4.0 (Ayres *et al.*, 2005).

Os resultados do RIA mostraram níveis de ecdisteróides significativamente reduzidos na hemolinfa de abdomes ligados durante o segundo e o terceiro dia de análise, confirmando um bloqueio efetivo à passagem de ecdisteróides endógenos provenientes das glândulas protorácicas em direção ao abdome. De modo intrigante, um aumento gradativo da concentração hormonal foi detectado a partir do terceiro dia após a ligadura. Desse modo, ao contrário do esperado, níveis permanentemente baixos de ecdisteróides em abdomes submetidos à ligadura não foram mantidos.

Em resumo, três efeitos claros foram observados nos abdômes ligados: a inibição do aumento do título de ecdisteróides até o terceiro dia após a ligadura, a inibição temporária da transcrição do gene *Amlac 2* e a repressão da diferenciação cuticular. Se todos esses eventos estão relacionados, direta ou indiretamente, não podemos afirmar com plena confiança. Entretanto, os resultados apresentados reforçam fortemente nossa idéia de que o gene *Amlac 2* é regulado de alguma forma por ecdisteróides, e que a enzima por ele codificada participa da diferenciação do exoesqueleto adulto.

6) Um novo modelo endócrino para a diferenciação do adulto em *Apis mellifera*

Procedimentos de constrição ou isolamento de partes do corpo por meio de ligadura (entre a cabeça e o tórax ou entre o tórax e o abdome) foram largamente utilizados durante a formulação do dogma central da Endocrinologia de insetos, que estabeleceu o controle exercido pelas regiões anteriores (cérebro e glândulas protorácicas) sobre as porções posteriores do corpo durante os processos de muda e metamorfose (Kopeck, 1922; Fraenkel, 1935; Williams, 1952).

Alguns trabalhos, entretanto, questionam a supremacia das glândulas protorácicas como única fonte de ecdisteróides, particularmente no que diz respeito ao desenvolvimento imaginal (Chadwick, 1955; Nakanishi *et al.*, 1972; Hsiao *et al.*, 1976; Handler, 1982; Delbecque *et al.*, 1990; Martau e Romer, 1998; Gilbert *et al.*, 2002). Ainda que haja exceções ao cenário endócrino historicamente aceito, as fontes alternativas de ecdisteróides têm sido tratadas como fenômenos fisiológicos marginais.

Evidências contrárias à concepção clássica foram demonstradas em diferentes espécies de insetos. Em *Manduca sexta*, durante o desenvolvimento farato do adulto, foram detectadas quantidades crescentes de ecdisteróides em abdômes ligados que,

embora com certo atraso, atingiam níveis tão altos quanto os controles (Sakurai *et al.*, 1991). Em *Tenebrio molitor*, abdômes isolados não só produzem um pico de ecdisteróides como também atingem um padrão normal de morfogênese do tegumento adulto, o que sugere uma contribuição efetiva da fonte hormonal alternativa ao desenvolvimento imaginal (Delbecque *et al.*, 1978).

Em *Apis mellifera*, Hartfelder (1993) caracterizou as glândulas protorácicas como principal, senão exclusiva, fonte de ecdisteróides ao menos até a muda metamórfica. No entanto, em diversos holometábolos tais glândulas degeneram durante ou logo após a muda metamórfica e provavelmente não são as únicas fontes responsáveis pelas altas taxas de ecdisteróides características do período de diferenciação do adulto (Blazsek *et al.*, 1975; Glitho *et al.*, 1979; Dai e Gilbert, 1991 e 1997).

Em revisão de Delbecque *et al.* (1990), foram apresentados locais alternativos de produção de ecdisteróides sugeridos por diferentes autores. Dentre eles se encontram as gônadas (ovários e testículos), já bem aceitas como órgãos de síntese desses hormônios em processos reprodutivos inerentes ao estágio adulto. No desenvolvimento farato, pelo contrário, são poucos os candidatos e muitas as incertezas.

Jenkins *et al.* (1992) demonstraram síntese *de novo* de ecdisteróides em abdômes de *Aedes aegypti* cultivados *in vitro* e sugeriram a existência de uma fonte abdominal desses hormônios homogeneamente distribuída. Romer *et al.* (1974) detectaram biossíntese *in vitro* de ecdisona radioativa a partir do precursor marcado (^{14}C – Colesterol) em enócitos de *Tenebrio molitor*. O mesmo resultado foi obtido a partir de experimento equivalente em *Musca domestica* (Studinger e Willig, 1975). Além disso, algumas características ultra-estruturais dessas células, além de se modificarem em sintonia ao ciclo de muda, lembram aquelas das unidades produtoras de hormônios

esteróides em vertebrados (Romer, 1974). Tais referências fazem dos enócitos os principais suspeitos do surpreendente aparecimento de ecdisteróides em abdômes ligados, evento ocorrido em nossa atual investigação.

Os enócitos têm origem ectodérmica e são encontrados em todos os estágios pós-embrionários da maioria dos insetos. Em geral se associam às células epidérmicas na formação de unidades glandulares exócrinas responsáveis pela secreção de lipídios e hidrocarbonetos na cutícula (Noirot e Quennedey, 1974; Cruz-Landim e Abdalla, 2002). Em *Apis mellifera* os enócitos são formados durante o estágio embrionário na região dos segmentos abdominais e persistem por todo o período pré-imaginal, ao fim do qual são destruídos e substituídos por outros, originados da epiderme abdominal do adulto (Snodgrass, 1956).

Finalmente, com base nos intrigantes efeitos decorrentes de nosso experimento de ligadura abdominal e nas evidências geradas em outros estudos mencionados nesse tópico, propomos uma complementação do modelo endócrino tradicional para explicar a oscilação do título de ecdisteróides durante a diferenciação do adulto em *Apis mellifera*. Em nosso modelo, glândulas protorácicas e enócitos seriam co-responsáveis pelo título de ecdisteróides vigente nessa etapa do desenvolvimento. As glândulas protorácicas corresponderiam à fonte anterior e atuariam principalmente na primeira metade do período farato. Uma fonte posterior alternativa (representada pelos enócitos) iniciaria a secreção *de novo* de ecdisteróides assim que os níveis hormonais provenientes das primeiras entrassem em declínio, havendo, portanto, uma sobreposição de títulos que explicaria o amplo aspecto da curva de ecdisteróides característica deste período. A influência de cada uma dessas fontes na determinação dos níveis hormonais dependeria, dessa forma, da fase do desenvolvimento (**Figura 12**).

Figura 12: Modelo endócrino proposto para a diferenciação do adulto em *Apis mellifera*

A: Modelo endócrino clássico, no qual as glândulas protorácicas (em preto) representam a única fonte de ecdisteróides, sendo assim totalmente responsáveis pelo amplo título desses hormônios (curva em preto), característico do desenvolvimento do adulto.

B: Modelo complementar. Nesse caso são consideradas duas fontes de ecdisteróides: uma anterior (em azul), representada pelas glândulas protorácicas, e outra posterior (em verde), representada pelo conjunto de enócitos abdominais. As glândulas protorácicas atuam basicamente na primeira metade do período farato (curva em azul), sendo gradativamente substituídas pelos enócitos (curva em verde) na síntese e secreção de ecdisteróides. A sobreposição dos títulos gerados por essas duas fontes resultaria no aspecto típico da curva desses hormônios durante o desenvolvimento imaginal (curva em preto).

Com o modelo proposto é possível explicar os efeitos observados no experimento de ligadura abdominal. O aumento do título de ecdisteróides detectado em abdômes ligados (**Figura 11**) seria proveniente dos enócitos. Tal aumento ativaria, mesmo que tardiamente, a transcrição do gene *Amlac 2* no tegumento abdominal (**Figura 9**). A alteração do padrão temporal desses dois eventos teria como consequência a inibição da diferenciação cuticular no abdome de indivíduos ligados (**Figura 10**).

Obviamente trata-se apenas de um modelo teórico, o qual precisa ser testado para obter validade na compreensão do cenário endócrino que governa a diferenciação do adulto em *Apis mellifera*.

7) Silenciamento gênico pós-transcricional de *Amlac 2*

Desde a descoberta dos efeitos produzidos pelo RNA fita dupla (dsRNA) sobre a expressão gênica (Fire *et al.*, 1998), esta molécula tem sido experimentalmente utilizada no silenciamento pós-transcricional de diversos genes em diferentes espécies (Hannon, 2002), incluindo *Apis mellifera* (Beye *et al.*, 2002; Amdam *et al.*, 2003). A injeção de dsRNA codificador de Lacase 2 em *Tribolium castaneum* comprometeu o *tanning* cuticular e evidenciou uma importante contribuição dessa enzima na esclerotização e pigmentação da cutícula do besouro (Arakane *et al.*, 2005).

Com o objetivo de acumular evidências do papel da enzima Lacase 2 na diferenciação do exoesqueleto adulto de *Apis mellifera*, dsRNA*Amlac2* foi produzido e injetado em pupas. Paralelamente, três grupos controle foram preparados: pupas injetadas com dsRNA*GFP* (controle do efeito do RNA fita dupla), pupas injetadas com água (controle do efeito da injeção) e pupas que não sofreram nenhuma intervenção (grupo Branco). Ao longo do experimento, adultos faratos em diferentes fases do desenvolvimento, previamente injetados com dsRNA*Amlac2* e seus respectivos controles, foram documentados e submetidos à verificação da abundância de transcritos codificadores de Lacase 2, na tentativa de validar o silenciamento (**Figura 13**). Após essa legitimação, o fenótipo dos indivíduos efetivamente “silenciados” foi comparado com o dos indivíduos controles por meio de documentação fotográfica (**Figura 14**) e pela investigação histológica do tegumento (**Figura 15**).

Figura 13: Validação do silenciamento pós-transcricional de *Amlac 2*.

A abundância de transcritos codificadores de Lacase 2 foi verificada em três diferentes etapas do desenvolvimento farato nos quatro grupos produzidos no experimento de silenciamento de *Amlac 2*, num total de 12 amostras independentes para cada grupo. **B:** grupo Branco, sem nenhuma intervenção; **H₂O:** grupo injetado com água; **GFP:** grupo injetado com dsRNAGFP; **Lac:** grupo injetado com dsRNA*Amlac 2*. RT-PCR semi-quantitativa visualizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A transcrição do gene *Amact* (codificador de actina em *Apis mellifera*) foi utilizada como controle da amplificação devido ao seu padrão constitutivo característico.

Dos doze indivíduos selecionados para análise da transcrição pós-silenciamento de *Amlac 2*, sete apresentaram redução substancial da abundância de transcritos codificadores de Lacase 2, refletindo sucesso do silenciamento gênico em cerca de 60% dos casos. A proporção de indivíduos “silenciados” foi considerada satisfatória, dada a dificuldade experimental imposta pela metodologia e a observação corriqueira de insucessos relacionados a esse tipo de manipulação genética.

Figura 14: Efeitos fenotípicos do silenciamento gênico pós-transcricional de *Amlac 2* no desenvolvimento farato do adulto.

Contraste entre o fenótipo de adultos faratos efetivamente “silenciados” para o gene *Amlac 2* e controles não “silenciados”. A documentação foi realizada em três etapas do desenvolvimento farato após injeção de dsRNA na fase pupal. Alguns indivíduos foram documentados tanto em vista dorsal como em vista ventral. As setas apontam para a região das asas (notar diferenças na pigmentação)

B: grupo Branco, sem nenhuma intervenção

H₂O: grupo injetado com água

GFP: grupo injetado com dsRNA_{GFP}

Lac: grupo injetado com dsRNA_{*Amlac 2*}

Figura 15: Efeitos fenotípicos do silenciamento gênico pós-transcricional de *Amlac 2* na diferenciação do exoesqueleto adulto.

Cortes sagitais (5 μm) do tegumento torácico dorsal e do tergito do terceiro segmento abdominal. Preparações coradas com azul de metileno e fucsina básica. **B:** grupo Branco, sem nenhuma intervenção; **H₂O:** grupo injetado com água; **GFP:** grupo injetado com dsRNA*GFP*; **Lac:** grupo injetado com dsRNA*Amlac 2*. **cut** (cutícula); **ep** (epiderme); **mus** (músculo); **cg** (corpo gorduroso).

Um panorama geral dos efeitos fenotípicos do silenciamento gênico de *Amlac 2* pode ser verificado na **Figura 16**.

Figura 16: Panorama geral do silenciamento gênico pós-transcricional de *Amlac 2*.

Estudo individual de dois adultos, um controle (esquerda) sem nenhuma intervenção e outro injetado com dsRNA*Amlac 2* na fase de pupa (direita), no momento da emergência do controle.

A: Documentação fenotípica e validação do silenciamento por análise da abundância de transcritos codificadores de Lacase 2 utilizando-se RT-PCR semi-quantitativa.

B: Cortes sagitais (5 μ m) do tegumento torácico dorsal (superior) e do tergito do terceiro segmento abdominal (inferior) corados com azul de metileno e fucsina básica.

C: Detalhe de estruturas do tegumento abdominal: glândula tegumentar (superior) e extremidade posterior do tergito do terceiro segmento (inferior).

O silenciamento gênico pós-transcricional de *Amlac 2* provocou o comprometimento da melanização e da esclerotização cuticulares e a não conclusão do ciclo de muda, efeitos que influenciaram drasticamente a viabilidade dos adultos.

No entanto, ao contrário do esperado, foram detectados efeitos inespecíficos da molécula de dsRNA, revelados através da condição fenotípica dos indivíduos injetados com dsRNA*GFP*, em geral intermediária entre os injetados com *dsRNAAmlac 2* e os demais controles. Ao que tudo parece, a resposta do organismo à simples presença de um RNA fita dupla, independente da sequência nucleotídica, compromete o desenvolvimento geral. Não é por acaso que os mecanismos acionados por uma molécula de dsRNA dentro de um organismo são chamados, pelos estudiosos desse tema, de sistema imune molecular (Bagasra e Prilliman, 2004), o qual pode provocar respostas tão acentuadas quanto as observadas em uma infecção bacteriana ou virótica.

Apesar dos efeitos inespecíficos do dsRNA, a investigação histológica do tegumento revelou claramente uma má formação da cutícula em indivíduos injetados com dsRNA*Amlac 2*, com alterações principalmente em sua espessura e arquitetura. Nesse caso, as conseqüências verificadas podem ser consideradas decorrentes exclusivamente da eventual ausência da enzima Lacase 2 (efeito específico), uma vez que não foram observadas alterações cuticulares drásticas no grupo injetado com dsRNA*GFP*.

Tais resultados evidenciam uma importante contribuição da enzima Lacase 2 na diferenciação do exoesqueleto adulto em *Apis mellifera*, fenômeno esse fundamental na ontogênese plena da abelha.

8) Análise comparativa entre as castas e os sexos

Tanto a diferenciação de castas como de sexos correspondem a manifestações ontogenéticas denominadas polifenismos, por representarem variações fenotípicas intraespecíficas e descontínuas. Todo polifenismo consiste em um desvio no fenótipo potencialmente influenciado pelo ambiente e pelo genótipo. O dimorfismo sexual é um exemplo típico na natureza, bem como a metamorfose em Holometabola e as castas dentre os insetos sociais, entre outros (para revisões em insetos, ver Nijhout, 1999; Evans e Wheeler, 2001; e Hartfelder e Emlen, 2005).

No intuito de investigar uma eventual condição polifênica relacionada à morfogênese do exoesqueleto adulto em *Apis mellifera*, alguns dos procedimentos experimentais já descritos para as operárias foram utilizados também para rainhas e zangões.

O tegumento do adulto recém-emergido da célula de cria foi analisado por meio de preparações histológicas convencionais para microscopia óptica (**Figura 17**). Ainda, o perfil transcricional de *Amlac 2* foi analisado por RT-PCR semi-quantitativa a partir de amostras de RNA total extraído do tegumento de pupas e adultos faratos em diferentes fases do desenvolvimento (**Figura 18**).

Figura 17: Análise histológica comparativa do tegumento

Preparações totais em glicerol e cortes sagitais do tegumento torácico dorsal e do tergito do terceiro segmento abdominal de zangões (acima) e rainhas (abaixo) recém-emergidos da célula de cria. Os cortes sagitais (5 µm) foram corados com solução de azul de metileno e fucsina básica.

ct (cutícula); **ep** (epiderme)

Figura 18: Análise comparativa da transcrição de *Amlac 2*

Abundância de transcritos codificadores de Lacase 2 em amostras de tegumentos dorsais torácicos e abdominais de pupas e adultos fãratos de zangões (esquerda) e rainhas (direita). As quatro fases do desenvolvimento fãrato incluídas na investigação foram, da esquerda para a direita: olhos levemente pigmentados, olhos fortemente pigmentados, corpo levemente pigmentado, corpo fortemente pigmentado. A seta indica a apólise. Abundância de transcritos verificada por RT-PCR semi-quantitativa seguida de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A transcrição do gene *Amact* foi utilizada como controle da amplificação.

A análise histológica do tegumento de adultos recém-emergidos revelou um grau de maturação cuticular diferencial entre as castas e sexos (**Figura 6J e Figura 17**). No momento da emergência da célula de cria, o exoesqueleto dos machos se apresenta relativamente mais pigmentado e esclerotizado em comparação ao das fêmeas. Levando-se em consideração as castas, a cutícula de rainhas se encontra em um estágio de diferenciação levemente atrasado em relação à de operárias. Ambos os padrões, casta e sexo-específico, são observados tanto para o tegumento torácico quanto para o abdominal.

Tais resultados são condizentes com o perfil temporal do desenvolvimento das castas e dos sexos em *Apis mellifera*. O tempo total de ontogênese dentro da célula de cria, desde a postura do ovo até a emergência do adulto, varia na faixa de 14-17 dias para rainhas, 16-24 dias para operárias e 20-28 dias para zangões (Winston, 2003).

Ainda que os valores absolutos oscilem em função de uma série de fatores (temperatura do ninho, nutrição da cria, posição da célula no favo, tipo de raça da abelha, etc), a relação de tempo zangão > operária > rainha se mantém incondicionalmente em cada colméia. Esse descompasso no desenvolvimento das castas e sexos é decorrente principalmente de diferenças na duração do período metamórfico (pupação e diferenciação do adulto). Dessa forma, os diferentes graus de maturação do exoesqueleto do adulto recém-emergido podem ser explicados pelo próprio padrão heterocrônico de desenvolvimento pré-imaginal casta e sexo-específico. As rainhas emergem de modo relativamente precoce e apresentam nessa ocasião o exoesqueleto em estado ainda imaturo, enquanto os zangões passam pela ecdise imaginal mais tardiamente e assim emergem das células de cria num momento em que a cutícula já se encontra em acentuado grau de diferenciação. As operárias apresentam um cenário intermediário. Em um contexto geral, o ambiente protetor das colônias possivelmente reflete um relaxamento das pressões seletivas sobre a diferenciação cuticular, permitindo, desse modo, a emergência de adultos com exoesqueleto relativamente imaturo.

Já o perfil transcricional de *Amlac 2* durante a diferenciação do tegumento adulto pode ser considerado equivalente entre as castas e sexos, ao menos no aspecto qualitativo. Os resultados obtidos para zangões e rainhas são similares aos já descritos no caso das operárias: predomínio de transcritos no período farato e atraso relativo da intensificação da transcrição no tegumento abdominal (**Figura 8** e **Figura 18**). No entanto, apesar de não terem sido evidenciadas em função do tipo de metodologia utilizada, provavelmente existem diferenças quantitativas na expressão desse gene entre as castas e os sexos que expliquem os contrastes fenotípicos do exoesqueleto detectados na abordagem histológica.

CONCLUSÃO

O presente trabalho teve por abordagem central a morfogênese do tegumento adulto em *Apis mellifera*, com ênfase no processo de diferenciação cuticular. No contexto da genômica funcional, foi proposta a investigação da estrutura, função e regulação do gene *Amlac 2*, codificador da Lacase 2 em *Apis mellifera*, com participação nas vias de melanização e esclerotização da cutícula.

O perfil transcricional de *Amlac 2* sugere relação com o padrão de biossíntese e diferenciação do exoesqueleto adulto, bem como com a oscilação do título de ecdisteróides na hemolinfa. O suposto papel da enzima Lacase 2 no processo de *tanning* cuticular foi validado em experimentos de silenciamento gênico pós-transcricional por injeção de *dsRNA*. Procedimentos de ligadura abdominal corroboraram a hipótese inicial de regulação da expressão do gene *Amlac 2* por ecdisteróides. Ainda, a detecção de quantidades crescentes desses hormônios em abdômes ligados resultou na construção de um modelo teórico sobre a existência de sítios ecdisteroidogênicos ainda desconhecidos, possivelmente enócitos.

Em conjunto, os resultados aqui apresentados contribuem na busca pelo entendimento da morfogênese do tegumento adulto de *Apis mellifera*, fenômeno esse fundamental para a ontogênese plena da abelha. Além disso, foi evidenciada a contribuição efetiva da enzima Lacase 2 no processo de diferenciação cuticular, bem como a regulação do gene *Amlac 2* por ecdisteróides.

Algumas perspectivas...

É extremamente desejável a investigação de novos “personagens moleculares” que participem de alguma forma, como protagonistas ou coadjuvantes, do complexo cenário da formação e maturação do exoesqueleto adulto. Um forte candidato é o hormônio denominado bursicona. Trata-se de um heterodímero secretado pelo cérebro com função reguladora do *tanning* cuticular. Sua natureza molecular e a identificação de seu receptor foram reveladas apenas recentemente (Luo *et al.*, 2005; Mendive *et al.*, 2005; Loy *et al.*, 2007), cerca de quatro décadas após os primeiros relatos sobre a descoberta deste neuro-hormônio (Fraenkel e Hsiao, 1962, 1963; Cottrel, 1962). Também foi documentada a participação da bursicona no comportamento de expansão das asas após a ecdise imaginal (Dewey *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007), bem como sua relação com outros hormônios controladores do ciclo de muda (Truman, 1981).

Com o suporte gerado em *Apis mellifera*, é possível ainda extrapolar os estudos para outras espécies de abelhas, o que enriqueceria muita nossa análise. No clado das chamadas abelhas corbiculadas (Euglossini - “abelhas das orquídeas”, Bombini - “mamangabas”, Apini - “abelhas do mel”, e Meliponini - “abelhas sem ferrão”), o desenvolvimento de modo geral e particularmente a morfogênese do tegumento adulto têm sido muito pouco explorados. Apesar de uma série de estudos envolvendo glândulas exócrinas associadas ao tegumento (para revisão, ver Cruz-Landim e Abdalla, 2002), a diferenciação cuticular foi abordada com maiores detalhes apenas em *Melipona quadrifasciata* (Meliponini) (Oliveira, 1997). O grupo de abelhas corbiculadas é de particular interesse em estudos comparativos por incluir representantes de diversos “níveis” de organização: o solitário (Euglossini), o primitivamente social (Bombini) e o eussocial (Apini e Meliponini). A escassez de trabalhos, portanto, não é condizente com o grande potencial investigativo da diferenciação do exoesqueleto adulto nessa

linhagem de abelhas. A eussocialidade representa uma interessante oportunidade para o teste de hipóteses evolutivas relacionadas a mecanismos adaptativos do tegumento ao contexto social.

Finalmente, algumas evidências que suportam o modelo teórico aqui apresentado sobre fontes alternativas de ecdisteróides já foram encontradas nas principais ordens holometábolos (Coleoptera, Lepidoptera e Diptera), mas nunca foram investigadas em Hymenoptera. Caso legitimada, portanto, essa hipótese complementar a visão endocrinológica tradicional e representará um importante avanço do conhecimento dessa linhagem de organismos extremamente diversificada e bem-sucedida.

BIBLIOGRAFIA

- 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 intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnology* 3, 1-8.
- ANDERSEN, S.O., 2005. Cuticular sclerotization and tanning. In: Gilbert, L.I.; Iatrou, K. & Gill, S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 4. Elsevier Press, Oxford. pp. 145-170.
- ANDERSEN, S.O.; THOMPSON, P.R. & HEPBURN, H.R., 1981. Cuticular sclerotization in the honeybee (*Apis mellifera adansonii*). *Journal of Comparative Physiology* 145: 17-20.
- ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S.; BEEMAN, R.W.; KANOST, M.R. & KRAMER, K.J., 2005. *Laccase 2* is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 32, 11337-11342.
- ASANO, T. & ASHIDA, M., 2001a. Cuticular pro-phenoloxidase of the silkworm, *Bombyx mori*: purification and demonstration of its transport from hemolymph. *Journal of Biological Chemistry* 276, 11100- 11112.
- ASANO, T. & ASHIDA, M., 2001b. Transepithelially transported pro-phenoloxidase in the cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 11113-11125.
- ASHBURNER, M., 1990. Puffs, genes, and hormones revisited. *Cell* 61, 1-3.
- ASHBURNER, M.; CHIHARA, C.; MELTZER, P. & RICHARDS, G., 1974. Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 38, 655-662.
- ASHIDA, M. & BREY, P.T., 1995. Role of the integument in insect defense: Pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 10698-10702.

- ASHIDA, M. & BREY, P.T., 1998. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey, P.T. & Hultmarck, D. (Eds.), *Molecular mechanisms of the insect immune response*. Chapman & Hall, London. pp. 135-172.
- AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A. & STRUHL, K., 1995. *Short protocols in Molecular Biology*. 3.ed. Wiley, U.S.A.
- AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L. & SANTOS, A.S., 2005. *BioEstat 4.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. IOEPA, Belém-PA.
- BAGASRA, O. & PRILLIMAN, K.R., 2004. RNA interference: the molecular immune system. *Journal of Molecular Histology* 35, 545-553.
- BARRETT, F.M., 1987a. Phenoloxidases from larval cuticle of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*: characterization, developmental changes, and inhibition by antiphenoloxidase antibodies. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 5, 99-118.
- BARRETT, F.M., 1987b. Characterization of phenoloxidases from larval cuticle of *Sarcophaga bullata* and a comparison with cuticular enzymes from other species. *Canadian Journal of Zoology* 65, 1158-1166.
- BARRET, F.M. & ANDERSEN, S.O., 1981. Phenoloxidases in larval cuticle of the blowfly, *Calliphora vicina*. *Insect Biochemistry* 11, 17-23.
- BERTHOLF, L.M., 1925. The moults of the honeybee. *Journal of Economic Entomology* 18, 380-384.
- BEYE, M.; HÄRTEL, S.; HAGEN, A.; HASSELMANN, M. & OMHOLT, S.W., 2002. Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Molecular Biology* 11, 527-532.
- BINNINGTON, K.C. & BARRETT, F.M., 1988. Ultrastructural localization of phenoloxidases in cuticle and haemopoietic tissue of the blowfly *Lucilia cuprina*. *Tissue & Cell* 20, 405-419.

- BLAZSEK, I.; BALÁZS, A.; NOVÁK, V.J.A. & MALÁ, J., 1975. Ultrastructural study of the prothoracic glands of *Galleria mellonella* L. in the penultimate, last larval, and pupal stages. *Cell and Tissue Research* 158, 269-280.
- BOLLENBACHER, W.E.; SMITH, S.L.; GOODMAN, W. & GILBERT, L.I., 1981. Ecdysteroid titer during larval-pupal-adult development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *General and Comparative Endocrinology* 44, 302-306.
- CHADWICK, L.E., 1955. Molting of roaches without prothoracic glands. *Science* 121, 435.
- CLAUS, H., 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology* 179, 145-150.
- CLAUS, H., 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35, 93-96.
- COLONELLO, N.A.; ZUFELATO, M.S.; SIMÕES, Z.L.P. & BITONDI, M.M.G., 2003. *In vitro* secretion of ecdysteroid-dependent proteins and of a 70 kDa subunit reactive to anti-prophenoloxidase serum by *Apis mellifera* integument. *Apidologie* 34, 377-388.
- COSTA, C.; IDE, S. & SIMONKA, C.E. (Eds.), 2006. *Insetos Imaturos. Metamorfose e Identificação*. Holos, Ribeirão Preto.
- COTTRELL, C.B., 1962. The imaginal ecdysis of blowflies. *Journal of Experimental Biology* 39, 395-459.
- COTTRELL, C.B., 1964. Insect ecdysis with particular emphasis on cuticular hardening and darkening. *Advances in Insect Physiology* 2, 175-218.
- CRUZ-LANDIM, C. & ABDALLA, F.C. (Eds.), 2002. *Glândulas exócrinas das abelhas*. FUNPEC, Ribeirão Preto.
- DAI, J.-D. & GILBERT, L.I., 1991. Metamorphosis of the corpus allatum and degeneration of the prothoracic glands during the larval-pupal-adult transformation of *Drosophila melanogaster*: a cytophysiological analysis of the ring gland. *Developmental Biology* 144, 309-326.

- DAI, J.-D. & GILBERT, L.I., 1997. Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 69-78.
- DELBECQUE, J.P.; DELACHAMBRE, J.; HIRN, M. & DE REGGI, M., 1978. Abdominal production of ecdysterone and pupal-adult development in *Tenebrio molitor* (Insecta, Coleoptera). *General and Comparative Endocrinology* 35, 436-444.
- DELBECQUE, J.P.; WEIDNER, K. & HOFFMANN, K.H., 1990. Alternative sites for ecdysteroid production in insects. *Invertebrate Reproduction and Development* 18, 29-42.
- DEWEY, E.M.; McNABB, S.L.; EWER, J.; KUO, G.R.; TAKANISHI, C.L.; TRUMAN, J.W. & HONEGGER, H.-W., 2004. Identification of the gene encoding bursicon, an insect neuropeptide responsible for cuticle sclerotization and wing spreading. *Current Biology* 14, 1208-1213.
- DITTMER, N.T.; SUDERMAN, R.J.; JIANG, H.; ZHU, Y.C.; GORMAN, M.J.; KRAMER, K.J. & KANOST, M.R., 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 29-41.
- DURÁN, N.; ROSA, M.A.; D'ANNIBALE, A. & GIANFREDA, L., 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 907-931.
- EVANS, J.D. & WHEELER, D.E., 1999. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 5575-5580.
- EVANS, J.D. & WHEELER, D.E., 2000. Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biology* 2, 1-6.
- EVANS, J.D. & WHEELER, D.E., 2001. Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. *BioEssays* 23, 62-68.

- FELDLAUFER, M.F.; HERBERT Jr, E.W.; SVOBODA, J.A.; THOMPSON, M.J. & LUSBY, W.R., 1985. Makisterone A – the major ecdysteroid from the pupa of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry* 15, 597-600.
- FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E. & MELLO, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- FRAENKEL, G., 1935. A hormone causing pupation in the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *Proceedings of the Royal Society of London – Series B* 118, 1-12.
- FRAENKEL, G. & RUDALL, K.M., 1940. A study of the physical and chemical properties of the insect cuticle. *Proceedings of the Royal Society of London – Series B* 129, 1-35.
- FRAENKEL, G. & HSIAO, C., 1962. Hormonal and nervous control of tanning in the fly. *Science* 138, 27-29.
- FRAENKEL, G. & HSIAO, C., 1963. Tanning in the adult fly: a new function of neurosecretion in the brain. *Science* 141, 1057-1058.
- FRISTROM, D. & FRISTROM, J.W., 1993. The metamorphic development of the adult epidermis. In: Bate M. & Arias A.M. (Eds.), *The development of Drosophila melanogaster*, vol. 2. Cold Spring Harbor, New York. pp. 843-897.
- GILBERT, L.I.; TATA, J.R. & ATKINSON, B.G. (Eds.), 1996. *Metamorphosis: postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells*. Academic Press, San Diego.
- GILBERT, L.I.; RYBCZYNSKI, R. & WARREN, J.T., 2002. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annual Review of Entomology* 47, 883-916.
- GILBERT, S.F., 2006. *Developmental biology*. 8.ed. Sinauer Associates Inc., U.S.A.
- GLITHO, I.; DELBECQUE, J.P. & DELACHAMBRE, J., 1979. Prothoracic gland involution related to moulting hormone levels during the metamorphosis of *Tenebrio molitor* L. *Journal of Insect Physiology* 25, 187-191.

- GOODWIN, T.W.; HORN, D.H.S.; KARLSON, P.; KOOLMAN, J.; NAKANISHI, K.; ROBBINS, W.E.; SIDDALL, J.B. & TAKEMOTO, T., 1978. Ecdysteroids: a new generic term. *Nature* 272, 122.
- HANDLER, A.M., 1982. Ecdysteroid titers during pupal and adult development in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 93, 73-82.
- HANNON, G.J., 2002. RNA interference. *Nature* 418, 244-251.
- HARTFELDER, K., 1993. Structure and function of the prothoracic gland in honey bee (*Apis mellifera* L.) development. *Invertebrate Reproduction and Development* 23, 59-74.
- HARTFELDER, K. & ENGELS, W., 1998. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in Development and Reproduction in the Honeybee. *Current Topics in Developmental Biology* 40, 45-77.
- HARTFELDER, K. & EMLÉN, D.J., 2005. Endocrine control of insect polyphenism. In: Gilbert, L.I.; Iatrou, K. & Gill, S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 3. Elsevier Press, Oxford. pp. 651-703.
- HEPBURN, H.R., 1985. Structure of the integument. In: Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 3. Pergamon Press, Oxford. pp. 1-58.
- HINTON, H.E., 1946. Concealed phases in the metamorphosis of insects. *Nature* 157, 552-553.
- HINTON, H.E., 1971. Some neglected phases in metamorphosis. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London - Series C* 35, 55-64.
- HINTON, H.E., 1973. Neglected phases in metamorphosis: a reply to V.B. Wigglesworth. *Journal of Entomology - Series A* 48, 57-68.
- HOPKINS, T.L. & KRAMER, K. J., 1992. Insect cuticle sclerotization. *Annual Review of Entomology* 37, 273-302.

- HSIAO, T.H.; HSIAO, C. & DE WILDE, J., 1976. Molting hormone titer changes and their significance during development of the colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Insect Physiology* 22, 1257-1261.
- HUANG, J.; ZHANG, Y.; LI, M.; WANG, S.; LIU, W.; COUBLE, P.; ZHAO, G.; HUANG, Y., 2007. RNA interference-mediated silencing of the bursicon gene induces defects in wing expansion of silkworm. *FEBS Letters* 581, 697-701.
- JAY, S.C., 1963. The development of honeybees in their cells. *Journal of Apicultural Research* 2, 117-134.
- JENKIN, P.M. & HINTON, H.E., 1966. Apolysis in arthropod moulting cycles. *Nature* 211, 871.
- JENKINS, S.P.; BROWN, M.R. & LEA, A.O., 1992. Inactive prothoracic glands in larvae and pupae of *Aedes aegypti*: ecdysteroid release by tissues in the thorax and abdomen. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22, 553-559.
- KING-JONES, K. & THUMMEL, C.S., 2005. Nuclear receptors – a perspective from *Drosophila*. *Nature Reviews – Genetics* 6, 311-323.
- KOPEC, S., 1922. Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. *Biological Bulletin* 42, 323-342.
- KRAMER, K.J.; KANOST, M.R.; HOPKINS, T.L.; JIANG, H.; ZHU, Y.C.; XU, R.; KERWIN, J.L. & TURECEK, F., 2001. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron* 57, 385-392.
- KRISTENSEN, N.P., 1981. Phylogeny of insect orders. *Annual Review of Entomology* 26, 135-157.
- LOURENÇO, A.P., 2003. *Profenoloxidase de Apis mellifera: clonagem parcial, caracterização e expressão nas castas e sexos*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética, FMRP-USP.

- LOURENÇO, A.P.; ZUFELATO, M.S.; BITONDI, M.M.G. & SIMÕES, Z.L.P., 2005. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the prophenoloxidase from *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 541-552.
- LOURENÇO, A.P.; MACKERT, A.; CRISTINO, A.S. & SIMÕES, Z.L.P., 2008. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* ([artigo aceito para publicação](#))
- LOY, T.V.; HIEL, M.B.V.; VANDERSMISSSEN, H.P.; POELS, J.; MENDIVE, F.; VASSART, G. & BROECK, J.V., 2007. Evolutionary conservation of bursicon in the animal kingdom. *General and Comparative Endocrinology* 153, 59-63.
- LUO, C.-W.; DEWEY, E.M.; SUDO, S.; EWER, J.; HSU, S.Y.; HONEGGER, H.-W. & HSUEH, A.J.W., 2005. Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 2820-2825.
- MARTAU, T. & ROMER, F., 1998. Degeneration of moulting glands in male crickets. *Journal of Insect Physiology* 44, 981-989.
- MAYER, A.M. & STAPLES, R.C., 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60, 551-565.
- MENDIVE, F.M.; LOY, T.V.; CLAEYSEN, S.; POELS, J.; WILLIAMSON, M.; HAUSER, F.; CORNELIS, J.P.; GRIMMELIKHUIJZEN, G.V. & BROECK, J.V., 2005. *Drosophila* molting neurohormone bursicon is a heterodimer and the natural agonist of the orphan receptor DLGR2. *FEBS Letters* 579, 2171-2176.
- MICHELETTE, E.R.F. & SOARES, A.E.E., 1993. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie* 24, 431-440.
- MICHENER, C.D., 1974. *The social behavior of the bees – A comparative study*. Harvard University Press, Cambridge.
- MYSER, W.C., 1954. The larval and pupal development of the honeybee *Apis mellifera* Linnaeus. *Annals of the Entomological Society of America* 47, 683-711.

- NAKANISHI, K.; MORIYAMA, H.; OKAUCHI, T.; FUJIOKA, S. & KOREEDA, M., 1972. Biosynthesis of α - and β -ecdysones from cholesterol outside the prothoracic gland in *Bombyx mori*. *Science* 176, 51-52.
- NIJHOUT, H.F., 1994. *Insect Hormones*. Princeton University Press, New Jersey.
- NIJHOUT, H.F., 1999. Control mechanisms of polyphenic development in insects. *BioScience* 49, 181-192.
- NOIROT, C. & QUENNEDEY, A., 1974. Fine structure of insect epidermal glands. *Annual Review of Entomology* 19, 61-80.
- NUNES-SILVA, P.; GONÇALVES, L.S.; FRANCOY, T.M. & DE JONG, D., 2006. Rate of growth and development time of africanized honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers during ontogenetic development. *Brazilian Journal of Morphological Science* 23, 325-332.
- OERTEL, E., 1930. Metamorphosis in the honeybee. *Journal of Morphology* 50, 295-339.
- OLIVEIRA, S.A.R., 1997. *Alterações morfológicas dos componentes tegumentares de estágios imaturos de Melipona quadrifasciata anthidioides Lep. (Hymenoptera, Apidae)*. Tese de Doutorado. Área de Zoologia, IBRC-UNESP.
- PARKINSON, N.M.; CONYERS, C.M.; KEEN, J.N., MACNICOLL, A.D., SMITH, I. & WEAVER, R.J., 2003. cDNA encoding large venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* identified by random sequence analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 134, 513-520.
- 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. *Journal of Insect Physiology* 48, 783-790.
- PRYOR, M.G.M., 1940. On the hardening of the cuticle of insects. *Proceedings of the Royal Society of London – Series B* 128, 393-407
- RACHINSKY, A.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A. & HARTFELDER, K., 1990. Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *General and Comparative Endocrinology* 79, 31-38.

- REMBOLD, H.; KREMER, 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.
- REUM, L. & KOOLMAN, J., 1989. Radioimmunoassay of ecdysteroids. In: Koolman, J. (Ed.), *Ecdysone*. Thieme Verlag, Stuttgart. pp. 131-143.
- RIDDIFORD, L.M., 1982. Changes in translatable mRNAs during the larval-pupal transformation of the epidermis of the tobacco hornworm. *Developmental Biology* 92, 330-342.
- RIDDIFORD, L.M., 1985. Hormone action at the cellular level. In: Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 8. Pergamon Press, Oxford. pp. 37-84.
- RIDDIFORD, L.M.; CHERBAS, P. & TRUMAN, J.W., 2001. Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitamins and Hormones* 60, 1-73.
- RIDDIFORD, L.M.; HIRUMA, K.; ZHOU, X. & NELSON, C.A., 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 1327-1338.
- ROMER, F., 1974. Ultrastructural changes of the oenocytes of *Gryllus bimaculatus* DEG (Saltatoria, Insecta) during the moulting cycle. *Cell and Tissue Research* 151, 27-46.
- ROMER, F.; EMMERICH, H. & NOWOCK, J., 1974. Biosynthesis of ecdysones in isolated prothoracic glands and oenocytes of *Tenebrio molitor* *in vitro*. *Journal of Insect Physiology* 20, 1975-1987.
- RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M.A. & BARRELL, B., 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16, 944-945.
- SAKURAI, S.; WARREN, J.T. & GILBERT, L.I., 1991. Ecdysteroid synthesis and molting by the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, in the absence of prothoracic glands. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 18, 13-36.

- SANTOS, A.E., BITONDI, M.M.G. & SIMÕES, Z.L.P., 2001. Hormone-dependent protein patterns in integument and cuticular pigmentation in *Apis mellifera* during pharate adult development. *Journal of Insect Physiology* 47, 1275-1282.
- SCHWARTZ, L.M. & TRUMAN, J.W., 1983. Hormonal control of rates of metamorphic development in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Developmental Biology* 99, 103-114.
- SNODGRASS, R.E., 1956. *Anatomy of the honey bee*. Cornell University, London.
- SNODGRASS, R.E., 1960. Some words and their ways in Entomology. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 62, 265-270.
- SOARES, M.P.M., 2007. *Caracterização e estudo da expressão de genes do tegumento de Apis mellifera durante os processos de muda e diferenciação da cutícula*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, FFCLRP – USP.
- SOARES, M.P.M.; ELIAS-NETO, M.; SIMÕES, Z.L.P. & BITONDI, M.M.G., 2007. A cuticle protein gene in the honeybee: expression during development and in relation to the ecdysteroid titer. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 1272-1282.
- SOLOMON, E.I.; SUNDARAM, U.M. & MACHONKIN, T.E., 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* 96, 2563-2605.
- STUDINGER, G. & WILLIG, A., 1975. Biosynthesis of α - and β -ecdysone in isolated abdomens of larvae of *Musca domestica*. *Journal of Insect Physiology* 1793-1798.
- SUDERMAN, R. J.; DITTMER, N.T.; KANOST, M.R. & KRAMER, K.J., 2006. Model reactions for insect cuticle sclerotization: cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalysed oxidative conjugation with catechols. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36, 353-365.
- SUGUMARAN, M., 1998. Molecular mechanisms of cuticular sclerotization. *Advances in Insect Physiology* 21, 179-231.
- SUGUMARAN, M., GIGLIO, L., KUNDZICZ, H., SAUL, S. & SEMENSI, V., 1992. Studies on the enzymes involved in puparial cuticle sclerotization in *Drosophila melanogaster*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 19, 271-283.

- The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931-949.
- THOMPSON, P.R., 1978. Histological development of cuticle in the worker honeybee, *Apis mellifera adansonii*. *Journal of Apicultural Research* 17, 32-40.
- THOMPSON, P.R. & HEPBURN, H.R., 1978. Changes in chemical and mechanical properties of honeybee (*Apis mellifera adansonii* L.) cuticle during development. *Journal of Comparative Physiology* 126, 257-262.
- TOZETTO, S.O.; BITONDI, M.M.G.; DALLACQUA, R.P. & SIMÕES, Z.L.P., 2007. Protein profiles of testes, seminal vesicles and accessory glands of honey bee pupae and their relation to the ecdysteroid titer. *Apidologie* 38, 1-11.
- TRUMAN, J.W., 1981. Interaction between ecdysteroid, eclosion hormone, and bursicon titers in *Manduca sexta*. *American Zoologist* 21, 655-661.
- TRUMAN, J.W.; RIDDIFORD, L.M. & SAFRANEK, L., 1974. Temporal patterns of response to ecdysone and juvenile hormone in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental Biology* 39, 247-262.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1973. The significance of “apolysis” in the moulting of insects. *Journal of Entomology – Series A* 47, 141-149.
- WILLIAMS, C.M., 1952. Physiology of insect diapause. IV. The brain and prothoracic glands as an endocrine system in the cecropia silkworm. *Biological Bulletin* 1, 120-138.
- WILSON, E.O., 1971. *The insect societies*. Harvard University Press, Cambridge.
- WINSTON, M.L., 2003. *A biologia da abelha*. Magister, Porto Alegre.
- ZUFELATO, M.S., 2004. *Fenoloxidasas de Apis mellifera: caracterização da atividade e expressão dependente de hormônio*. Tese de Doutorado. Departamento de Biologia, FFCLRP-USP.

- ZUFELATO, M.S.; BITONDI, M.M.G.; SIMÕES, Z.L.P. & HARTFELDER, K., 2000. The juvenile hormone analog pyriproxyfen affects ecdysteroid-dependent cuticle melanization and shifts the pupal ecdysteroid peak in the honey bee (*Apis mellifera*). *Arthropod Structure & Development* 29, 111-119.
- ZUFELATO, M.S.; LOURENÇO, A.P.; SIMÕES, Z.L.P.; JORGE, J.A. & BITONDI, M.M.G., 2004. Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 1257-1268.