

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ultraspiracle e diferenciação de
castas em *Apis mellifera*

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de DOUTOR em
CIÊNCIAS-Área de concentração:
GENÉTICA

Aluno: ANGEL ROBERTO BARCHUK
Orientadora: Profa. Dra. ZILÁ LUZ PAULINO SIMÕES

RIBEIRÃO PRETO
2004

Barchuk, Angel Roberto

ultraspiracle e diferenciação de castas em *Apis mellifera*

Ribeirão Preto, 2004.

Usp, receptor nuclear, hormônio juvenil, ecdisteróides, desenvolvimento pós-embrionário, RNAi

126 p. : il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Genética.

Orientadora: Simões, Zilá Luz Paulino

À memória de meus pais,

Maria Yaworski

e

Basilio Barchuk

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à *Profa. Dra. Zilá L.P. Simões* por ter me dado a oportunidade de estender minha formação, de fazê-lo num ambiente tão interessante e pela excelente orientação oferecida. Ademais, sua permanente disposição para cumprir suas tarefas tanto de docência quanto de pesquisa a tornam exemplo.

À *Profa. Dra. Márcia Bitondi* e ao *Prof. Dr. Klaus Hartfelder*, membros do Laboratório, pelas sugestões, discussões e ajuda em diversos momentos deste período de formação.

Ao *Prof. Dr. Ryszard Maleszka* (Australian National University) pela colaboração no trabalho de caracterização do cDNA correspondente a *usp* de *Apis mellifera*.

A *Vera Figueiredo, Adriana Nascimento, Karina Guidugli, Inês Schmidt Capella* e *Klaus Hartfelder* pela amizade e trabalho em colaboração nos experimentos de *knock down* de *usp* (VF) e da vitelogenina (AM, KG e KH) e no de avaliação da expressão de *usp* em ovários de fêmeas (ISC).

Aos *Drs. Xavier Bellés, Dolors Piulachs, David Martín, José L. Maestro, Pepi Cruz* e os demais membros do Laboratório de Fisiología y Biodiversidad Molecular do Instituto de Biología Molecular de Barcelona, pela generosidade acadêmica e “social” brindada durante minha estadia.

Aos *Drs. Fotis Kafatos, Claudia Blass* (EMBL-Heidelberg) e *James Sutherland* (Cancer Research, UK) pelo anticorpo anti *Usp* e pelas sugestões na sua utilização.

Ao *Dr. João Pina* e membros de seu Laboratório pela ajuda nos experimentos de *Northern blot*.

Ao *Dr. Jason Hodin* (Friday Harbor Laboratories, University of Washington) pelas sugestões nos experimentos de avaliação da expressão de *usp* em ovários e por compartilhar resultados não publicados.

Aos *Drs. Miguel Corona* (Honey Bee Research, University of Illinois) e *Mario Zurita* (Universidad Nacional de México, Cuernavaca) pela biblioteca de cDNA.

Todos os *Técnicos Apícolas do Laboratório* colaboraram em nosso trabalho, mas, *Luiz Aguiar* (“bomba d’água”) foi o feliz incumbido de facilitar nosso acesso a imaturos de abelhas.

À *Edgar Bione, Adriana C., Alessandra, Aline A., Aline M., Anete, Carlos, Clarice, Dirk, Eduardo, Erica, Esequiel, Fernanda, Francis, Gesline, Geusa, Giancarlo, Gustavo M., Iván, Mano Alexandre, Marcela, Michelle, Moisés, Nínive, Omar, Pedro, Rodrigo, Rogério, Salete, Sergio, Sibeles, Tathiana, Tiago, Umberto, Virginie, Viviane, Weyder* e demais colegas e Professores de outras salas e áreas do Bloco A, brindaram amizade e colaboração.

Ao *Departamento de Genética da FMRP da USP* que, através de seus docentes e funcionários, possibilitou exemplarmente esta etapa da minha formação.

À *FAPESP* e à *FAEPA* pela fundamental ajuda financeira.

A *Isabel*, pela paz fortalecedora e apoio permanente.

Agradeço imensamente a todos.

ÍNDICE

1.- Introdução geral.....	11
1.1.-Socialidade e castas em abelhas.....	12
1.2.-Determinação de castas.....	13
1.3.-Perguntas chave.....	15
1.4.-Explicações prévias.....	15
1.5.-Considerações sobre receptores nucleares de hormônios.....	18
1.6.-Ecdisona, HJ e expressão gênica.....	20
2.- Seqüência de cDNA e resposta a hormônios morfo genéticos do <i>ultraspiracle</i> de <i>Apis mellifera</i>.....	24
2.1.-Introdução.....	25
2.2.-Resultados.....	27
2.2.1.-Análise comparativa do <i>Ultraspiracle</i> de <i>Apis mellifera</i> (<i>AmUsp</i>).....	27
2.2.2.-Filogenia molecular do <i>AmUsp</i>	31
2.2.3.-Comportamento de <i>usp</i> em animais com níveis aumentados de hormônios morfo genéticos.....	32
2.2.3.1.-O HJ aumenta os níveis do transcrito de <i>usp</i> em fêmeas de <i>Apis mellifera</i>	32
2.2.3.2.- <i>usp</i> não parece responder a 20E no corpo gorduroso de <i>Apis mellifera</i>	34
2.3.-Discussão.....	46
2.3.1.-Organização estrutural e filogenia molecular funcional do <i>Usp</i> de <i>Apis mellifera</i> (<i>AmUsp</i>).....	46
2.3.2.- <i>Amusp</i> não parece responder a <i>ecdisona</i> exógena.....	49
2.3.3.-A expressão de <i>usp</i> de <i>Apis mellifera</i> é promovida por HJ...	50
3.- <i>ultraspiracle</i> no desenvolvimento pós-embrionário tardio de <i>Apis mellifera</i>.....	51
3.1.-Introdução.....	52
3.2.-Resultados.....	54
3.2.1.-A expressão de <i>usp</i> em fêmeas pupas e adultas jovens.....	54

3.2.1.1.-O perfil de expressão do mRNA de <i>usp</i> no corpo gorduroso (CG) pupal.....	54
3.2.1.2.-A expressão de <i>usp</i> no CG de fêmeas de 0-10 dias de idade adulta.....	54
3.2.2.-Fenótipo de pupas de abelhas knock-down para <i>usp</i>	58
3.3.-Discussão.....	62
3.3.1.-Expressão de <i>usp</i> durante o desenvolvimento pós-embrionário tardio.....	62
3.3.2.-A expressão de <i>usp</i> é fundamental para o desenvolvimento pupal de <i>Apis mellifera</i>	65
4.- Expressão de <i>ultraspiracle</i> e desenvolvimento ovariano em castas de <i>Apis mellifera</i>.....	71
4.1.-Introdução.....	72
4.2.-Resultados.....	74
4.2.1.-O mRNA de <i>usp</i> em ovários de larvas de <i>Apis mellifera</i>	74
4.2.2.- A proteína <i>Usp</i> é detectada somente em ovários de larvas de operárias.....	74
4.3.-Discussão.....	78
5.- Material e Métodos.....	81
5.1.-Animais e tratamentos hormonais.....	82
5.2.-Imunofluorescência em ovários.....	84
5.3.-Extração de RNA total.....	85
5.4.-Síntese de cDNAs.....	86
5.5.-Amplificação de cDNA por PCR convencional.....	86
5.6.-Clonagem de fragmentos de DNA.....	87
5.6.1.-Ligação.....	87
5.6.2.-Obtenção de células competentes (<i>DH5a</i>).....	88
5.6.3.-Transformação bacteriana e avaliação de produtos de clonagem.....	89
5.6.4.-Seqüenciamento de fragmentos de cDNA e análise de seqüências.....	90
5.7.-Marcação de sondas “luminescentes”.....	90
5.8.-Marcação de sonda radiativa e hibridação.....	91
5.9.-Estimando o número de cópias de <i>usp</i>	92

5.9.1.-Obtenção de DNA genômico.....	92
5.9.2.-Digestão de DNA genômico e Southern blot.....	92
5.10.-RT/PCR semi-quantitativa/Southern blot.....	94
5.11.-Avaliação da expressão gênica em abelhas <i>knock-down</i>	96
5.11.1.-Preparação dos dsRNAs.....	96
5.11.2.-Injeção de dsRNA e obtenção de amostras.....	97
5.11.3.-Extração de hormônio juvenil a partir de amostras de hemolinfa.....	98
5.11.4.-Radioimunoensaio para hormônio juvenil.....	98
5.11.5.-Separação eletroforética de esterases.....	99
6.- Considerações finais.....	101
7.- Referências bibliográficas.....	105
8.- Anexo.....	127

Resumo

O hormônio juvenil (HJ) e os ecdisteróides, especialmente 20-hidroxicodisona (20E), controlam muitos aspectos no desenvolvimento de insetos. Em insetos eusociais, estes hormônios estão diretamente envolvidos na diferenciação de castas alternativas. O HJ, ademais, modula o desenvolvimento e a evolução do comportamento de operárias adultas em *Apis mellifera*. Nesse trabalho, clonamos e sequenciamos o cDNA que codifica para Ultraspiracle de *Apis mellifera* (AmUsp) e analisamos a resposta de *usp* a ambos hormônios morfogenéticos. *Amusp* parece ser um gene de cópia simples que produz dois transcritos (~4 e 5kb) que são diferencialmente expressos no corpo do animal. AmUsp mostra maior similaridade respeito aos ortólogos de *Locusta*, *Celuca* e vertebrados do que aos do resto de insetos. Estas características e sua rápida resposta transcricional a HJ sugere que algumas funções do Usp de *Apis mellifera* podem depender de ligande. Por outro lado, usando RNAi testamos a resposta de vários genes à diminuição da expressão de *usp* durante o desenvolvimento pupal de operárias. Enquanto a expressão de *vg* não foi claramente alterada em pupas *knock-down* para *usp* (*KDusp*), os genes para a pro-fenoloxidase e para a esterase do HJ foram inibidos. De maneira interessante, a expressão de *ftz-f1* (um receptor nuclear órfão) também foi diminuída em pupas *KDusp*, sugerindo a participação de Usp na regulação da expressão destes genes. Títulos baixos de HJ durante os últimos estágios do desenvolvimento larval foram sugeridos como os responsáveis por desencadear a morte celular programada em ovários de operárias, ao ponto tal que só uns poucos ovaríolos permanecem para formar parte do sistema reprodutivo destas fêmeas. Nós determinamos o perfil de expressão de *usp* nos ovários de rainhas e operárias durante os últimos estágios do desenvolvimento larval. Análises por RT-PCR semiquantitativa mostraram que o mRNA de *usp* segue de perto os títulos hemolinfáticos de HJ, e que os maiores níveis de expressão deste gene encontrados em L4 de rainhas se correspondem com títulos maiores deste hormônio. Porém, experimentos de imunofluorescência utilizando um anticorpo monoclonal contra Usp de *Drosophila melanogaster*, mostraram estruturas marcadas somente na região de formação de clusters nos ovaríolos de operárias se preparando para a metamorfose. Esta região corresponde ao centro de células germinativas onde ocorrem os mais evidentes eventos de morte celular. Este padrão de expressão de *usp* sugere sua participação nestes processos, sozinho, ou formando heterodímeros com outros fatores de transcrição. Estes dados e a resposta positiva de *usp* a altos títulos de HJ nos permitem começar a elaboração de um modelo conceitual da rede de expressão gênica promovida pelo HJ durante o desenvolvimento e diferenciação de castas de *Apis mellifera*.

Abstract

In addition to their general roles in insect development and reproduction, juvenile hormone (JH) and ecdysone (20E) coordinate specific processes in social insects. They are directly involved in the differentiation of the alternative caste phenotypes, and, particularly in the honey bee, *Apis mellifera*, they modulate behavioral development in adult workers. In the present study, we have cloned and sequenced a cDNA encoding *Apis mellifera* Ultraspiracle (AmUsp), and analyzed its responses to both morphogenetic hormones, JH and 20E. *Amusp* seems to be a single copy gene that produces two transcripts (~4 and 5kb) that are differentially expressed in the different tissues and organs of a bee. In its amino acid sequence, AmUsp shows greater similarity to its orthologs from the vertebrate-crab-locust group than to the dipteran-lepidopteran group. These characteristics and its rapid up-regulation by JH suggest that some of the *Apis mellifera* Usp functions may depend on ligand binding. To investigate possible target genes regulated by AmUsp, we have used an iRNA technique to down-regulate *usp* expression during pupal development of *Apis mellifera* workers. This allowed us to test the response of *ftz-f1*, juvenile hormone esterase (*jhe*), pro-phenoloxidase (*proPo*) and vitellogenin (*vg*) genes to decreased levels of *usp* expression. While *vg* expression levels were not clearly altered in *usp* knock-down pupae (kd), the *proPo* and *jhe* genes were down regulated. Interestingly, *ftz-f1* (an orphan nuclear receptor) also turned out to be down regulated in *kd* pupae, indicating Usp protein participation in controlling the expression of these genes. A low JH titer during the final stages of larval development has been shown to trigger programmed cell death in the ovaries of worker larvae to the point that only a few ovarioles remain to form the functional reproductive system of these females. Hence, we determined the AmUsp expression pattern in the ovaries of queen and worker honeybees during the late stages of larval development. RT-PCR analyses showed that *usp* expression closely follows the haemolymph JH titer, and that the higher levels of *usp* expression in L4 queens reflect the higher titers of this hormone. Immunocytochemistry experiments with a mAb raised against a dipteran Usp protein revealed stained structures only in the region of cluster formation in ovarioles of worker larvae preparing for metamorphosis. This region corresponds to the germ cell center where processes of cell death and proliferation have been shown to occur. The pattern of *usp* expression suggests its participation in these processes, either alone or by heterodimerization with other transcription factors. These reports and the known positive response of *usp* to high levels of JH allow us to start building a conceptual model for the gene expression network promoted by JH during honey bee development and caste differentiation.

1. Introdução geral

1.1.-Socialidade e castas em abelhas

O sucesso biológico da socialidade em insetos descansa fundamentalmente na existência de indivíduos diferenciados morfo-fisiologicamente entre os membros de uma mesma espécie, o qual, junto com a sobreposição de gerações, permite o surgimento de colônias organizadas com base na divisão de trabalho (Wilson, 1971). Entre as fêmeas de abelhas, essas formas diferenciadas (castas) encontram-se representadas por rainhas (especializadas na reprodução) e operárias (especializadas nas tarefas próprias de uma colméia).

O grau de diferenciação de castas relaciona-se, em grande parte, ao nível de socialidade, i.e., em abelhas que apresentam organização semi-social não é possível determinar facilmente as diferenças entre fêmeas reprodutivas e não reprodutivas levando-se em conta apenas caracteres morfológicos, como tamanho corporal, desenvolvimento de estruturas reprodutivas e de coleta e defesa da colônia (como em alguns membros da Tribo Augoclorini). Em grupos com organização social primitiva (Halictinae, Allodapine e alguns Bombini), o polifenismo já é manifesto, apesar de existirem, na maioria, fenótipos intermediários de fêmeas. Já nos grupos de abelhas altamente eussociais quase não se encontram fenótipos intermediários (Apini e Meliponini). Nestes, e especificamente em *Apis mellifera*, a diferenciação de castas é bem conspícua. A maior parte das diferenças das rainhas em relação às operárias e às fêmeas de abelhas solitárias são perdas estruturais e comportamentais, i.e., ausência de órgãos coletores de mel, pólen, glândulas produtoras de cera, etc. (resumidas na Tabela 1; Michener, 1974). Porém, durante o desenvolvimento, as rainhas “perdem” estruturas, mas tornam-se pedomórficas, i.e., desenvolvem órgãos relacionados à reprodução antes e o fazem de maneira geral mais rapidamente. Isto resulta numa enorme capacidade reprodutiva das rainhas, sendo as operárias capazes, eventualmente, de só pôr

ovos não fecundados (que originam zangões) ou tróficos. Um caso extremo, encontra-se em *Frieseomelitta varia*. Os ovários –e, parcialmente os oviductos laterais- das operárias desorganizam-se e re-absorvem-se quase completamente durante o desenvolvimento pupal e na transição para a vida adulta, resultando os indivíduos desta casta completamente estéreis (Boleli et al., 1999, 2000).

Tabela 1.1.- Algumas diferenças entre rainhas e operárias de *Apis mellifera* (modificada de Michener, 1974).

Característica	Rainhas	Operárias
Área relativa da superfície de antenas	1	2
Nº de placas quimio-receptoras por antena	1600	2400
Lobo antenal do cérebro	Pequeno	Grande
<i>Mushroom bodies</i>	Pequenos	Grandes
Glândulas hipofaríngeas	Vestigiais	Grandes
Glândulas mandibulares	Muito grandes	Grandes
Glândulas da cera	Ausentes	Presentes
Glândula de Nasanov	Ausente	Presente
Ovários	Muito grandes	Pequenos
Nº de ovariolos	150-180	2-12
Espermateca*	Grande	Pequena
Eixo do Ferrão	Curvo	Reto
Longevidade	Grande	Pequena
Mandíbula	Robusta	Pequena
Proboscis	Curta	Comprida
Órgãos para coleta de pólen	Ausentes	Presentes
Tamanho corporal	Grande	Pequeno
Consumo de alimento protéico	Grande	Pequeno

*ver Silva et al. (2002, 2003)

1.2.-Determinação de castas

Quanto maior a diferença entre as castas, mais cedo atuam os fatores que determinam estas diferenças. Isto é, a evolução da socialidade requer um adiantamento no *timing* ontogenético de determinação de diferenças fenotípicas entre castas. Assim, abelhas com organização social primitiva e leves diferenciações morfo-fisiológicas entre fêmeas, como em alguns Halictinae, a determinação de castas acontece durante a vida adulta. Já em abelhas com alto

grau de diferenças fenotípicas entre fêmeas (*Apini* e *Meliponini*), estas diferenças são determinadas e surgem bem cedo durante a ontogenia (durante os primeiros estágios do desenvolvimento larval, em *Apis*, e incluso antes, como sugerido para *Melipona*; em Michener, 1974). Em todos os casos, o fator primário determinante das diferenças entre fêmeas (reprodutivas ou operárias) é certo grau de diferenciação alimentar (qualitativa e quantitativa; ver em Beetsma, 1979; Jung-Hoffmann, 1966) durante a fase larval, que conduz, na maioria dos casos, a diferenças em tamanho e peso das fêmeas e ao desenvolvimento diferencial de órgãos chave nas atividades casta-específicas destes insetos (ver Michener, 1974; Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990). Além deste fator, feromônios e mecanismos genéticos também foram propostos como determinantes da diferenciação de castas em alguns tipos de abelhas (Hefetz et al., 1996; Cnaani et al., 1997; Hartfelder et al., 2000; Kerr, 1950; Kerr, 1987).

Porém, evidências experimentais mostram que a aplicação de hormônio juvenil (HJ) nas larvas de abelhas induz o desenvolvimento de características próprias de rainhas (Wirtz & Beetsma, 1972; Velthuis & Velthuis-Kluppell, 1975; Campos et al., 1975). Assim, independentemente do tipo de estímulo inicial (alimentar, feromonal ou genético), a determinação de caminhos de desenvolvimento diferentes durante a fase larval (casta-específicos) parece obedecer a sinais hormonais (HJ e ecdisteróides) gerados por algum dos determinantes iniciais (Kerr et al., 1975; Evans & Wheeler, 2001; Bloch et al., 2002).

A relação entre hormônios e diferenciação de castas é facilmente percebida, ademais, quando analisamos os perfis dos ecdisteróides e do HJ durante o desenvolvimento larval de *Apis mellifera*. Ambos hormônios apresentam perfis mais pronunciados na maior parte da fase larval de rainhas, sendo isto mais evidente no caso do HJ (Rachinsky et al., 1990; Rembold, 1987; ver também Hartfelder & Engels, 1998).

1.3.-Perguntas chave

Neste ponto, surgem duas perguntas chave na discussão dos mecanismos que conduzem à diferenciação de castas. Uma nos leva para processos anteriores à ação hormonal e a outra nos leva para os processos decorrentes da ação hormonal: i, de que maneira diferenças na alimentação se traduzem em diferenciais de síntese de HJ? ii, de que maneira os diferenciais observados nos títulos de HJ determinam padrões casta-específicos de desenvolvimento pós-embrionário?

1.4.-Explicações prévias

A primeira pergunta (papel do fator nutricional na modulação da síntese de HJ) foi abordada, entre outros, por Hartfelder (1990). Ele propôs duas hipóteses explicativas: a modulação hormonal dependeria de fatores hemolinfáticos decorrentes da diferenciação alimentar (Haydak, 1943; Rembold et al., 1974; Rembold, 1976) ou de as larvas atingirem um limiar de tamanho, sendo esta última explicação baseada em trabalhos realizados em outros grupos de insetos (Nijhout, 1975). Ambas idéias ainda estão sob discussão, já que nem estudos de “determinadores alimentares” nem de balanços nutricionais apresentaram resultados conclusivos.

Uma outra via que poderia ligar um limiar nutricional a um diferencial de síntese de HJ seria o sistema nervoso estomatogástrico. Este sistema, que regula a incorporação de alimentos e seu transporte pelo intestino, encontra-se intimamente conectado com o sistema endócrino retrocerebral de *Apis mellifera* (Boleli et al., 1995,1998), podendo representar a conexão inicial entre alimentação e títulos de HJ. Em dípteros, a relação entre nutrição, sistema neuro-endócrino e alguns aspectos do desenvolvimento vem sendo estudada durante esta última década pelo grupo de John Stoffolano. Este grupo demonstrou que uma dieta rica

em proteínas ativa a produção de HJ pelos *corpora allata* de *Phormia regina* (Liu et al., 1988; Zou et al., 1989). O mediador deste processo seria um hormônio peptídico sintetizado em células endócrinas do intestino médio, que teria como alvo as células neurosecretoras do cérebro (Yin et al., 1994). Em *Aedes aegypti*, foi demonstrado que a distensão do intestino desencadeia no cérebro uma cascata fisiológica conducente à maturação de ovócitos, processo este que pode ser induzido sem a distensão intestinal mediante a aplicação de HJ III (Klowden, 1987).

Em *Apis mellifera* (Raes & Verbeke, 1994) e *Melipona quadrifasciata* (Neves et al., 2002), duas espécies com organização social complexa e diferenciação de castas, já foram encontradas células enteroendócrinas que poderiam cumprir o papel de conectar os sistemas digestivo e neuroendócrino (para maior informação sobre a relação entre nutrição e hormônios em insetos, ver Barton Browne, 2001).

Em relação à segunda pergunta formulada na seção anterior: Qualquer que seja o sinal que induz a maior síntese de HJ em futuras rainhas, este evento dispara os processos de desenvolvimento pós-embrionário casta-específicos. Isto é, indivíduos com patrimônio genético idêntico, sob efeitos “epigenéticos” (neste caso, hormonais) diferentes, seguem padrões de desenvolvimento diferentes, evidenciando clara plasticidade fenotípica. Temporalmente, isto acontece durante os estágios larvais L3 e início de L5 de *Apis mellifera*, caracterizados por maiores títulos de HJ em rainhas (Rachinsky et al., 1990; ver também Hartfelder & Engels, 1998).

As diferenças hormonais em favor das rainhas parecem determinar dois tipos de alterações no padrão de desenvolvimento original (presente em ancestrais): um deles estaria representado por alterações “positivas”, de aquisição. Estas podem ser gerais, determinando maior crescimento corporal da larva, ou localizadas em campos específicos, ao nível de órgãos, por exemplo, ovários, determinando maior crescimento e diferenciação. O segundo tipo de alterações que parecem acontecer

durante o desenvolvimento de rainhas são alterações “negativas”, de perda, por exemplo, de órgãos coletores de pólen, etc. Tanto as alterações de aquisição quanto estas, poderiam depender do alcance de certo limiar de HJ. Em um caso, os títulos altos deste hormônio determinariam o desenvolvimento do órgão (talvez induzindo a expressão de genes chave), e em outro, estes títulos atuariam inibindo o desenvolvimento (provavelmente, reprimindo a expressão gênica).

Evidências da existência de campos morfogenéticos diferentes no desenvolvimento de castas e do *timing* de determinação em *Apis mellifera* surgiram dos trabalhos de enxerto realizados por Dedej et al. (1998). Estes autores mostraram que o desenvolvimento normal de ovários “tipo rainha” acontece somente quando a transferência de larvas para condições de cria artificial de rainhas é feita entre o primeiro e o segundo estágios larvais. Porém, foi demonstrado que títulos altos de HJ estão associados à prevenção da morte celular programada e a uma maior proliferação celular ao redor do 4^o e 5^o estágios larvais de ovários de rainhas (Schmidt Capella & Hartfelder, 1998, 2002), processos responsáveis pela diferenciação morfológica nos ovários das castas destes insetos.

Por outro lado, estudos da ação dos ecdisteróides nos ovários de larvas de operárias *Apis mellifera* (Hartfelder et al., 1995) mostraram alterações casta-específicas na expressão gênica, com perfis que imitam os encontrados em larvas de rainhas. Experimentos de *differential-display* PCR sugerem, ademais, a expressão diferencial de genes reguladores putativos no desenvolvimento de operárias destes insetos (Hepperle & Hartfelder, 2001).

Todos estes trabalhos mostram o forte papel dos hormônios (fundamentalmente HJ) na determinação do desenvolvimento de estruturas casta-específicas, e seu comprometimento temporal com estes processos. Se nos referirmos à Tabela 1.1, poderemos imaginar a complexidade que significaria

determinar esse sem-número de diferenciações morfológicas, cada uma, possivelmente, relacionada a um campo morfogenético diferente.

1.5.-Considerações sobre receptores nucleares de hormônios

Os hormônios lipofílicos são bons mediadores na regulação da diferenciação celular e no desenvolvimento e na fisiologia de órgãos, devido a características como a capacidade de difundir e de atravessar membranas celulares. Estes hormônios incluem os esteróides, retinóides e hormônios da tireóide. Assim, ao contrário da maioria dos hormônios peptídicos e fatores de crescimento solúveis em água, os quais se ligam a receptores da membrana plasmática, os hormônios solúveis em lipídeos a atravessam e interagem com os seus receptores intracelularmente (em Solomons, 1996; Lewin, 1997; Baker et al., 2000). Trabalhos das duas últimas décadas têm mostrado, ademais, que a maioria destes receptores está associada ao núcleo celular, inclusive na ausência do hormônio (King & Green, 1984; Brink et al., 1992).

Os receptores deste tipo de hormônios compartilham alguns aspectos estruturais/fisiológicos, e, segundo análises comparativas de seqüências de nucleotídeos, possuem diferentes graus de identidade, formando por esta razão a superfamília dos receptores nucleares de hormônios (SRNs). Para fins práticos, esta superfamília foi dividida na família dos receptores de esteróides (ecdisona, estradiol, cortisol, vitamina D, etc.) e a família dos receptores de não esteróides, que incluem os hormônios tireóideos e retinóides (em Mangelsdorf et al., 1995). Ademais, trabalhos de clonagem e sequenciamento identificaram um grande número de genes cuja seqüência apresenta identidade com a superfamília de receptores nucleares, no entanto, como não têm ligandos conhecidos, são denominados "órfãos" (Tsai & O'Malley, 1994).

Os membros da SRN formam complexos homodiméricos e/ou heterodiméricos, que reconhecem seqüências específicas de DNA, os elementos de resposta a hormônios (ERH). Estas seqüências estão espalhadas no genoma e regulam a expressão de genes circundantes em combinação com outros fatores de transcrição. Os ERHs são formados por seqüências específicas ordenadas de maneira direta ou invertida que estão separadas entre si por um número variável de nucleotídeos (Tsai & O'Malley, 1994; Horner et al., 1995).

Análises de disseção mutacional e de seqüência de aminoácidos dos receptores nucleares de hormônios indicam que podem ser subdivididos em 4-5 domínios. O domínio N-terminal A/B, por exemplo, é altamente variável quanto a seqüência e comprimento. Usualmente, este domínio exerce função de transativação, atuando sobre seus genes alvo mediante a interação com componentes do "core" da maquinaria de transcrição ou com coativadores. O domínio C, de 66-68 aminoácidos (o mais conservado evolutivamente) constitui o domínio de ligação ao DNA (DBD) e permite também a dimerização. Este domínio inclui dois *zinc fingers* que são os responsáveis pelo reconhecimento e união do receptor aos ERHs. Dentro do DBD existem duas regiões que conferem ao receptor especificidade para um determinado ERH, a P-box e a D-box, ambas com aminoácidos que determinam as funções do domínio e mostram o maior grau de conservação. O domínio D se localiza *downstream* ao C, permite a alteração na conformação do receptor e possui freqüentemente as funções de localização nuclear e/ou transativação. No extremo C-terminal deste, está localizado o domínio E, o mais longo e encarregado das mais variadas funções, tais como de união a ligande, dimerização, associação a proteínas de choque térmico, transativação, silenciamento, localização nuclear e união ao TFIIB (um fator de transcrição). Finalmente, localizado no extremo C-terminal, alguns receptores apresentam o domínio variável F com função desconhecida até o momento (Hollenberg & Evans,

1988; Evans, 1988; Tsai & O'Malley, 1994; Mangelsdorf et al., 1995; Henrich & Brown, 1995).

Foram identificados mais de 150 membros desta grande família de proteínas, que começou com o isolamento dos cDNAs dos receptores de glicocorticóides e estrógeno, que constituem os primeiros fatores de transcrição para RNA polimerase II a serem clonados (Mangelsdorf et al., 1995). A identificação do receptor de ecdisona como membro desta família (Koelle et al., 1991), deu indícios da universalidade destes receptores entre os animais, sugerindo que o seu aparecimento foi anterior à divergência entre invertebrados e vertebrados. Atualmente sabe-se que o receptor de ecdisona funcional em *Drosophila melanogaster* (DmEcR) é formado pela associação heterodimérica e dinâmica dos produtos dos genes *EcR* e *ultraspiracle (usp)* e que esta associação é promovida por ecdisteróides (Yao et al., 1992; Yao et al., 1993; Hall & Thummel, 1998). Em *Manduca sexta*, o complexo EcR inclui também moléculas protéicas do tipo immunofilina/hsp, que em *Drosophila* atuam como chaperonas na formação do complexo (Gilbert et al., 2000; Song et al., 1997; Arbeitman & Hogness, 2000).

1.6.-Ecdisona, HJ e expressão gênica

Os conhecimentos sobre receptores de esteróides, apresentados brevemente acima, constituem os principais exemplos dos trabalhos realizados desde os clássicos sobre regulação da expressão gênica feitos por Ashburner e col., no início da década do '70, que utilizaram como modelo a indução de pufs em cromossomos politênicos de *Drosophila melanogaster* pela ecdisona (trabalhos prévios já tinham sido feitos em *Chironomus tentans* por Clever & Karlson, 1960). Seus resultados sugeriram que um complexo ecdisona/EcR induziria a expressão de pufs iniciais cujos produtos reprimiriam os correspondentes à intermuda, simultaneamente à repressão, pelo complexo, dos genes tardios. Seguidamente, e em presença

continuada de ecdisona, os produtos dos genes iniciais e iniciais-tardios (além de reprimir sua própria expressão) seriam os responsáveis pela indução dos genes tardios, que por sua vez participariam na consecução da metamorfose (Ashburner et al., 1974; Ashburner, 1974).

As informações sobre receptores obtidas mediante a utilização de técnicas de biologia molecular e estudos com mutantes confirmaram o modelo proposto por Ashburner, embora revelem níveis maiores de complexidade (ver, por exemplo, Huet et al., 1993 e Huet et al., 1995). Assim, resumidamente, no final do último estágio larval e em resposta a um aumento na taxa de ecdisona, ocorre a ativação, pelo complexo EcR/Usp, dos genes iniciais (como *E74A*, *E75A*, *E75B* e *BR-C*), cujos produtos, através de *HR3* (gene inicial-tardio), induzem a expressão de *βftz-f1* (um receptor nuclear órfão) e paralelamente reprimem os correspondentes a EcR/Usp. A presença transitória de β FTZ-F1 (que é reprimido por *E75B+DHR3*) é necessária para que aconteça o desenvolvimento normal da reação ao segundo pulso de ecdisona no estágio de pré-pupa (White et al., 1997), com a participação direta do *BR-C* na ativação dos genes tardios (Crossgrove et al., 1996). Estes dois ciclos de indução estão relacionados respectivamente com eventos de morte celular programada e histólise de tecidos larvais, e com diferenciação celular e morfogênese na transição pré-pupa/pupa (Baehrecke, 1996; Li & Bender, 2000).

Já o HJ é conhecido como hormônio "*status quo*", já que enquanto presente em altos níveis, ele inibe mudanças morfológicas dramáticas próprias do desenvolvimento pós-embrionário de holometábolos (transição larva-pupa e pupa-adulto). Ademais desta função conservadora e das associadas á resposta a diferenciais alimentares durante o desenvolvimento larval de abelhas eussociais mencionadas acima, o HJ atua como hormônio gonadotrópico em algumas

espécies e encontra-se associado a divisão de trabalho em operárias adultas em *Apis mellifera* (Robinson & Vargo 1997).

Mas, apesar de se conhecer bastante sobre os processos dependentes de HJ (ver Riddiford, 1994; Wyatt & Davey, 1996), pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares de sua ação, contrastando com o que acontece com os ecdisteróides. Depois de liberado pelos *corpora allata*, o HJ se liga a proteínas hemolinfáticas, as quais permitem sua mobilização e o protegem da degradação por esterases circulantes. Livre das proteínas de união, o HJ atua sobre células alvo reagindo diretamente com proteínas de membrana plasmática (como no caso das células foliculares de *Locusta migratoria*, Davey & Gordon, 1996) ou através de “receptores” intracelulares característicos de hormônios esteróides (Riddiford, 1994). Mas, apesar de existirem certas evidências relacionadas à primeira via, não se conhece com exatidão as moléculas implicadas na eventual via mediada por receptores. Foram descobertas várias moléculas, normalmente denominadas proteínas de união de HJ, que sugerem ser capazes de ligar HJ e mediar as ações deste hormônio dentro das células, e outras que podem intermediar mais indiretamente estas ações (Palli et al., 1990; Shemshedini et al., 1990; Riddiford, 1994; Palli et al., 1994; Engelmann, 1995; Wyatt & Davey, 1996). Estes últimos autores (Wyatt & Davey), apoiados nos dados mencionados acima e em fatos tais como a característica lipofílica do HJ e a sua capacidade de promover ou reprimir a expressão gênica, sugeriram um modelo de ação para este hormônio que seria semelhante à via dos ecdisteróides. Contudo, seria necessário ainda conhecer a natureza do receptor de HJ, a cascata de reações que o mesmo desencadeia e os produtos gênicos resultantes.

Alguns resultados controversos obtidos a partir de estudos feitos em *Drosophila*, sugerem que Usp liga HJ-III, após o qual homodimeriza e muda a sua conformação ganhando função de ativador da transcrição (Jones & Sharp, 1997;

Jones & Jones, 2000; Jones et al., 2001; Xu et al., 2002; Sasorith et al., 2002). Ademais, o HJ-III pode ligar e ativar o heterodímero formado pelo FXR (receptor ativado pelo ácido farnesóico) e o receptor retinóide X de mamíferos (RXR; Forman et al., 1995).

Considerando que Usp constitui o homólogo do RXR, o qual possui capacidade de ligar 9-*cis* ácido retinóico, nesse trabalho, abordamos a possibilidade de Usp de *Apis mellifera* possuir alguma de suas funções dependentes do HJ e a participação de Usp na mediação dos efeitos deste hormônio em alguns processos relacionados à diferenciação de castas em *Apis mellifera*.

**2. Seqüência de cDNA e resposta a
hormônios morfogenéticos do
ultraspiracle de *Apis mellifera***

2.1.-Introdução

O hormônio juvenil (HJ) e os ecdisteróides, especialmente 20-hidroxiecdisona (20E), controlam muitos aspectos no desenvolvimento dos insetos (Nijhout, 1994). A 20E constitui a chave da cascata de expressão gênica que controla as mudanças sincronizadas próprias das mudas larvais e metamórfica (White et al., 1997; Thummel, 2001a). As ações promovidas pela 20E são mediadas por fatores de transcrição que pertencem à superfamília de receptores de hormônios esteróides (Evans, 1988; Henrich & Brown, 1995; Riddiford et al., 2000). Os membros desta família compartilham uma estrutura modular que inclui basicamente um domínio N-terminal com funções de transativação, um domínio altamente conservado de união a DNA e um domínio C-terminal menos conservado que permite funções de união a ligande e dimerização (Yao et al., 1992). O receptor funcional de 20E de *Drosophila melanogaster* tem sido bastante bem caracterizado e consiste de um heterodimero formado pelos produtos protéicos dos genes *EcR* e *ultraspiracle (usp)* (Oro et al., 1990; Koelle et al., 1991; Yao et al., 1992; Yao et al., 1993; Swevers et al., 1996). Porém, e apesar dos esforços de inúmeros laboratórios, o receptor do HJ não foi ainda identificado. Numa publicação controversa de 1997, Jones & Sharp sugeriram que Usp poderia representar pelo menos um dos receptores do HJ. Mas a pesar das discussões levantadas e os trabalhos sobre o tema, Usp tem sido considerado como componente auxiliar ao EcR no complexo receptor de ecdisona. Mais recentemente, o mesmo grupo de trabalho que sugeriu a possibilidade de Usp ligar HJ mostrou que este fator de transcrição exibe atividade de indutor transcricional independente do EcR, atividade que pode depender de união a ligande (Jones & Jones, 2000; Jones et al., 2001; Xu et al., 2002)

O HJ possui participação fundamental em diversos processos do desenvolvimento e diferenciação de castas em *Apis mellifera*. Assim, com o objetivo de ajudar na compreensão do mecanismo molecular de ação deste hormônio e sua possível relação com o Usp, nós decidimos:

- Determinar a organização aminoacídica do Usp de *Apis mellifera*.
- Identificar o mRNA de *usp* e estimar o número de cópias deste gene no genoma de *Apis mellifera*.
- Avaliar a resposta de *usp* a variações nos níveis dos hormônios juvenil e ecdisona.

2.2.-Resultados

2.2.1.-Análise comparativa do *Ultraspiracle* de *Apis mellifera* (*AmUsp*)

Nós clonamos e sequenciamos o cDNA proveniente do corpo gorduroso de rainhas *Apis mellifera*. A seqüência de aminoácidos deduzida deste cDNA e do proveniente de cérebro de operárias (R. Maleszka, com. pessoal) mostra alta similaridade com a proteína Usp de outros animais (Figura 2.1-2). Esta identidade e sua organização modular sugerem que os cDNAs correspondem a *Ultraspiracle*, um membro da superfamília de receptores nucleares, ortólogo do RXR de vertebrados (Evans, 1988; Henrich & Brown, 1995; Riddiford et al., 2000).

Ambas seqüências foram depositadas no GenBank com os números de acesso AY273778 (corpo gorduroso de rainhas) e AF263459 (cérebro de operárias). O cDNA isolado do cérebro de operárias possui 3754pb, concordando com o tamanho estimado mediante experimentos de *Northern blots* (~4kb, Figura 2.3). Porém, hibridações de membranas com RNA Poli A+ mostram uma banda adicional e maior de ~5kb em amostras obtidas de cabeças de operárias. Isto indica a produção de dois transcritos neste órgão. Como duas bandas de hibridização podem resultar de processamento alternativo (ou do uso de diferentes sítios de origem de transcrição; Keightley, 1998) de um único transcrito originado de um gene de cópia simples ou de transcritos individuais de um gene com mais de uma cópia, nós estimamos o número de cópias de *usp* no genoma de *Apis mellifera* mediante experimentos de digestão-sondagem.

O padrão obtido mediante a utilização de uma sonda que incluía a região menos conservada E/F e parte da extremidade não traduzida 3' mostra uma única banda de hibridação (Figura 2.4). Este resultado sugere que *usp* está presente em cópia simples no genoma desta espécie e que as duas bandas observadas nos *Northern blots* correspondem provavelmente a transcritos alternativos.

A seqüência de ambos cDNAs inclui um ORF de 427 aminoácidos, que representaria um polipeptídio com um peso molecular estimado de 48 kDa e um pI 8.80 (calculado mediante o uso da ferramenta Compute pI/Mw, http://www.expasy.org/tools/pi_tools.html). Este peso molecular é similar aos estimados para o Usp de *Aedes aegypti* (51 e 54kDa, Kapitskaya et al., 1996), *Lucilia cuprina* (51kDa; Hannan & Hill, 2001), *Chilo suppressalis* (47kDa, Minakuchi et al., 2003) e outros animais estudados até o momento.

A seqüência aminoacídica deduzida a partir do cDNA de fêmeas de *Apis mellifera* possui uma organização semelhante à do padrão da superfamília de receptores nucleares (Figura 2.1-2). O domínio N-terminal A/B, normalmente relacionado à função de trans-ativação, atuando sobre seus genes alvo mediante a interação com componentes do *core* da maquinaria de transcrição ou com co-ativadores, possui 109 aminoácidos (aa). Quando considerados os resultados dos alinhamentos múltiplos, claramente o domínio mais variável de todos, tanto em comprimento quanto em seqüência (não mostrado). Mas apesar da pouca conservação estrutural observada, existem alguns blocos de seqüência compartilhados por organismos mais próximos, o qual pode estar indicando uma semelhança funcional. *Apis mellifera*, por exemplo, compartilha a seqüência SPLDMKPDTASLI, na posição 46-58, perto do N-terminal, com *Locusta migratoria* e *Tenebrio molitor*, espécies que se situam juntas em todas as análises filogenéticas que consideram a seqüência aminoacídica de Usp (grupo "ApLoTe"). Aqui chama mais a atenção o fato de estas espécies compartilhar estas seqüências (espécies pertencentes a ordens diferentes e, no caso de *Apis* e *Locusta*, com marcantes diferenças no desenvolvimento pós-embrionário) do que as diferenças aminoacídicas *per se*, em relação a outras espécies, já que, por exemplo, *Drosophila melanogaster* possui outros aminoácidos nestas posições, mas pertencentes aos mesmos grupos. Algo semelhante acontece com as espécies de

lepidóteros (*Bombyx mori*, *Manduca sexta* e *Choristoneura fumiferana*) e de vertebrados (*Homo sapiens* e *Mus musculus*) consideradas neste estudo.

No domínio A/B existe, ademais, um bloco de aa predominantemente neutros (YPPNHPLSGSKHL) compartilhados por todos os insetos e ausente nos vertebrados estudados aqui. Este bloco encontra-se junto ao seguinte domínio (C).

Imediatamente *downstream* do domínio A/B encontra-se o domínio mais conservado C (Figuras 2.2), de união a DNA (DBD), com seus 66 aminoácidos. Neste tipo de moléculas, este domínio está formado por dois dedos de zinco cujas seqüências não são idênticas (*zinc finger* tipo C-4), i.e., o primeiro é um dedo de zinco C-4 típico e o segundo com o número de aa entre cisteínas modificado. No domínio podemos encontrar também as seqüências que conferem especificidade de união a DNA (EGCKG, P-box) e capacidade para dimerizar (REEKS, D-box; ver Figuras 2.1 e 2.5), que se localizam no primeiro e no segundo dedo de zinco respectivamente (Hollenberg & Evans, 1988; Evans, 1988; Tsai & O'Malley, 1994; Mangelsdorf et al., 1995; Henrich & Brown, 1995). No D-box, *Apis mellifera* possui uma serina na última posição quando o resto dos insetos apresenta uma asparagina e os vertebrados estudados um ácido aspártico. Devido à função associada a estes aa, é possível esperar diferenças no tipo de parceiros do Usp/RXR em estas espécies, pelo menos entre insetos e vertebrados (onde há substituição aminoacídica com mudança de característica dos aa).

No domínio C, também, e apesar do alto grau de conservação de seqüência, existem certos aa que não são compartilhados por todas as espécies que foram estudadas aqui, mas sim por alguns "grupos" de espécies, apesar delas não serem próximas considerando a filogenética tradicional. De novo, estas diferenças no uso de aa provavelmente não tenha conseqüências funcionais por elas serem substituições que incluem aa do mesmo grupo (S em lugar de T, M em lugar de C, etc.).

Downstream ao C encontra-se o curto domínio D, com apenas 23aa em *Apis mellifera*. Esta região, que possibilita a atividade homodimérica do α -RXR do homem (Lee et al., 1993) e de localização intranuclear e de transativação (Hollenberg & Evans, 1988; Evans, 1988; Tsai & O'Malley, 1994; Mangelsdorf et al., 1995; Henrich & Brown, 1995), possui uma seqüência consenso de 10aa (REAVQEERQR) presente em todas as espécies consideradas aqui, exceto *Schistosoma mansoni* (utilizado como “grupo externo” nas análises filogenéticas), que apresenta glutamina em lugar de arginina na última posição. Já o resto do domínio D de *Apis mellifera* assemelha-se mais ao do grupo de *Locusta*, *Tenebrio* e vertebrados do que ao resto dos insetos. Inclusive, *Apis* e *Locusta* compartilham 6aa a mais logo após a seqüência mencionada acima.

No extremo C-terminal do Usp está localizado o domínio E, o mais longo, com 229aa em *Apis mellifera* e mais amplamente conhecido como domínio de união a ligande (LBD, apesar de estar associado a uma variedade de funções), devido ao fato de que as espécies que o possuem, ligam-no mediante esta região.

Alinhamentos múltiplos do domínio E oferecem informações interessantes. É um domínio relativamente pouco conservado (ver Figura 2.2), mas apesar disso pode-se apreciar também a estranha formação de quase dois clusters, um formado pelas seqüências de *Apis*, *Tenebrio*, *Locusta* e vertebrados, e o outro pelo resto dos insetos (dípteros e lepidópteros). Isto acontece especialmente devido ao comprimento dos “gaps” em relação à seqüência de *Schistosoma* (o tamanho do LBD do primeiro grupo é em média 41aa menor) e, também, ao uso diferencial de alguns aa que pertencem a diferentes grupos. Uma seqüência conservada já próxima à extremidade C-terminal (AKLLLRLPALR) contribui na capacidade de heterodimerizar (Lee et al., 1998), e está presente inteira no Usp de *Apis mellifera* exceto pela presença de uma isoleucina em lugar de uma leucina na penúltima posição (Figura 2.6, em negrito e itálico).

A última seqüência consenso presente neste tipo de receptor (FLMEMLE) e denominada função de ativação 2 (AF-2; Danielian et al., 1992; Durand et al., 1994; Bourguet et al., 1995), em *Apis mellifera* aparece com apenas uma modificação, valina em lugar da primeira metionina (Figura 2.6, em negrito). Interessantemente, de novo, esta seqüência encontra-se mais conservada no grupo de *Apis*, *Tenebrio*, *Locusta* e vertebrados do que no resto dos insetos.

De entre os 22 resíduos aminoácídicos que no α -RXR humano interagem com o 9-*cis* AR (Sasorith et al., 2002;), encontram-se 19 (Figura 2.6) no Usp de *Apis*, e os 3 restantes são similares. Algo semelhante acontece com o Usp de *Locusta* e *Tenebrio*, mas já em menor medida nos dípteros e lepidópteros, onde estes aa parecem menos conservados.

2.2.2.-Filogenia molecular do AmUsp

As análises realizadas com as seqüências que foram utilizadas nos alinhamentos rendem resultados diferentes de acordo com que região do Usp é considerada. Em todos os casos nós utilizamos o RXR de *Schistosoma mansoni* para estabelecer a raiz da árvore, funcionando assim como grupo externo (utilizamos as seqüências completas depositadas no GenBank e as isoformas alfa dos RXRs).

Quando utilizamos o DBD, um domínio bastante conservado e com claras funções de união a ácidos nucléicos, as árvores obtidas mostram localizações filogenéticas concordantes com as reconhecidas atualmente para os grupos considerados (Figura 2.7A), insetos e vertebrados em ramos separados com altos valores de *bootstrap*. O ramo dos invertebrados não pode ser resolvido muito bem, muito provavelmente pelo insuficiente tamanho das seqüências analisadas. Os DBDs de *Apis mellifera*, *Locusta* e *Tenebrio* (ApLoTe) possuem um 97% de identidade, e aproximadamente 90% quando as comparamos com as do resto de

insetos e vertebrados. Inclusive com o *Schistosoma*, o Usp de *Apis* compartilha mais do que 80% de identidade.

Já quando foram utilizadas nas análises as seqüências dos LBDs, as árvores obtidas mostram surpreendentes anatomias, separando os dípteros e lepidópteros, e colocando *Apis*, *Tenebrio* e *Locusta* no mesmo ramo junto aos vertebrados (com 100% de *bootstrap*, Figura 2.7B). Assim, as maiores similaridades foram encontradas entre o Usp de *Apis* e os ortólogos de *Locusta* (78%), *Tenebrio*, *Homo sapiens* (69%) e *Mus musculus* (68%). As árvores filogenéticas obtidas com as seqüências do Usp inteiro semelham as obtidas com os LBDs, mostrando assim o peso das variações presentes neste domínio sobre a conservação dos DBDs (Figura 2.7C). Estes resultados estão apenas refletindo as diferenças e similitudes nas seqüências discutidas anteriormente.

2.2.3.-Comportamento de usp em animais com níveis aumentados de hormônios morfogenéticos

2.2.3.1.-O HJ aumenta os níveis do transcrito de usp em fêmeas de *Apis mellifera*

Para testar a resposta de *usp* a títulos artificialmente aumentados de HJ nós realizamos experimentos de aplicação deste hormônio *in vivo* e avaliamos a expressão de *usp* mediante RT-PCR semiquantitativa. Aplicamos 10µg de HJ III a rainhas e operárias entre os estágios Pbm-Pbd (ver Tabela 5.1) e determinamos os níveis de expressão de *usp* nos corpos gordurosos, lugar de síntese de vitelogenina. Estes estágios pupais são caracterizados por títulos relativamente baixos de ecdisteróides e um aumento nos de HJ (Rembold, 1987; Pinto et al., 2002). É neste contexto hormonal que acontece o início da expressão de *vg* durante o período pupal destes insetos (Barchuk et al., 2002; Piulachs et al., 2003). Os resultados são apresentados na Figura 2.8. Pupas de ambas castas

evidenciaram um significativo e rápido aumento nos níveis de expressão de *usp* após tratamento (2-4,5h).

Para avaliar a duração desta resposta nós realizamos experimentos semelhantes, mas coletando amostras 2,5, 12 e 24h após o tratamento hormonal (experimentos independentes, com todas as amostras tomadas em Pbd, 10h antes da emergência do adulto). Apesar da resposta na expressão de *usp* ser rápida, não parece durar muito tempo, já que não podemos detectar diferenças nos níveis de transcrito entre os animais tratados e os controle 12h após a aplicação de HJ (Figura 2.9). Ademais, pequenas quantidades de HJ aplicadas em operárias recém-nascidas não parecem ter muito efeito na expressão de *usp*, exceto um pequeno aumento do transcrito em amostras tomadas de cabeças 24h após tratamento (Figura 2.9).

Outra maneira de avaliar a resposta de *usp* à variação de títulos de HJ seria aumentar de maneira endógena a concentração deste hormônio. Experimentos preliminares realizados em nosso Laboratório demonstraram que operárias adultas *knock-down* para *vg* (KDvg) apresentavam títulos de HJ maiores que as controle. Se *usp* respondesse a HJ, as abelhas KDvg deveriam apresentar maior expressão de *usp*. Assim, em nosso experimento de KDvg, foram primeiramente avaliados os níveis de expressão de *vg* e os títulos de HJ. As restantes medições foram realizadas com as amostras vindas de abelhas comprovadamente *knock-down* (KDvg), que, invariavelmente, possuíam altos títulos de HJ. O experimento contou, ademais, com dois grupos controle, um constituído por abelhas injetadas com água estéril (C1) e o outro com abelhas injetadas com água estéril previamente tratada com dietil-pirocarbonato (C2). Em alguns casos, as abelhas pertencentes a este último grupo apresentaram significativas variações nos graus de KDvg. Foram analisados, também, os níveis de expressão de dois outros genes (*βactina* e *ftz-f1*). *Actina* foi escolhido como controle da quantidade das amostras utilizadas nos

experimentos, e *ftz-f1* a maneira que permita um controle entre as relações internas entre *vg*, HJ e *usp*. Os resultados deste experimento estão resumidos na Figura 2.10, e confirmaram a relação entre níveis de Vg e títulos de HJ, e entre títulos de HJ e níveis de expressão de *usp* de *Apis mellifera*.

2.2.3.2.-*usp* não parece responder a 20E no corpo gorduroso de *Apis mellifera*

Como Usp constitui o parceiro de EcR no complexo receptor de ecdisona em *Drosophila melanogaster*, e como o perfil de expressão de seu mensageiro em operárias de *Apis mellifera* lembra o perfil do título de ecdisteróides nesta casta (ver próximo capítulo; Pinto et al., 2002), era esperado que *usp* aumentasse sua expressão sob a influência de 20E exógena. Para testar isto, nós injetamos 5µg de 20E em Pb-Pbl (caracterizadas por possuir títulos de 20E em queda) e tomamos amostras de RNA dos corpos gordurosos 1,5h, 24h e 48h após o tratamento. Surpreendentemente, não observamos aumento na expressão de *usp* nos animais submetidos a 20E exógena (Figura 2.11). Pelo contrário, os animais apresentaram uma diminuição, apesar de estatisticamente não significativa, nos níveis de expressão de *usp* após 24h do tratamento (Figura 2.12).

1 - ATGATGAAGAAGGAGAAAACCGATGATGTCGGTGACCGCCATCATCCAAGGGACTCAGGCC - 60
 - M M K K E K P M M S V T A I I Q G T Q A
 61 - CAACATTGGTCCCCTGGCAACACTTGGCTAAGTCTGGACAACAGCAACATGTCCATGTCC - 120
 - Q H W S R G N T W L S L D N S N M S M S
 121 - TCAGTGGGCCCCGAAAGTCCACTGGACATGAAGCCCGACACAGCAAGCCTCATCAACCCC - 180
 - S V G P Q S P L D M K P D T A S L I N P
 181 - GGAAACTTCAGTCCTTCCGGCCCCAACAGCCCGGATCCTTACCAGCTGGTTGTACAGC - 240
 - G N F S P S G P N S P G S F T A G C H S
 241 - AACCTTCTAAGTACGTGCGCCGAGTGGCCAGAACAAGCAGTCCGACCCTACCCGCCGAAC - 300
 - N L L S T S P S G Q N K A V A P Y P P N
 301 - CACCCTCTCTCCGGAAGTAAGCACCTCTGCTCGATTGCGGTGACCGTGCCAGTGGCAAG - 360
 - H P L S G S K H L **C S I C G D R A S G K**
 361 - CATTATGGTGTCTATAGCTGCGAGGGTTGCAAAGGATTTTTCAAGAGGACCGTGGCAAG - 420
 - **H Y G V Y S C E G C K G F F K R T V R K**
 421 - GACCTGTCGTACGCGTGTGCGAAGAGAAATCCTGCATCATTGACAAACGGCAGAGAAAT - 480
 - **D L S Y A C R E E K S C I I D K R Q R N**
 481 - CGATGTGAGTATTGCAGATACCAGAAATGCCTGGCGATGGGAATGAAGAGAGAGGCGGTC - 540
 - **R C Q Y C R Y Q K C L A M G M K R E A V**
 541 - CAAGAGGAACGTCAACGTACCAAGGAAAGGGATCAGAGCGAGGTTGAGAGCACTAGTAGC - 600
 - **Q E E R Q R T K E R D Q S E V E S T S**
 601 - CATTTCGGACATGCCGATCGAGCGTATCCTGGAGGCCGAGAAGAGAGTCCGAATGTAAG - 660
 - L H S D M P I E R I L E A E K R V E C K
 661 - ATGGAGCAACAGGGAATACGAGAATGCAGTGTGCGACATTGCAACGCCACGAACAAA - 720
 - M E Q Q G N Y E N A V S H I C N A T N K
 721 - CAGCTGTCCAGCTGGTAGCATGGGCGAAAACACATCCCGCATTTTACCTCGTTGCCACTG - 780
 - Q L F Q L V A W A K H I P H F T S L P L
 781 - GAGGATCAGGTACTTCTGCTCAGGGCCGGTTGGAACGAGTTGCTGATAGCCTCCTTTTCC - 840
 - E D Q V L L L R A G W N E L L I A S F S
 841 - CACCGTTCATCGACGTGAAGACGGTATCGTGTGGCGACGGGGATCACCGTGCATCGG - 900
 - H R S I D V K D G I V L A T G I T V H R
 901 - AACTCGGCGCAGCAGGCCGGCGTGGGCACGATATTCGACCGTGTCTCTCGGAGCTTGTC - 960
 - N S A Q Q A G V G T I F D R V L S E L V
 961 - TCGAAAATGCGTGAATGAAGATGGACAGGACAGAGCTTGGCTGTCTCAGATCTATAATA - 1020
 - S K M R E M K M D R T E L G C L R S I I
 1021 - CTCTTCAATCCCGAGGTTTCGAGGACTGAAATCCATCCAGGAAGTGACCTGTCTCCGTGAG - 1080
 - L F N P E V R G L K S I Q E V T L L R E
 1081 - AAGATCTACGGCGCCCTGGAGGGTTATTGCCGCTAGCTTGGCCCGACGACGCTGGAAGA - 1140
 - K I Y G A L E G Y C R V A W P D D A G R
 1141 - TTCGCGAAATTACTTCTACGCTGCCCGCCATCCGCTCGATCGGATTAAGTGCCTCGAG - 1200
 - F A K L L L R L P A I R S I G L K C L E
 1201 - TACCTGTCTTCTTCAAAATGATCGGTGACGTACCGATCGACGATTTTCTCGTGGAGATG - 1260
 - Y L F F F K M I G D V P I D D **F L V E M**
 1261 - TTAGAATCGCGATCAGATCCT - 1281
 - **L E S R S D P**

Figura 2.1.- Sequências nucleotídica do cDNA e aminoacídica do Usp de fêmeas de *Apis mellifera*. Os resíduos pertencentes ao domínio conservado C (DBD) estão sombreados e os correspondentes ao domínio D estão sublinhados. Os primeiros e os últimos resíduos pertencem aos domínios A/B e E/F respectivamente. Os números nas margens correspondem à seqüência do cDNA. Sequências de aminoácidos conservadas estão em **negrito e itálico**.

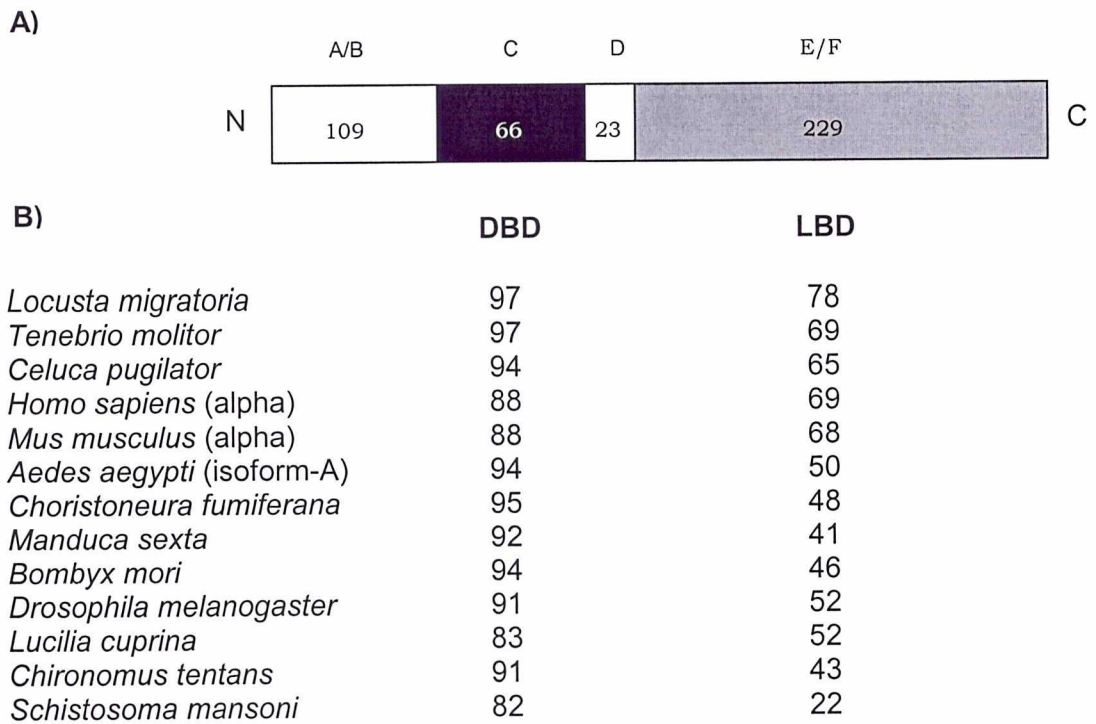


Figura 2.2.-Representação esquemática da organização do AmUsp indicando o número de aminoácidos em cada domínio (A) e as percentagens de identidade de resíduos aminoacídicos de vários DBDs e LBDs relativos aos do AmUsp (B). As seqüências de cDNA (de corpo gorduroso de rainhas e cérebro de operárias) foram depositadas no GenBank sob os números de acesso AY273778 e AF263459, respectivamente. Lm=AF136372; Tm=AJ251542; Cp=AF032983; Hs=NM_002957; Mm=XM_123763; Aa=AF305213; Cf=AF016368; Ms=U44837; Bm=U06073; Dm=X53417; Lc=AY007213; Ct=AF045891; Sm=AF158102.

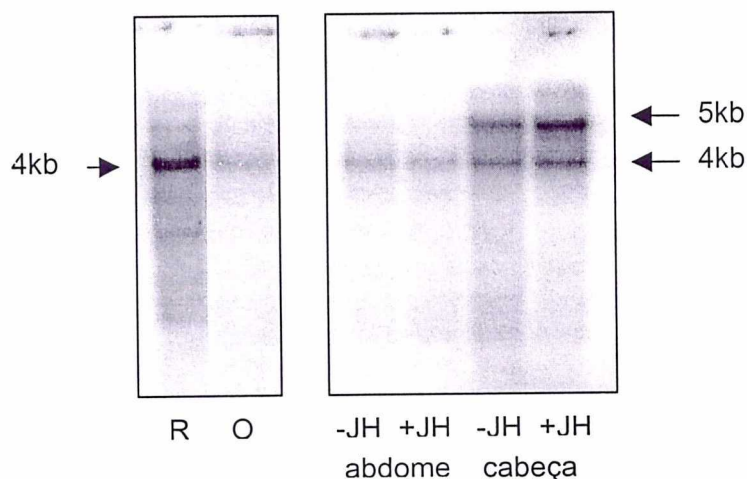


Figura 2.3.-Análise por *Northern blot* mostrando tamanhos moleculares dos transcritos de *usp* em fêmeas de *Apis mellifera*. À esquerda, RNA poli A+ (10µg) de abdome de rainhas (R) e operárias (O). À direita, RNA poli A+ de operárias tratadas com HJ (1µg).

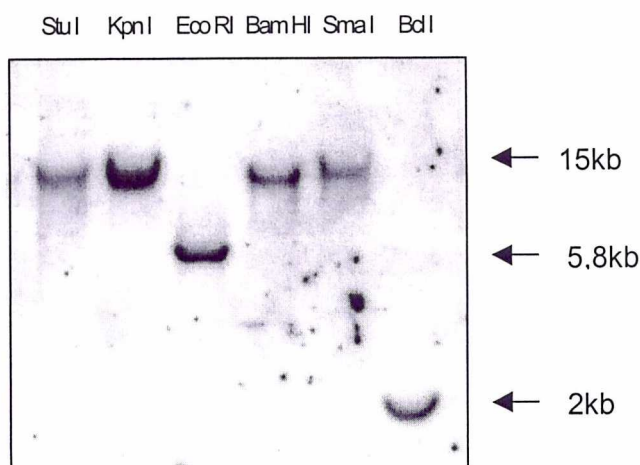


Figura 2.4.-Estimativa por *Southern blot* do número de cópias de *usp*. Trinta μ g de DNA genômico foram digeridos com as endonucleases indicadas acima. A membrana foi hibridada com uma sonda luminescente de 850pb correspondente à extremidade 3' do cDNA de *usp* de *Apis mellifera*.

Homo	CAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYTCRDNKDCLIDKQRNRCQYCRYQK
Mus	CAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYTCRDNKDCLIDKQRNRCQYCRYQK
Apis	CSICGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLSYACREEKSCIIDKQRNRCQYCRYQK
Tenebrio	CSICGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLSYACREEKNCIIDKQRNRCQYCRYQK
Locusta	CSICGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLSYACREDKNCIIDKQRNRCQYCRYQK
Celuca	CSICGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYACREERSCTIDKQRNRCQYCRYQK
Bombyx	CSICGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYACREDKNCIIDKQRNRCQYCRYQK
Aedes	CSICGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLSYACREDKNCIIDKQRNRCQYCRYQK
Manduca	CSICGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYACREDRNCIIDKQRNRCQYCRYQK
Lucilia	CSICGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYACREDRNCIIDKQRNRCQYCRYQK
Drosophila	CSICGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYACRENRCIIDKQRNRCQYCRYQK
Choristoneura	CSICGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLSYACREERNCIIDKQRNRCQYCRYQK
Chironomus	CSICGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLSYACREERNCVIDKQRNRCQYCRYQK
Schistosoma	CSICSDRASGKHYGVFSCEGCKGFFKRTVRKELTYICRDSQECQIDKRLRNRCQYCRYQK
Homo	CLAMGM
Mus	CLAMGM
Apis	CLAMGM
Tenebrio	CLNMGM
Locusta	CLAMGM
Celuca	CLTMGM
Bombyx	CLACGM
Aedes	CLACGM
Manduca	CLACGM
Lucilia	CLACGM
Drosophila	CLTCGM
Choristoneura	CLACGM
Chironomus	CLNCGM
Schistosoma	CLRAGM

Figura 2.5.-Alinhamento das seqüências aminoacídicas do DBD de *Usp/α-RXR* de crustáceo, dípteros, lepidópteros, vertebrados e platelminto. Boxes cinzas indicam aminoácidos idênticos. Os nomes científicos completos e os números de acesso no GenBank estão na Figura 2.2.


```

Bombyx      FLNDERENVNVD-----
Manduca     YLTDERENVNVD-----
Choristoneura YLEDERENGDDG-----
Drosophila  SLDDGGAGGGGGG-----LG
Lucilia     SLDAEYASPG-----TV
Aedes       YIETERSSDG-----
Chironomus  YVEPDRRNADG-----
Locusta     VKDG-----
Apis        VKDG-----
Tenebrio    AQDA-----
Homo        VKDG-----
Mus         VKDG-----
Celuca      VEDG-----
Schistosoma DHKPRSLSTSNSTSKLPDPTTPTINSTDISNITDDPPENSISDISKDCITIQMKKIKSVPLD
    
```

```

Bombyx      -----SRNTAPPQLICLMPGMLHRNSALQAGVGQIFDR-----VLS
Manduca     -----SRSTAPPQLMCLMPGMLHRNSALQAGVGQIFDR-----VLS
Choristoneura -----TRSTTQPQLMCLMPGMLHRNSAQQAGVGAI FDR-----VLS
Drosophila  HDGSFERRSPGLPQQLFLNQSFYSYHRNSAIKAGVSAIFDR-----ILS
Lucilia     HDGSFGRRSVPVRQPQLFLNQSFYSYHRNSAIKANVVSIFDR-----ILS
Aedes       -----SRITVRQPQLMCLGPNFTLHRNSAQQAGVDTL FDR-----ILC
Chironomus  -----SLERRQISQQMCLSRNYTLGRNMAVQAGVVQIFDR-----ILS
Locusta     -----IVLATGLTVHRNSAHQAGVGTFIFDR-----VLT
Apis        -----IVLATGITVHRNSAQQAGVGTFIFDR-----VLS
Tenebrio    -----IVLATGLTVNKTSAHAVGVGNIYDR-----VLS
Homo        -----ILLATGLHVHRNSAHSAGVGAI FDR-----VLT
Mus         -----ILLATGLHVHRNSAHSAGVGAI FDR-----VLT
Celuca      -----IVLATGLVIHRSSAHQAGVGAI FDR-----VLS
Schistosoma EKMDYYSNFPEFHLLNNTKPMDNNDNISSSKPTNINDNSVDDDMIRKRNTNVYKLIY
                ***          *      *
    
```

```

Bombyx      ELSLKMRSRLMDQAEVAKAI ILLNPDVKGLKN--KQEVVVLREKMFCLDEYCRRSRG
Manduca     ELSLKMRTLRLMDQAEYVALKAI ILLNPDVKGLKN--KPEVVVLRKMFSCLEDEYVRRSRG
Choristoneura ELSLKMRTLRLMDQAEYVALKAI VLLNPDVKGLKN--RQEVVVLREKMFSCLEDEYCRRSRG
Drosophila  ELSVMMKRLNLDRELSCLKAI ILYNPDIRGIKS--RAEIEMCREKVYAACLEDEHCRLEHP
Lucilia     ELSIKMKRLNIDRELSCLKAI ILFNPDIRGLKC--RADVEVCREKIYAACLEDEHCRTEHP
Aedes       ELGKMKRDLVTRAEGLVKA I ILFNPDIRGLKC--QKEIDGMREKIYAACLEDEHCKQQHP
Chironomus  ELSVMMKRLDLDATLCLLSI VVFNPDVTRLDD--RKSIDLRSRIYASLDEYCRQKHP
Locusta     ELVAKMREMKMDKTELGC LRSI ILFNPEVRLGKS--AQEVVLLREKVYAAL EYTRTTTHP
Apis        ELVSKMREMKMDRTELGC LRSI ILFNPEVRLGKS--IQEVVLLREKIYGALEGYCRVAVP
Tenebrio    ELVSKMREMKMDKTELGC LRSI ILYNPTCRGIKS--VQEVVLLREKIYGVLEEYTRTTTHP
Homo        ELVSKMRDMQMDKTELGC LRSI VLFNPD SKGLSN--PAEVEALREKVYASLEAYCKHKYP
Mus         ELVSKMRDMQMDKTELGC LRSI VLFNPD SKGLSN--PAEVEALREKVYASLEAYCKHKYP
Celuca      ELVAKMKEMKIDKTELGC LRSI VLFNPD AKGLNC--VNDVEILREKVYAAL EYTRTTTYP
Schistosoma NLAIKLRMLNLDPELGLCL ILLNPD SMTCLNNSRLIELLDQVYAGLEYYCQVWP
                *
    
```

```

Bombyx      -GEEGRFAALLRLPALRSISLKSFEHLYFHLVAEGSVSSYIRDALCNHAPP-----
Manduca     -AEEGRFAALLRLPALRSISLKSFEHLYFFHLVADTSIASYIHDALRNHAPS-----
Choristoneura -NEEGRFASLLRLPALRSISLKSFEHLYFFHLVAEGSISGYIREALRNHAPP-----
Drosophila  -GDDGRFAQLLRLPALRSISLKCQDHLFLFRITSDRPLEELFLEQLEAPPPP-----
Lucilia     -GDDGRFAQLLRLPALRSISLKC L D H L F F F R L I G E R A L E E L I A E Q L E A P I C -----
Aedes       -SEDGRFAQLLRLPALRSISLKC L D H L N F I R L L S D K H L D S F I V E M L D M P I -----
Chironomus  -NEDGRFAQLLRLPALRSISLKC L D H L F Y F Q L I D D K N V E N S V I E E F H K L N -----
Locusta     -DEPGRFAKLLRLPSLRSI GLKCLEHLFFFRLIGDVPI D T F L M E M L E S P S D S -----
Apis        -DDAGRFAKLLRLPALRSI GLKCLEYLF F F F K M I G D V P I D D F L V E M L E S R S D P -----
Tenebrio    -NEPGRFAKLLRLPALRSI GLKCEHLFFFKLI G D V P I D T F L M E M L E S P A D A -----
Homo        -EQPGRFAKLLRLPALRSI GLKCLEHLFFFKLI G D T P I D T F L M E M L E A P H Q M -----
Mus         -EQPGRFAKLLRLPALRSI GLKCLEHLFFFKLI G D T P I D T F L M E M L E A P H Q A -----
Celuca      -DEPGRFAKLLRLPALRSI GLKCLEYLF F F F K L I G D T P L D S Y L M K M L V D N P N T S V T P P T S -----
Schistosoma NAPHGRMGRLLKLSNFQSVARIEKLI CSNELNLLNLLNLESIFS YLSKSKKVD-----
    
```

Figura 2.6.-Alinhamento das seqüências aminoácidas do LBD de Usp/ α -RXR de insetos, dípteros, lepidópteros, vertebrados e platelminto. Boxes cinzas indicam aminoácidos idênticos. *: posição de resíduos que interagem com o 9-*cis* AR no α -RXR humano. Os nomes científicos completos e os números de acesso no GenBank estão na Figura 2.2.

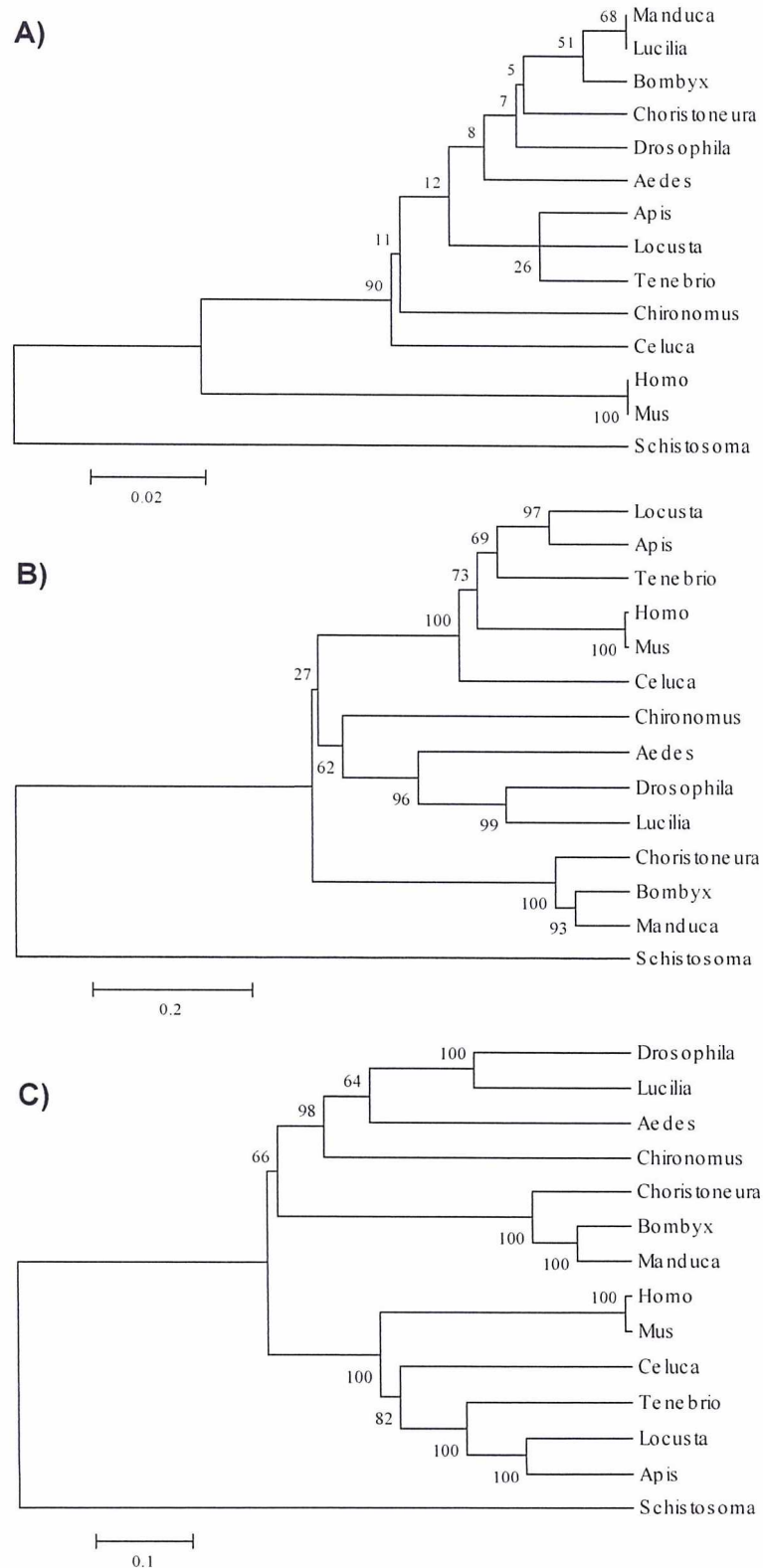


Figura 2.7.-Árvores filogenéticas obtidas por UPGMA das seqüências aminoácidas do DBD (A), LBD (B) e da proteína Usp inteira (C). Estas análises foram realizadas usando MEGA version 2.1 (Kumar et al., 2001). Os nomes científicos completos e os números de acesso no GenBank estão na Figura 2.2.

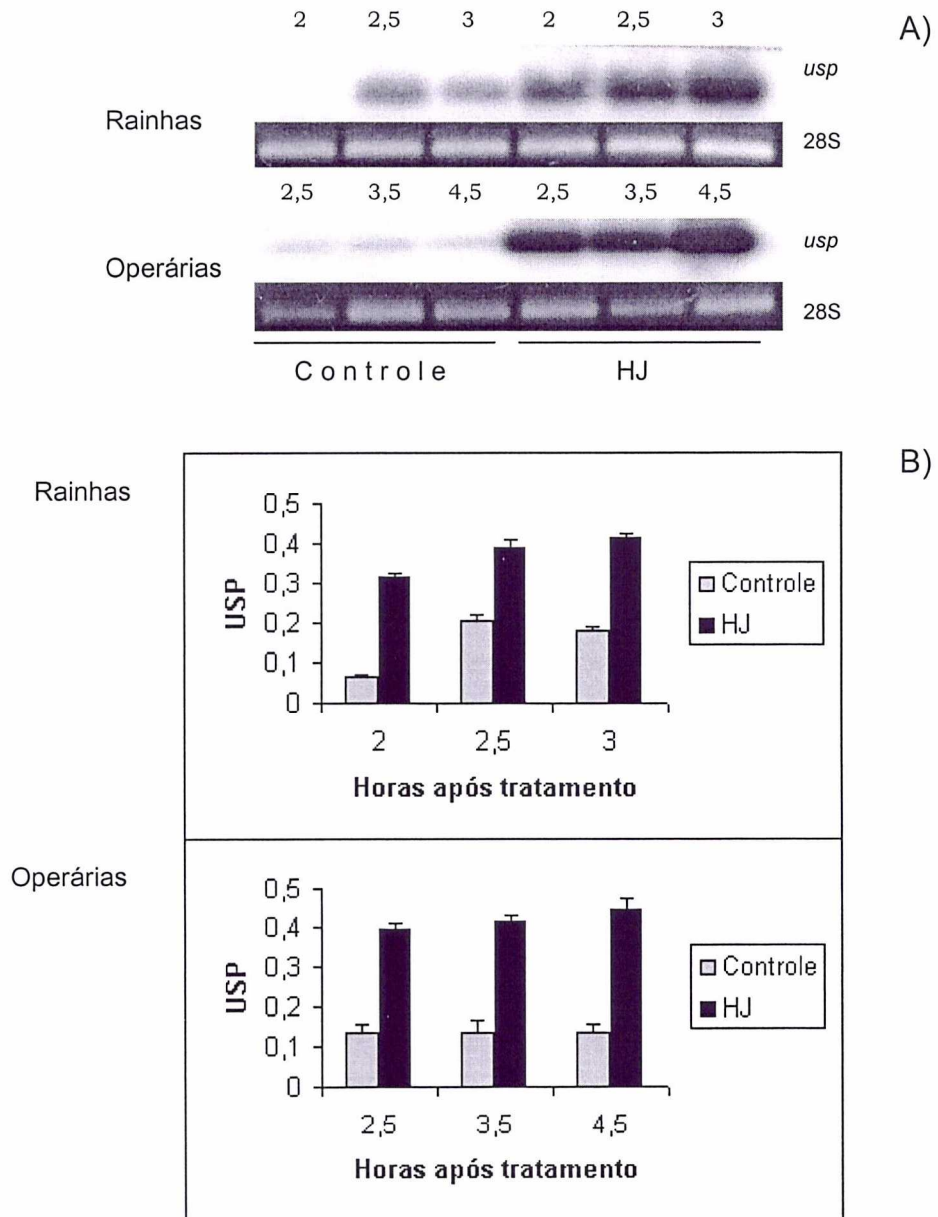


Figura 2.8.- Expressão de *usp* após o tratamento de pupas (Pbm-Pbd) de rainhas e operárias de *Apis mellifera* com HJ (10 μ g). A) Exemplo de análise por RT-PCR/Southern blot. 28S: bandas em géis de agarose corados com brometo de etídio correspondentes ao produto de amplificação do rDNA de 28S utilizado como controle. Números indicam horas após tratamento. B) Representação gráfica dos valores densitométricos correspondentes às bandas de *usp* de dois experimentos.

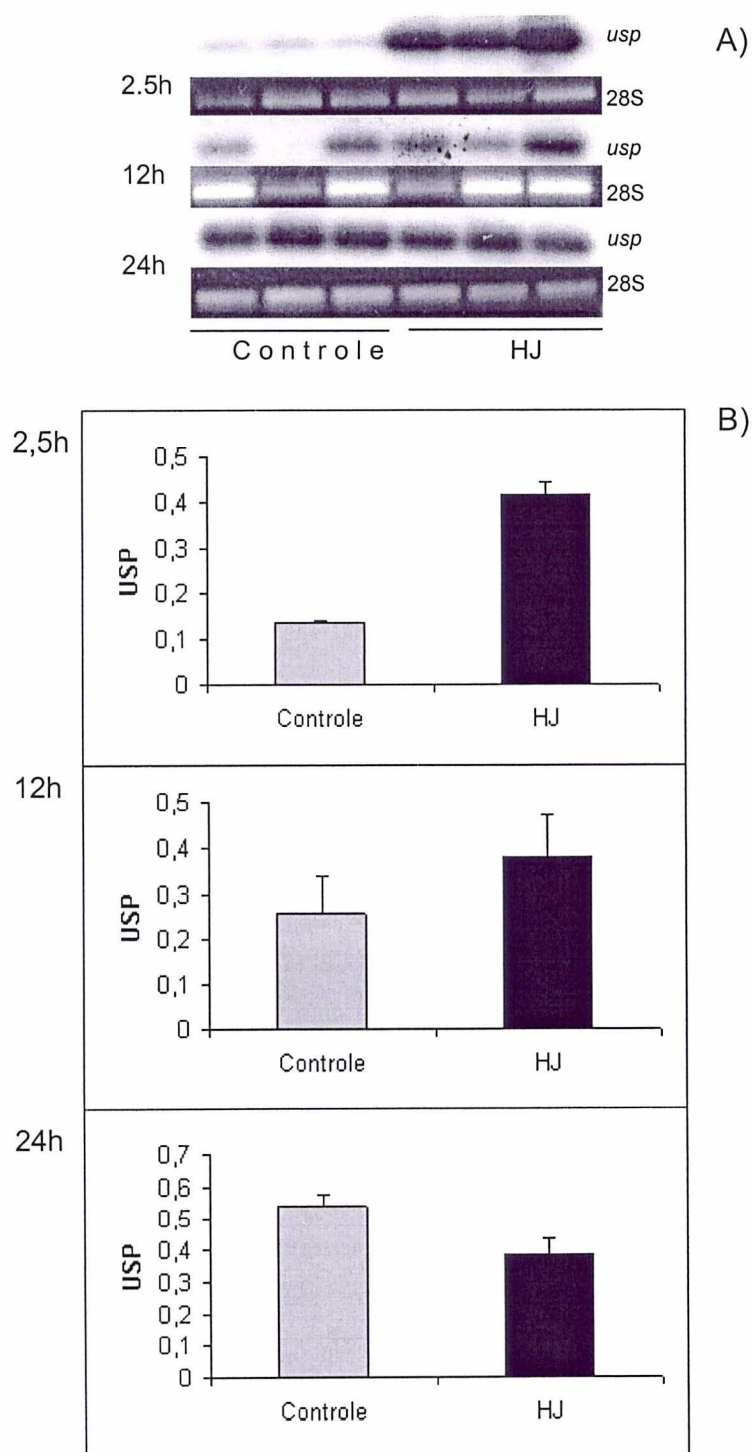


Figura 2.9.- Resposta na expressão de *usp* de pupas de operárias de *Apis mellifera* após o tratamento (2,5, 12 e 24h) com 10µg de HJ. A) Exemplo de análise por RT-PCR/Southern blot. 28S: bandas em géis de agarose corados com brometo de etídio correspondentes ao produto de amplificação do rDNA de 28S utilizado como controle. Duração de tratamentos em horas. B) Representação gráfica dos valores densitométricos correspondentes às bandas de *usp* de dois experimentos. Todas as amostras foram tomadas de pupas Pbm-Pbd.

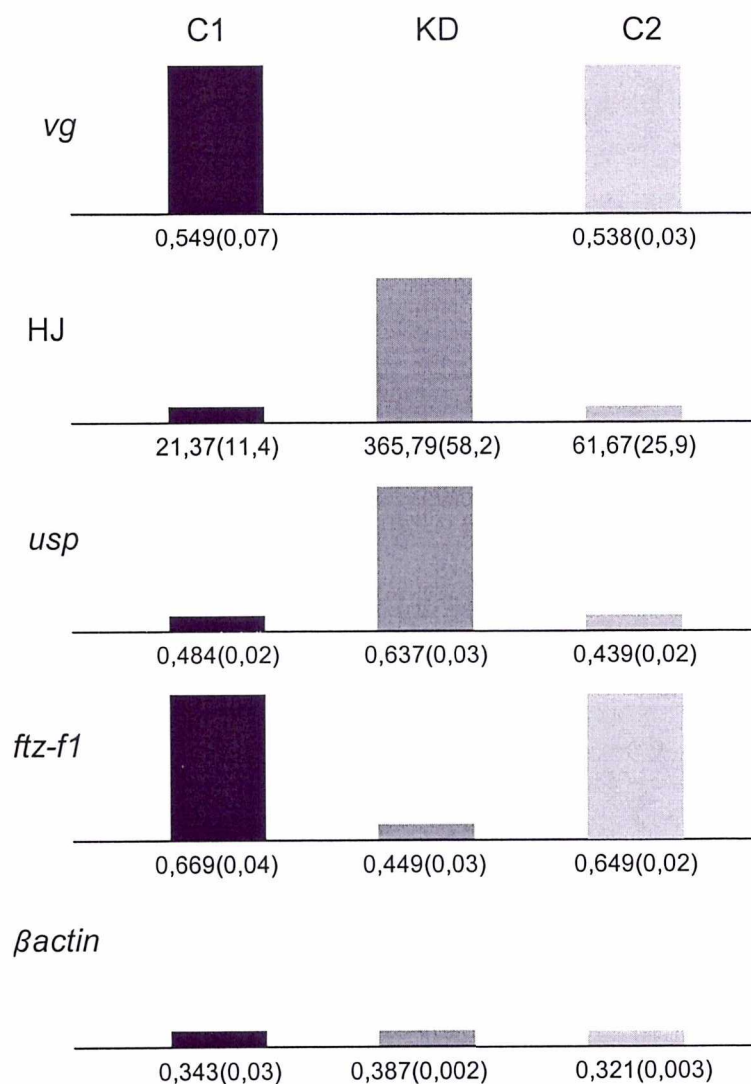


Figura 2.10.- Resumo esquemático dos resultados do experimento de *knock-down* de *vg*. O tamanho das barras é arbitrário. Os valores embaixo de cada barra correspondem à média de 2-4 medições (entre parêntesis: erro padrão). Os valores de expressão gênica estão representados por unidades densitométricas correspondentes a bandas de amplificação por RT-PCR semiquantitativa do respectivo cDNA (experimentos independentes). Os títulos de HJ estão em $\text{pg}/\mu\text{l}$. C1 e C2=controles; KD=*knock-down*. *vg*: $P < 0.001$; HJ: $P = 0.02$; *usp*: $P = 0.007$; *ftz-f1*: $P = 0.004$ test-t.

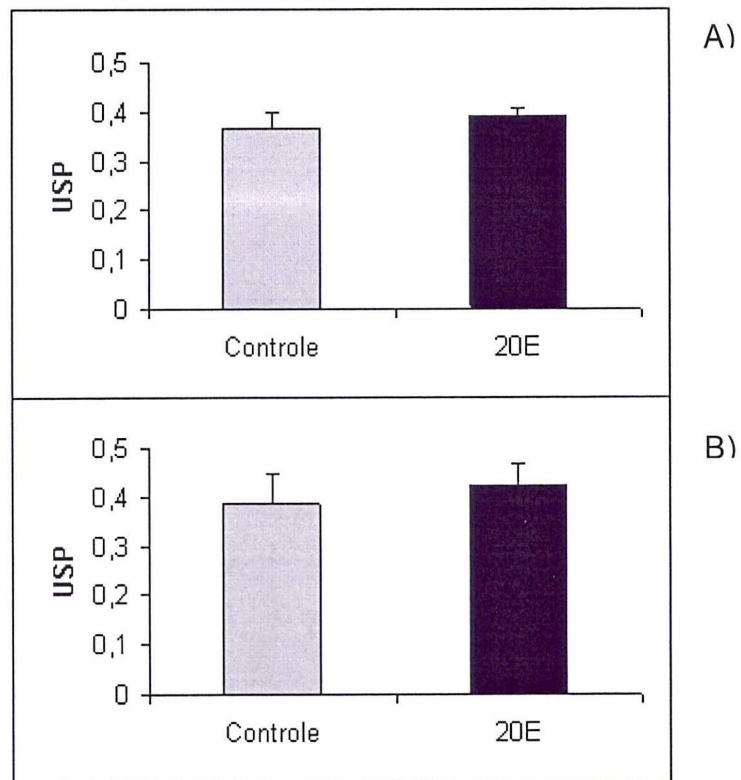


Figura 2.11.- Resposta na expressão de *usp* de pupas (PbI) de fêmeas de *Apis mellifera* logo após o tratamento (1,5h) com 5µg de 20E. A) Rainhas, B) Operárias. Representação gráfica dos valores densitométricos correspondentes às bandas de *usp* de dois experimentos.

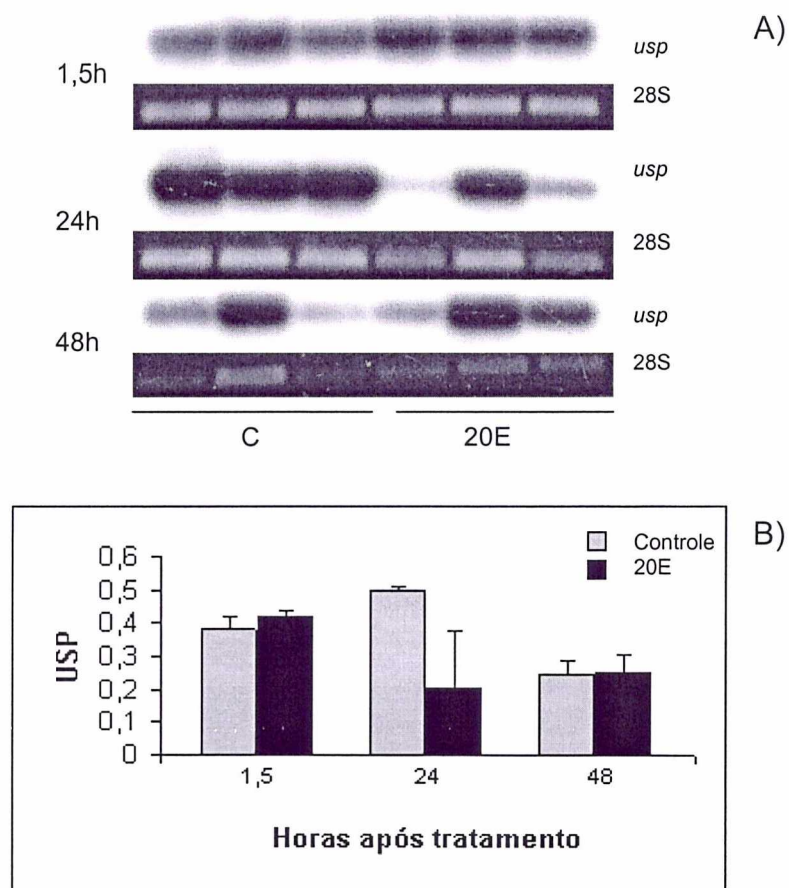


Figura 2.12.- Resposta na expressão de *usp* de pupas de operárias de *Apis mellifera* após o tratamento (1,5, 24 e 48h) com 5 μ g de 20E. A) Exemplo de análise por RT-PCR/Southern blot. 28S: bandas em géis de agarose corados com brometo de etídio correspondentes ao produto de amplificação do rDNA de 28S utilizado como controle. C: Controle, 20E: Tratado com 20E. B) Representação gráfica dos valores densitométricos correspondentes às bandas de *usp* de dois experimentos. Todas as injeções foram feitas em pupas Pb-Pbl.

2.3.-Discussão

2.3.1.- Organização estrutural e filogenia molecular funcional do Usp de *Apis mellifera* (*AmUsp*)

O alto grau de identidade do AmUsp com os ortólogos de outras espécies animais e a organização protéica determinada por análises *in silico* indicam que AmUsp é um membro da superfamília de receptores nucleares, especificamente um ortólogo do RXR de vertebrados (Evans, 1988; Henrich & Brown, 1995; Riddiford et al., 2000).

Assim como em outras espécies de insetos, em *Apis mellifera*, um gene de cópia simples dá origem a mais de um transcrito. As duas bandas de hibridação observadas em amostras provenientes de cabeças de operárias e a banda simples detectada em amostras de abdômes sugerem um padrão de expressão diferencial nestes órgãos, resultando, provavelmente, do processamento alternativo do transcrito original (análises *in silico* preliminares indicam que o mRNA de 4kb estudado encontra-se espalhado por aproximadamente 15kb de DNA genômico). Em *Aedes aegypti* (Kapitskaya et al., 1996), *Manduca sexta* (Jindra et al., 1997; Asahina et al., 1997) e *Chironomus tentans* (Vogtli et al., 1999), processamentos alternativos produzem isoformas de Usp que diferem na seqüência da região N-terminal do domínio A/B. Em *Bombyx mori*, porém, um polipeptídeo único é produzido apesar de ocorrer múltiplos transcritos que diferem na região não traduzida (Tzertzinis et al., 1994).

Ao contrário do seu homólogo em vertebrados, RXR, não se tinha ainda descoberto um ligante para Usp, e este era considerado um receptor nuclear órfão. Ademais, experimentos de difração de raios X e modelagem molecular de Usp/RXR sugeriam um LBD de Usp de dípteros e lepidópteros incapaz de atuar mediante ligante, por possuir seqüências conservadas (sendo FLRVGP a maior) que determinariam uma conformação “antagônica” bastante forte (prevenindo a união

de co-ativadores), caso em que a união de ligande não faria sentido (Clayton et al., 2001; Billas et al., 2001).

Porém, Usp de *Apis mellifera* possui algumas características que podem permitir atividades dependentes de união de ligande. Em primeiro lugar, sua seqüência é muito similar ao RXR de vertebrados, o qual liga 9-*cis* ácido retinoico (Mangelsdorf et al., 1992; Chambon, 1996), uma molécula com parecido estrutural com o HJ. Esta semelhança se reflete na topologia das árvores obtidas a partir da análise do LBD ou da proteína inteira do AmUsp. Em ambos casos AmUsp forma um cluster com os Usp de *Locusta*, *Tenebrio*, *Celuca* e os RXRs de *Homo sapiens* e *Mus musculus*. Estas espécies formam claramente um grupo separado, apesar da distância filogenética existente entre artrópodos e vertebrados. Ademais, o AmUsp possui 19 dos 22 aminoácidos presentes no RXR α humano que conferem capacidade de ligar 9-*cis* ácido retinóico (Bourguet et al., 1995; Sasorith et al., 2002), sendo os três restantes substituições conservadas. Finalmente, Usp de *Apis mellifera* possui a seqüência consenso FLMEMLE, denominada função de ativação 2 (AF-2; Danielian et al., 1992; Durand et al., 1994; Bourguet et al., 1995). Em receptores nucleares dependentes de ligande, esta seqüência constitui o sítio de união de moléculas co-reguladoras que possuem o domínio LxxLL (Danielian et al., 1992; Durand et al., 1994; em Glass & Rosenfeld, 2000).

A confirmação relativamente recente de que Usp, pelo menos de *Drosophila*, e tal vez de *Heliothis virescens* (com os quais se fizeram estudos de cristalografia e modelagem), liga HJ-III, após o que homodimeriza e muda a sua conformação ganhando função de ativador transcricional (Jones & Sharp, 1997; Jones & Jones, 2000; Jones et al., 2001; Xu et al., 2002; Sasorith et al., 2002), levanta dúvidas sobre o significado da semelhança nas seqüências do LBD dentro do "grupo" de *Apis*. Se este grupo possui também como receptor de HJ a Usp, qual é o significado da semelhança estrutural? Uma explicação plausível seria a existência

de mais de um ligande, cada um com diferentes afinidades pela sua proteína de união. Neste modelo Usp atuaria como uma proteína multifuncional, dependente de contexto e de tipo de ligande. Um estudo relativamente recente feito com o LBD do RXR α humano revelou que este fator de transcrição liga de maneira específica dois compostos não relacionados quimicamente, o ácido deca-hexanóico, presente em células de mamíferos e recentemente identificado como um potencial ligande endógeno do RXR em cérebros de camundongos, e o ligande sintético BMS 649. Em ambos casos, os LBD-RXRs homodimerizam e exibem uma conformação ativa previamente observada com 9-*cis*-AR (Egea et al., 2002). Ademais, estudos cristalográficos levados a cabo com o Usp de *Drosophila melanogaster* e *Heliothis virescens* sugerem a possibilidade de que este fator de transcrição possa ligar moléculas lipídicas como el diacilglicerol e vários fosfolipídios (Clayton et al., 2001; Billas et al., 2001), além de ligar HJ (Jones & Sharp, 1997; Jones & Jones, 2000; Jones et al., 2001; Xu et al., 2002). Assim, o grupo ApLoTe poderia não somente compartilhar um ligande (por exemplo o HJ) com o resto de artrópodos, mas também poderia possuir mais de um ligande, cada um com seu respectivo nível de afinidade. Estes ligandes poderiam ser, por exemplo, metabólitos do HJ-III, a única forma de HJ conhecida em *Apis mellifera* (Hagenguth & Rembold, 1978). Existem vários destes metabólitos e precursores, tais como o farnesol, o ácido farnesóico, o metil-farnesoato e o ácido do HJ. Este último composto (e não o HJ) tem sido demonstrado possuir função hormonal na indução de competência para a transcrição de *vg* durante o desenvolvimento pós-embriônico de *Manduca sexta* (Ismail et al., 1998).

Ademais, uma nova forma de Usp tem sido recentemente descoberta em *Locusta migratoria*. Esta é caracterizada por um número aumentado de aminoácidos na região das hélices 2 e 3 do LBD (Hayward et al., 2003). Esta "inserção" localiza o Usp de *Locusta* mais perto do de *Apis* e do RXR humano. De

acordo com os autores, esta característica faz da isoforma maior do Usp (em vez da menor) de *Locusta migratoria* uma boa candidata para possuir atividade dependente de ligande.

A existência de ligande(s) para RXRs e para Usp em alguns dípteros e para o grupo ApLoTe sugere um surgimento evolutivo independente em diferentes grupos de animais da capacidade de unir ligande deste fator de transcrição. Porém, o descobrimento de que o RXR de *Tripedalia cystophora* (um cnidário) liga 9-*cis* AR (Kostrouch et al., 1998) sugere que esta relação entre proteína e ligande surgiu evolutivamente cedo e que pode ter sido perdida em alguns grupos. A outra possibilidade é simplesmente nossa ignorância sobre a existência de ligandes nos restantes grupos animais.

2.3.2.-Amusp não parece responder a ecdisona exógena

Em nossos experimentos não observamos um aumento na expressão de *usp* depois do tratamento com ecdisona, mas pelo contrário, observamos uma redução na expressão de *usp* depois de 24h. Efeitos similares da ação de ecdisteróides na expressão de *usp* foram observados em *Cydia pomonella*. A expressão de *usp* nos corpos gordurosos (mas não nos ovários) foi dramaticamente inibida pelo tebufenozide e pelo metoxifenoazide depois de 24h de exposição (Sun et al., 2003). Uma expressão constitutiva (independente dos títulos de 20E) de *usp* foi também relatada por Matsuoka & Fujiwara (2000). Estes autores observaram que tanto os discos imaginais de *Bombyx mori* deficientes para *fl* (mutante para formação de asa) quanto os normais respondiam de maneira semelhante a variações de concentração de 20E em cultivos *in vitro* destes órgãos.

Na epiderme abdominal de *Manduca sexta*, o perfil de Usp-2 durante os últimos estágios larvais semelha o dos ecdisteróides, e sua expressão é aumentada por estes hormônios. Porém, Usp-1 não responde a ecdisteróides, mas sim ao HJ,

cujo perfil é semelhante ao da expressão de Usp-1 na maior parte do desenvolvimento larval (ver Hiruma et al., 1999). Assim, parecem existir diferenças nas respostas a hormônios entre diferentes isoformas de um mesmo fator de transcrição. Estes resultados sugerem que a expressão de *Amusp* (pelo menos a isoforma estudada) não é ativada por ecdisteróides.

2.3.3.-A expressão de usp de *Apis mellifera* é promovida por HJ

Além da sua organização estrutural, outras evidências sugerem que o Usp de *Apis mellifera* pode ligar HJ (ou um metabólito) e que sua expressão pode ser modulada pelos títulos deste hormônio. Primeiramente, a expressão de *usp* aumenta quando pupas de ambas castas são submetidas a HJ exógeno. Ademais, animais com títulos endógenos altos deste hormônio (*knock-down* para *vg*) possuem altos níveis de expressão de *usp*. Esta última evidência elimina também uma eventual ação não fisiológica da quantidade de HJ aplicada *in vivo* nestes animais (Barchuk et al., 2002). Estes resultados sugerem que Usp de *Apis mellifera* pode possuir funções dependentes de ligande e indicam o gene *usp* como um membro primário na cascata de expressão gênica promovida pelo HJ. Resultados semelhantes foram obtidos por Chung et al. (1998) que aplicaram ácido retinóico ao caranguejo *Celuca pugilator* (cujo RXR é muito similar ao ortólogo dos membros do grupo ApLoTe). Estes autores encontraram que a expressão de CpRXR era significativamente maior em animais submersos em água de mar com *all-trans-AR* quando comparada com os animais controle. Ademais, *all-trans-AR* é capaz de induzir a expressão de seus receptores RXR e RAR em embriões de camundongo e em várias linhas celulares (Jiang et al., 1994; Copper et al., 1997; Gianini et al., 1997).

**3. *ultraspiracle* no desenvolvimento
pós-embriónico tardio de *Apis
mellifera***

3.1.-Introdução

A capacidade reprodutiva é uma das características diferenciais entre as castas de insetos sociais (Wilson, 1971), e a vitelogenina, o principal componente do ovo, possui, em *Apis mellifera*, perfis e *timing* de início de expressão casta-específicos (Engels et al., 1990; Barchuk et al., 2002; Piulachs et al., 2003). O início da expressão de *vg* em *Apis mellifera* acontece ainda durante o desenvolvimento pós-embrionário. Recentes trabalhos identificaram transcritos deste gene durante a maior parte do desenvolvimento larval e no final do desenvolvimento pupal de operárias (Barchuk et al., 2002; Piulachs et al., 2003; K. Guidugli, com. pessoal). Interessantemente, os ambientes hormonais destes dois períodos são equivalentes, estando caracterizados por títulos relativamente altos de hormônio juvenil (HJ) e baixas concentrações de ecdisteróides (ver Hartfelder & Engels, 1998). Experimentos de aplicação de hormônios durante o desenvolvimento pupal de rainhas e operárias mostraram a ação promotora do HJ na expressão de *vg* no final deste período e a ação inibitória dos ecdisteróides (Barchuk et al., 2002). Juntos, estes resultados sugerem a participação do HJ na regulação da expressão desta proteína.

Outro processo que em *Apis mellifera* acontece durante o período pupal e que também parece depender de um ambiente hormonal com decrescentes títulos de ecdisteróides é a melanização cuticular (Zufelato et al., 2000). Apesar de se poder observar expressão do gene da pro-fenoloxidase (*proPo*, precursor da enzima que participa na síntese de melanina) durante todo o período pupal, esta expressão é bem mais intensa no final deste período, quando os títulos de ecdisteróides nestes insetos são relativamente baixos e os do HJ começam a experimentar um leve aumento (Lourenço et al., 2004; Rembold, 1987). Ademais, títulos artificialmente aumentados de HJ durante o desenvolvimento pupal levam a um adiantamento no início do processo de pigmentação cuticular (Bitondi et al., 1998; Zufelato et al.,

2000). Assim, a transcrição de ambos genes (*vg* e *proPo*) parece acontecer em situações semelhantes e responder aos mesmos fatores.

A proteína Usp tem sido considerada normalmente como parceira de EcR na formação do complexo receptor de ecdisona (Oro et al., 1990; Koelle et al., 1991; Yao et al., 1992; Yao et al., 1993; Swevers et al., 1996). Mas, muito provavelmente, sua função não deve ser tão restrita, se considerarmos que fatores de transcrição usualmente interagem com muitos outros, com a adicional participação de co-reguladores (Jones, 1995; Glass & Rosenfeld, 2000; Lee et al., 2001; Levine & Tjian, 2003). Ressaltando ainda que, em *Apis mellifera* e outros insetos, como *Aedes aegypti* (Kapitskaya et al., 1996), *Manduca sexta* (Jindra et al., 1997; Asahina et al., 1997) e *Chironomus tentans* (Vogtli et al., 1999), *usp* se expressa em mais de uma isoforma. Neste sentido, nossos anteriores resultados mostraram que o HJ promove um rápido acúmulo do transcrito de *usp* tanto em pupas de rainhas quanto de operárias e que as duas isoformas se expressam diferencialmente no corpo do animal. Ainda, a análise da organização aminoacídica de Usp sugere uma eventual capacidade de unir ligande (Capítulo 2). Assim, o HJ participaria no controle da expressão de *vg* e da *proPo*, através da mediação da proteína Usp. Um primeiro passo na compreensão deste processo seria a análise da expressão de *usp* durante o período de expressão dos genes alvo (*vg*, *proPo*), e, eventualmente, a avaliação de sua participação no controle da expressão destes genes. Por outro lado, são poucos os dados disponíveis sobre o papel de Usp durante o desenvolvimento pupal. Por isso, decidimos:

- Determinar o perfil de expressão de *usp* no corpo gorduroso (responsável pela síntese de Vg) durante o desenvolvimento pós-embrionário tardio de fêmeas.
- Identificar potenciais genes alvo de Usp no desenvolvimento pupal.

3.2.-Resultados

3.2.1.-A expressão de *usp* em pupas de fêmeas e adultas jovens

3.2.1.1.-O perfil de expressão do mRNA de *usp* no corpo gorduroso (CG) pupal

Para determinar o perfil de expressão de *usp* obtivemos cDNA de fita simples a partir do RNA total do corpo gorduroso de todos os estágios pupais de rainhas e operárias. Sobre estes cDNAs aplicamos PCR semiquantitativa com primers específicos para uma região localizada perto do extremo 5' de *Usp* de rainhas. Estes produtos foram submetidos a *Southern blot* e identificados mediante o uso de uma sonda específica de 544pb.

Nestes experimentos foi observado que os maiores níveis de expressão do mRNA de *usp* em operárias acontecem no início do período pupal (Pw), diminuindo sensivelmente até Pha (próximo à emergência), e evidenciando um claro pico em Pbm (Figura 3.1). Os níveis de expressão de *usp* em rainhas parecem ser basais na maior parte do período pupal, excetuando os últimos estágios, quando se tornam semelhantes aos níveis presentes em operárias. Os valores de expressão encontrados no início do período em rainhas foram bastante variáveis (ver Figura 3.1), pelo que a aparente diferença em relação aos observados em operárias deve ser considerada cuidadosamente.

3.2.1.2.-A expressão de *usp* no CG de fêmeas de 0-10 dias de idade adulta

Os títulos de HJ aumentam sensivelmente desde níveis basais no final do período pupal até um pico ao redor do 3^o dia após a emergência do adulto em operárias de *Apis mellifera*. A partir deste pico, os títulos começam a diminuir para se tornar novamente basais até aproximadamente o 10^o dia (desde quando os títulos de HJ aumentam consideravelmente). Simultaneamente ao aumento nos níveis de HJ durante os primeiros dias após a emergência acontece também, e até

um pouco além do 10^o dia, um aumento claro nos níveis hemolinfáticos de Vg. Se Usp nestes insetos media as ações do HJ, nós poderíamos esperar um aumento semelhante nos seus níveis durante o mesmo período, e isto poderia sugerir sua participação na promoção da expressão de *vg*, expressão que está controlada por HJ (Barchuk et al., 2002). Para avaliar os níveis de *usp* em abelhas jovens nós levamos a cabo experimentos de RT-PCR seguido de *Southern blot* com amostras de RNA total de CG de abelhas de 0 a 10 dias. A Figura 3.3 mostra os resultados destes experimentos. Em A), exemplos de *Southern blots* feitos com amostras de rainhas e operárias, e em B), um gráfico construído com os valores densitométricos obtidos a partir das bandas amplificação do mRNA de *usp* de dois experimentos. Pode-se observar que os perfis de expressão de *usp* em ambas castas são semelhantes, diferenciando-se no momento em que ambas evidenciam um leve aumento. As rainhas mostram este pico já no 2^o dia de vida, enquanto que as operárias o fazem ao redor do 4^o dia de vida adulta.

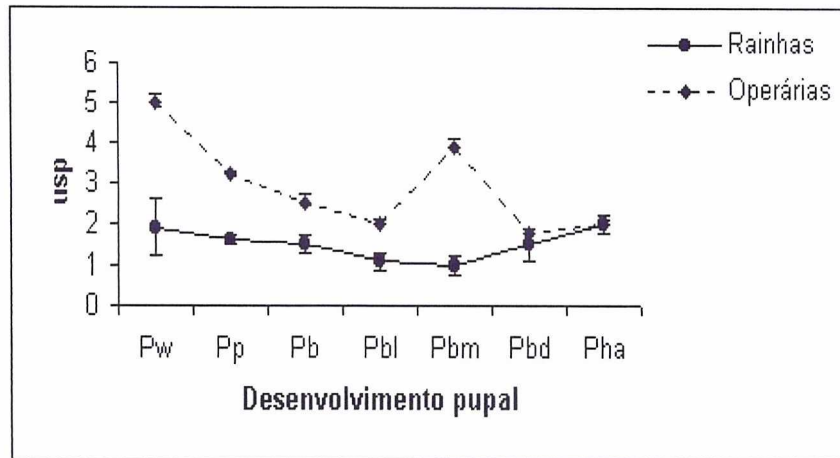


Figura 3.1.- Perfil de expressão de *usp* durante o desenvolvimento pupal de fêmeas *Apis mellifera*. Representação gráfica dos valores densitométricos correspondentes às bandas de amplificação por RT-PCR/Southern blot do mRNA de *usp* de corpo gorduroso de rainhas e operárias (valores de pelo menos dois experimentos, normalizados pelos níveis de β actina). Pw:pupa de olho branco, cutícula não pigmentada; Pp:pupa de olho rosa, cutícula não pigmentada; Pb:pupa de olho marrom, cutícula não pigmentada; Pbl:pupa de olho marrom, tórax levemente pigmentado; Pbm:pupa de olho marrom, tórax medianamente pigmentado; Pbd: pupa de olho marrom, tórax fortemente pigmentado; Pha:farato adulto.

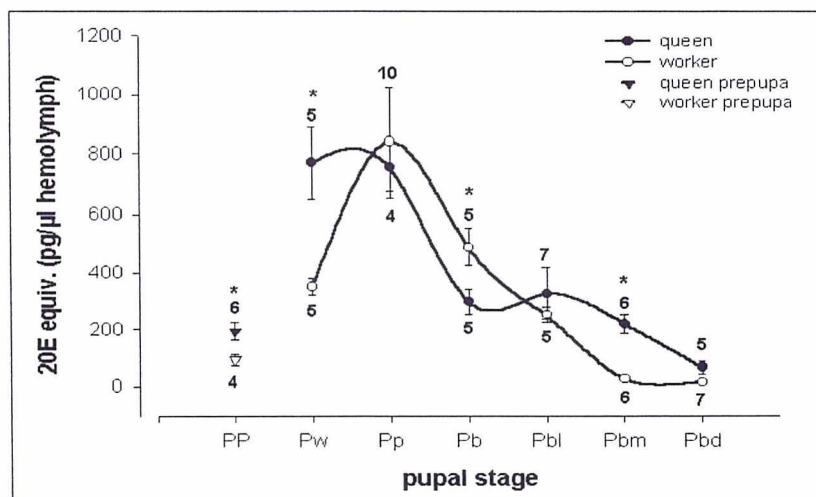


Figura 3.2.- Títulos de ecdisteróides hemolinfáticos no desenvolvimento pupal de rainhas e operárias de *Apis mellifera* (Pinto et al., 2002).

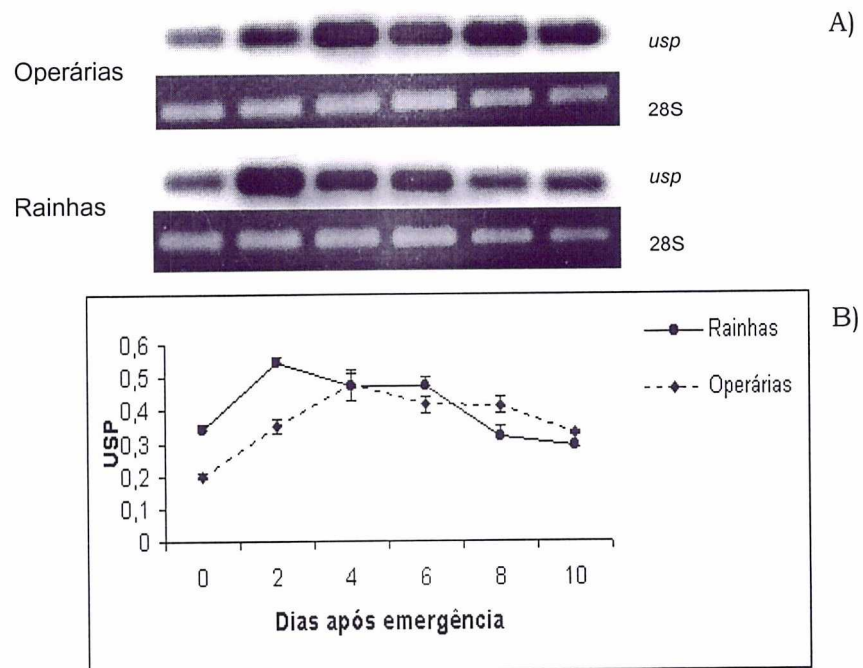


Figura 3.3.- Perfil de expressão do mRNA de *usp* no corpo gorduroso de abelhas *Apis mellifera* jovens. A) Exemplos de RT-PCR/Southern blot. 28S: bandas em géis de agarose corados com brometo de etídio correspondentes ao produto de amplificação do rDNA de 28S utilizado como controle. B) Representação gráfica dos valores densitométricos correspondentes às bandas de amplificação do mRNA de *usp* de dois experimentos.

3.2.2.-Fenótipo de pupas de abelhas knock-down para *usp*

Após serem sugeridos como abordagens adequadas para o estudo de certos problemas em insetos (Misquitta & Paterson, 1999; ver também Hannon, 2002), o fenômeno de interferência por dsRNA e a possibilidade de sua utilização em *Apis mellifera* foram demonstrados por Beye et al. (2002) e Amdam et al. (2003). Nesse trabalho, utilizamos RNA dupla fita com o objetivo de obter pupas de operárias *knock-down* para *usp* (da isoforma cuja seqüência conhecemos), e desta maneira avaliar o papel deste fator de transcrição no desenvolvimento pupal destas abelhas, especificamente, sua participação no controle da expressão de *vg* e de *proPo* ao final do período pupal (Barchuk et al., 2002; Piulachs et al., 2003; Lourenço et al., 2004).

Injetamos em operárias Pw (ver Tabela 5.1) 5µg de dsRNA correspondente a 606pb da região 3' do cDNA de rainhas (AY273778), que inclui a última parte do LBD e a primeira parte da região não traduzida. Seguimos o desenvolvimento destas pupas até as controle estivessem prestes para a emergência (Pha). Nós utilizamos dois grupos controle: Um formado por pupas que receberam injeções de volumes equivalentes de água autoclavada, e o outro, por pupas que foram mantidas sem tratamento algum (não foram encontradas diferenças entre estes dois tipos de controle). A consequência mais evidente da diminuição da presença do transcrito de *usp* foi um atraso no desenvolvimento pupal (Figura 3.4 e 3.5). Isto pode ser observado fundamentalmente pelo grau de pigmentação corporal (na maior parte do período) e pelo desenvolvimento de estruturas como asas e cerdas (final do período pupal). Enquanto as pupas controle alcançavam o estágio de Pb, as injetadas com dsRNA de *usp* se encontravam em Pp (Figura 3.4 A1-A3). Esta situação continuou até as controle alcançarem o estágio de Pha, momento em que as *KDusp* se encontravam em Pbm-Pbd (Figura 3.4 C1-C3). Uma característica molecular considerada para a avaliação do grau de desenvolvimento foi a atividade da esterase 2a (Figura 3.5). Esta atividade pode ser normalmente encontrada

desde o início do 5^o estágio larval até o estágio de Pbm de operárias (Figueiredo et al., 1996). Já nos estágios Pbd e Pha esta atividade não é encontrada. Em nossos experimentos, as abelhas controle não apresentaram atividade da esterase 2a enquanto as KDusp evidenciaram nítidas bandas (Figura 3.5).

Como era de interesse conhecer o efeito da diminuição da expressão de *usp* no início da expressão de *vg* no final do período pupal (Barchuk et al., 2002; Piulachs et al., 2003), tomamos amostras de RNA quando as pupas controle estavam em Pbd-Pha. Estes RNAs serviram como molde para a síntese de cDNAs, com os quais realizamos PCR semiquantitativas. Um resumo deste experimento encontra-se na Figura 3.6. O gráfico desta figura mostra os níveis relativos de expressão gênica entre as abelhas injetadas com dsRNA para *usp* e as controle sem tratamento (não foram incluídas nestas análises as abelhas controle que tinham sido injetadas com água). Como se pode ver, a expressão de *usp* caiu aproximadamente pela metade nas abelhas tratadas, mostrando assim uma diminuição de níveis de transcrito (*knock-down*) e não sua completa desapareição.

A diminuição dos níveis de transcrição de *usp* se relaciona com uma diminuição significativa (também aproximadamente pela metade dos seus níveis em abelhas controle) nos transcritos de *ftz-f1* e do gene da esterase do hormônio juvenil (*ehj*). Já a expressão de *vg* e do gene da pro-fenoloxidase (*proPo*) não pareceu modificar-se nas abelhas tratadas quando comparadas com o controle, apesar de este último transcrito parecer estar menos representado nas abelhas KDusp. Os níveis de expressão da *βactina*, utilizada como controle, foram semelhantes em ambos grupos de abelhas.

De maneira interessante, algumas abelhas KDusp dificilmente conseguiam ultrapassar o estágio de Pbm. Ademais, quando as pupas foram injetadas em Pb, não observamos diminuição da expressão de *usp* em amostras tomadas em Pbd-Pha (nos mesmos estágios que quando injetamos em Pw; resultado não mostrado).

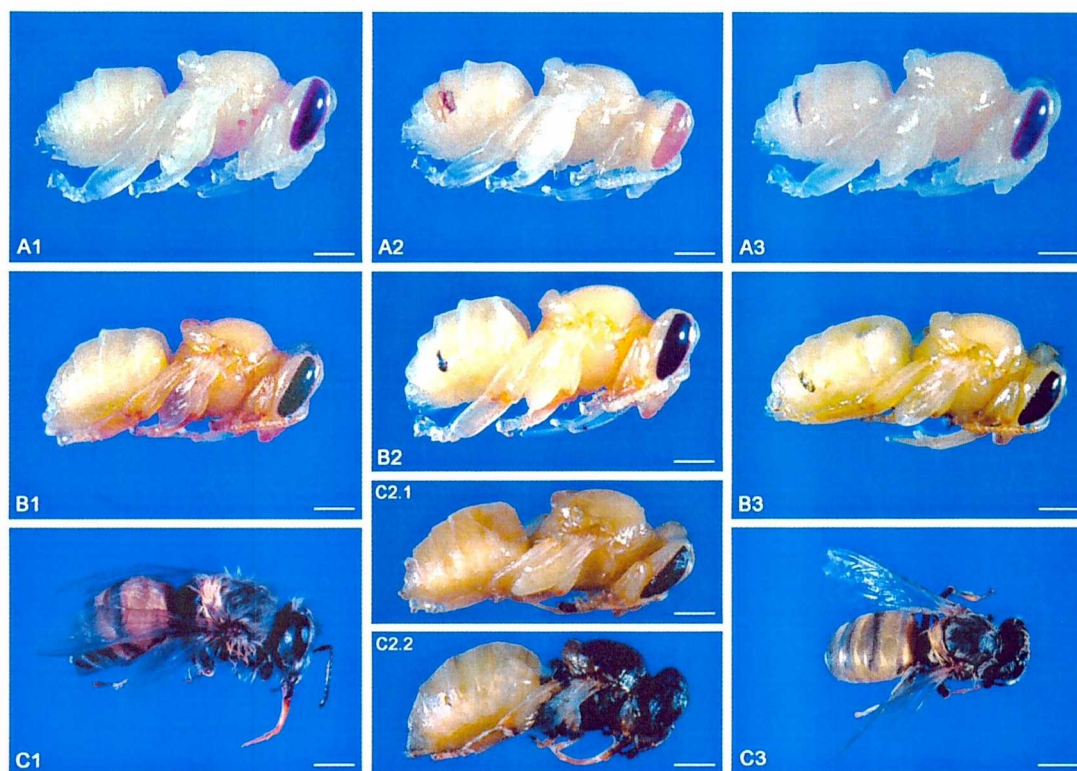


Figura 3.4.-Atraso do desenvolvimento pupal de abelhas *knock-down* para *usp*. ABC-1: Controles sem tratamento; ABC-2: Injetadas com dsRNA para *usp*; ABC-3: Controles injetadas com H₂O. Barras: C3=4mm, outras=2mm

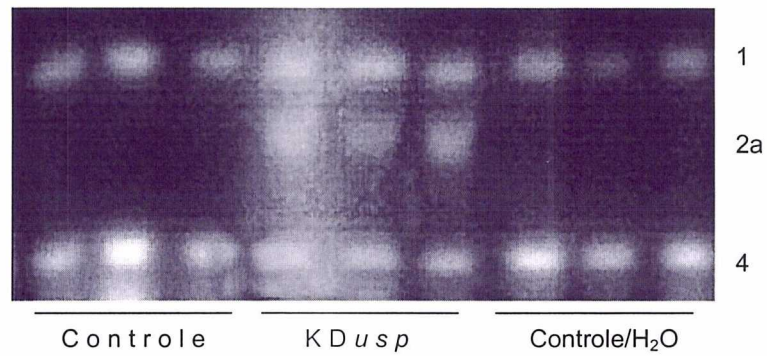


Figura 3.5.- Persistência da atividade esterase 2a em pupas de operárias *Apis mellifera* KDusp. 1 e 4: esterases que não mostraram alteração na sua atividade em abelhas KDusp.

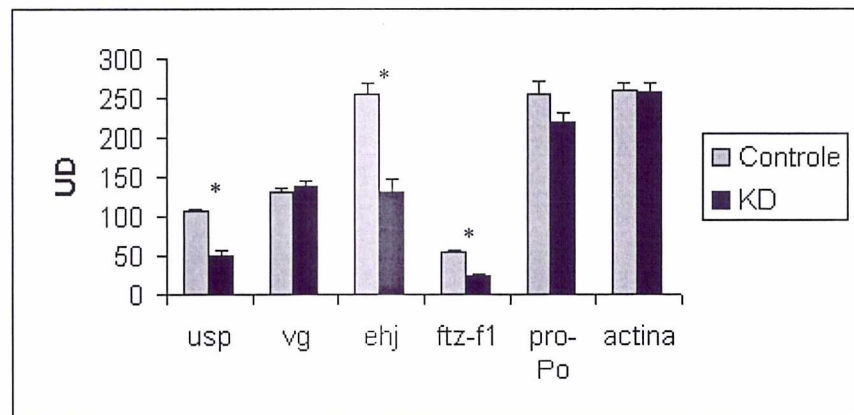


Figura 3.6.-Efeito do *knock down* de *usp* sobre a expressão de genes específicos de *Apis mellifera*. Médias e erros padrão em unidades densitométricas (UD). Resultados obtidos através de uma série de experimentos independentes. (*) amostras com diferenças estatísticas (test-t $P > 0,001$).

3.3.-Discussão

3.3.1.-Expressão de *usp* durante o desenvolvimento pós-embrionário tardio

Os perfis de expressão de *usp* durante o período pupal parecem ser casta-específicos, com operárias mostrando níveis mais importantes no início do período e um pico em Pbm, contrastando assim com o que acontece em rainhas, onde apenas níveis basais de expressão foram detectados. Mas, como os valores encontrados no início do desenvolvimento pupal de rainhas apresentaram variações significativas, a diferença na expressão de *usp* durante estes estágios entre ambas castas pode ser menos evidente que a observada.

De maneira geral, o perfil de expressão de *usp* em operárias acompanha a modulação dos títulos de ecdisteróides nesta casta (ver Figura 3.2; Pinto et al., 2002), que diminuem gradativamente desde Pp até o final do desenvolvimento pupal. Porém, no início do período (Pw), enquanto os níveis de expressão de *usp* são os mais elevados, os títulos de ecdisteróides são intermédios. O perfil destes hormônios em rainhas é semelhante ao encontrado em operárias, diferenciando-se nos títulos correspondentes a Pw, que em rainhas é equivalente ao presente em operárias Pp. No entanto, os níveis de expressão de *usp* não parecem seguir os títulos de ecdisteróides. Como normalmente a expressão de um receptor nuclear durante o desenvolvimento pós-embrionário é estimulada pelo seu ligande (Tata, 2000), esta situação sugere a existência de um mecanismo complexo de regulação da expressão de *usp* em fêmeas de *Apis mellifera*. Assim, os níveis altos de expressão durante a primeira parte do desenvolvimento pupal de operárias pode ser uma resposta aos altos títulos de ecdisteróides. Neste contexto, Usp pode estar formando parte do complexo receptor destes hormônios, junto ao EcR correspondente. Situação semelhante foi observada em operárias de *Melipona scutellaris* por R. Palo Mello (com. pessoal), onde os títulos de ecdisteróides e de

expressão de *usp* lembram os correspondentes em operárias de *Apis mellifera*. Neste sentido, experimentos de determinação de perfis de expressão de genes correspondentes a receptores nucleares com respostas a ecdisteróides no desenvolvimento de *Drosophila*, demonstraram que apesar de se expressar durante todo os períodos estudados, *usp* o faz de maneira mais intensa logo após picos destes hormônios (Sullivan & Thummel, 2003). Isto foi mais claramente observado durante o desenvolvimento embrionário e em relação ao primeiro pulso de 20E da muda metamórfica. De maneira interessante, o segundo pulso de 20E deste estágio não se corresponde a um aumento nos níveis de expressão de *usp*. O tempo que a transcrição de um determinado fator de transcrição dependente de hormônios leva para ser ativada depende muito provavelmente do grau de intermediação da ação hormonal.

O pico de expressão de *usp* encontrado na metade da fase de pigmentação corporal de operárias tanto de *Apis mellifera* quanto de *Melipona scutellaris* não pode ser facilmente associado à ação direta dos ecdisteróides. O comportamento de *usp* provavelmente esteja relacionado à ação de outros fatores de transcrição, que podem estar participando dos processos que caracterizam esta parte do desenvolvimento pupal. Em Pbm-Pbd acontece a maior expressão de pró-fenoloxidase (Lourenço et al., 2004) e o início da expressão de *vg* (Barchuk et al., 2002; Piulachs et al., 2003), ambos eventos associados a um leve aumento nos títulos de HJ (Rembold, 1987). Esta expressão de *usp* em operárias e a sua recuperação nos estágios finais de rainhas podem estar representando uma resposta ao incremento nos títulos de HJ. Respostas positivas nos níveis do transcrito de *usp* ao aumento nos títulos de HJ foram demonstradas nos experimentos de aplicação deste hormônio apresentados no capítulo anterior (2).

A expressão de *usp* durante os primeiros dias de vida adulta tanto de rainhas quanto de operárias já segue claramente os títulos de HJ na hemolinfa (em Bloch et

al., 2002). O aumento de expressão de *usp* que se inicia em ambas castas no final do período pupal se correlaciona com um incremento equivalente nos títulos de HJ, situação que continua até os dias 2-3 em rainhas e 3-4 em operárias, onde acontecem os maiores níveis de ambos tipos de moléculas. A partir daí, os títulos de HJ e os níveis de expressão de *usp* diminuem gradualmente até aproximadamente o dia 10 de vida adulta. Este paralelismo mostra uma resposta natural do *usp* à indução da expressão pelo HJ, demonstrada em experimentos de aplicação durante o desenvolvimento pupal. Por outro lado, os títulos dos ecdisteróides sofrem uma queda muito importante no primeiro dia de vida após a emergência, recuperando-se levemente no segundo dia, mas voltando a cair a partir do 4º dia até se tornarem basais, o que continua pelos próximos dez dias de vida (Hartfelder et al., 2002). Desta forma, estes hormônios só poderiam estar relacionados com o pico antecipado de expressão de *usp* no segundo dia de vida de rainhas.

De maneira interessante, a expressão de vitelogenina aumenta significativamente durante os primeiros dias de vida adulta em ambas castas (em Engels et al., 1990), processo que tem início no final do período pupal (Barchuk et al., 2002; Piulachs et al., 2003). Esta situação poderia estar indicando uma ação do HJ sobre a expressão de *vg*. Experimentos de aplicação de baixas doses de HJ em operárias jovens mostraram uma ação positiva deste hormônio sobre a expressão de *vg*. Altas doses, porém, mostraram ter efeito inibidor (Rutz et al., 1976; Pinto et al., 2000), sugerindo a existência de um limiar permissivo sobre a expressão de *vg*. Altos títulos de HJ se correlacionam também com níveis baixos de expressão de *vg* em operárias adultas, fase em que desenvolvem atividades fora da colméia (Fluri et al., 1982).

Esta relação aparentemente positiva entre títulos de HJ, níveis de expressão de *usp* e de vitelogenina sugere uma eventual participação de *Usp* na mediação

dos efeitos deste hormônio. Porém, os resultados dos experimentos de *KDusp* levantam algumas dúvidas.

3.3.2.-A expressão de *usp* é fundamental para o desenvolvimento pupal de *Apis mellifera*

Nossos resultados obtidos mediante a utilização da técnica de interferência por RNA (Fire et al., 1998; Misquitta & Paterson, 1999; Hannon, 2002; Gissendanner et al., 2003; Novina & Sharp, 2004) mostram a possibilidade de sua utilização para o estudo da modulação da expressão de genes reguladores durante o desenvolvimento pupal em *Apis mellifera*. Os *knock down* obtidos mostraram não ser in-específicos e generalizados, toda vez que o gene controle (*βactina*) e o da *Vg* expressaram-se sem alterações e os demais genes estudados mostraram ser alterados diferencialmente. A utilização com sucesso desta técnica em abelhas já foi reportada por Beye et al. (2002) e Amdam et al. (2003). Os primeiros autores demonstraram que a injeção de um fragmento de dsRNA de 300pb incluindo uma seqüência conservada é capaz de produzir embriões deficientes para genes específicos. Mais recentemente, Amdam et al. (2003) lograram 96% de diminuição da expressão de *vg* em operárias adultas quando injetadas com *vgds*mRNA logo após o nascimento. Quando a injeção foi feita em embriões, estes autores conseguiram 15% de operárias adultas *knock down* para *vg*. Estes resultados abrem possibilidades de estudo de função gênica em organismos não tradicionalmente tidos como modelo de estudo e para os quais não se dispõem mutantes específicos.

O atraso no desenvolvimento (avaliado pela pigmentação corporal, formação de cerdas e asas e persistência da atividade de esterase 2a) das abelhas *knock down* para *usp* (*KDusp*) sugere a sua participação no início dos processos de desenvolvimento pupal. Como *Usp* é considerado constituinte do complexo

receptor de ecdisona (Oro et al., 1990; Koelle et al., 1991; Yao et al., 1992; Yao et al., 1993), sua deficiência em abelhas Pw (ver Tabela 5.1) não permitiria a mediação correta dos processos dependentes deste hormônio. Em *Manduca sexta* e *Drosophila melanogaster*, a ecdisona durante o período pupal inibe a expressão de *Broad*, evento que permite a concretização da cascata de expressão gênica conducente à formação da cutícula e cerdas do animal adulto (Zhou & Riddiford, 2002). A diminuição da expressão de *usp* em nossos experimentos pode ser responsável por uma eventual impossibilidade de formação do complexo receptor de ecdisona, o qual acarretaria uma liberação da expressão de *Broad*, induzindo o programa de formação de cutícula pupal, em lugar da adulta. Outra possibilidade seria uma deficiência na formação de heterodímeros junto ao eventual parceiro HR38 (Sutherland et al., 1995), um de cujos mutantes, em *Drosophila*, está associado a problemas na formação da cutícula adulta (Kozlova et al., 1998). A associação entre deficiência de *usp* e problemas no desenvolvimento cuticular de *Drosophila melanogaster* foi demonstrada há duas décadas por Perrimon et al. (1985). Além disto, os autores encontraram em moscas mutantes para *usp* um número extra de espiráculos na região posterior do abdome, alteração que teve conseqüências históricas para o conhecimento deste gene.

No contexto que acabamos de discutir, a não alteração dos níveis de expressão de *vg* em abelhas *KDusp* foi duplamente surpreendente. Nem o atraso no desenvolvimento nem a diminuição da expressão de *usp*, potencial participante no controle de sua expressão, determinaram alterações nos níveis do seu transcrito. Assim, a indução da expressão de *vg* pelo HJ nos últimos estágios do desenvolvimento pupal (Barchuk et al., 2002) parece acontecer independentemente de *Usp* ou mediante vias redundantes. Estes resultados contrastam com os obtidos em dípteros sobre o mecanismo regulador da expressão de proteínas vitelogênicas, onde *Usp* aparece como um componente essencial. Em *Drosophila melanogaster*,

a expressão destas proteínas depende de fatores hormonais (20E e HJ) e nutricionais (Bownes, 1994; Bownes et al., 1996). No mosquito *Aedes aegypti*, 20E exerce sua ação indutora da expressão de *vg* mediante a participação do complexo EcR/Usp e da isoforma B do E74 (Martín et al., 2001; Zhu et al., 2003; Sun et al., 2004), e da indução de competência provida pelo HJ III. Mais ainda, este hormônio parece atuar aumentando a expressão de $\beta ftz-f1$ (Zhu et al., 2003), o qual é um fator de competência na cascata de reações promovida por ecdisteróides (Lavorgna et al., 1993; Broadus et al., 1999). Assim, nossos resultados mostram que para compreender o mecanismo molecular do controle hormonal da expressão de *vg* se necessitam estudos de organização e regulação do gene da *vg* de *Apis mellifera*.

De maneira interessante, um gene que mostrou diminuir sua expressão em pupas *KDusp* foi *ftz-f1* (um receptor nuclear órfão, R. Maleszka, BI946427 e com. pessoal), indicando a participação de Usp no controle de sua expressão. Isto provavelmente ocorra de uma maneira indireta ou ainda não conhecida, considerando que a expressão de $\beta ftz-f1$ em *Drosophila melanogaster* é induzida por DHR3, outro receptor nuclear que possui atividade dependente de ecdisona e cuja transcrição é promovida pelo complexo EcR/Usp (Thummel, 1996; Kageyama et al., 1997; Thummel, 2001a). Por outro lado, os resultados do experimento de *KDvg* (Figura 2.10), mostraram que o aumento dos títulos de HJ se correlaciona com um aumento nos níveis de expressão de *usp* e uma queda nos níveis de expressão de *ftz-f1*. Indicaria isto uma eventual participação ativa de Usp na regulação negativa da expressão de *ftz-f1* em abelhas adultas? Um caso semelhante se pode observar na metamorfose de *Drosophila*, onde é necessária uma expressão transitória de *ftz-f1* induzida por DHR3, o que permite a expressão correta de genes induzidos pelo segundo pico de ecdisona e determinantes –por exemplo- da morte celular das glândulas salivares durante a pré-pupa tardia. Esta janela de expressão de *ftz-f1* é possibilitada pela ação repressiva sobre este gene

por parte do complexo receptor de ecdisona (Thummel, 2001a), do qual Usp é parte. Esta contradição no modo de ação de Usp sobre *ftz-f1* pode ser apenas aparente. Em primeiro lugar, os experimentos de *KDusp* foram realizados em abelhas em desenvolvimento (período pupal) e nos de *KDvg* foram realizados com operárias adultas. Eventuais alterações durante o desenvolvimento nos fatores participantes na regulação da expressão gênica podem ser responsáveis por esta discrepância. Outra possibilidade, não mencionada até o momento, é a decorrente da existência de duas isoformas de *usp* em *Apis mellifera* (Figura 2.3). Assim, a isoforma cuja expressão é aumentada nas abelhas adultas *KDvg* pode não ser a mesma que a isoforma que é controlada positiva e “diretamente” pelo Usp durante o desenvolvimento pupal. A regulação diferencial da expressão de *ftz-f1* por *usp* e uma eventual impossibilidade de discernir as isoformas deste último gene podem, assim, estar por trás da aparente discrepância na ação de *usp* sobre a expressão de *ftz-f1*. Estudos adicionais da organização gênica de *usp* são necessários para resolver esta situação.

Outro gene que diminuiu sua expressão nas operárias *KDusp* codifica uma esterase do HJ (*ehj*). A esterase do HJ encontra-se envolvida na degradação do HJ e assim, participa indiretamente na regulação de processos de desenvolvimento dependentes deste hormônio. A sequência de cDNA desta enzima foi recentemente determinada para *Apis mellifera* (A. Mackert, com. pessoal). O gene da *ehj* de *Choristoneura fumiferana* possui um elemento de resposta de 30pb que inclui duas repetições diretas separadas por 4 nucleotídios, semelhante ao putativo elemento de resposta a HJ (Kethidi et al., 2004). Este elemento de resposta media a ação indutora e a repressora da transcrição da luciferase por parte do HJ-I e da 20E, respectivamente. Elementos semelhantes (DR4) parecem ser capazes de ligar o complexo EcR/Usp em *Aedes aegypti* (Wang et al, 1998). Se Usp media a ação do HJ (direta ou indiretamente, Capítulo 2), a diminuição da expressão de *ehj*

em abelhas *KDusp* estaria indicando uma eventual participação de *Usp* na regulação da expressão de *ehj*.

A expressão de *proPo* (pro-fenoloxidase) foi também diminuída nas pupas de abelhas *KDusp*, mas de maneira menos evidente, encontrando-se este efeito só naqueles animais com maiores graus de *knock down* de *usp*. A pro-fenoloxidase é a precursora da enzima que participa na via de síntese de melanina e possui um papel importante no sistema de defesa imune dos insetos (em Lourenço et al., 2004). Como o seu gene parece estar sob controle de ecdisteróides (M. Zufelato, com. pessoal), sua expressão atenuada nas pupas *KDusp* sugere que a isoforma de *usp* estudada nestes experimentos possa estar participando na mediação da ação destes hormônios. O gene *proPo 1* do vetor da malária *Anopheles gambiae* também responde a ecdisteróides, tendo sua expressão aumentada por 20E em células em cultivo (Müller et al., 1999; Ahmed et al., 1999). Estes resultados, além de confirmar a ação indutora dos ecdisteróides sobre a expressão de *proPo* em *Apis mellifera* (mostrada mediante experimentos de injeção por M. Zufelato, com. pessoal), sugerem a desvinculação deste processo, ao de pigmentação, que depende de níveis decrescentes de ecdisteróides num ambiente com títulos de HJ em aumento (Zufelato et al., 2000). Porém, a ação positiva observada por Zufelato dos ecdisteróides sobre a expressão de *proPo* deve ser indireta, uma vez que o aumento nos níveis de transcrito foram detectados aproximadamente 48h após o tratamento. Ademais, uma ação direta dos ecdisteróides sobre a expressão de *proPo* não explicaria os altíssimos níveis de transcrito deste gene encontrados desde o estágio pupal *Pbd* até os 20 dias de vida adulta, período caracterizado por baixos títulos destes hormônios e relativamente altos títulos de HJ (Lourenço et al., 2004; Rembold, 1987; Bloch et al., 2002). Assim, uma outra possibilidade seria a de *Usp* participar na regulação da expressão de *proPo*, no período mencionado acima, mediando a ação do HJ (lembrando que a diminuição da expressão de

proPo em pupas *KDusp* foi detectada justamente neste período, Pbd). O acúmulo do transcrito de *proPo* 48h após do tratamento com ecdisona (M. Zufelato, com. pessoal) seria um efeito indireto e dependente de contexto. De qualquer maneira, estas dúvidas também requerem de esforços relativos ao estudo da organização gênica, especificamente de regiões reguladoras da expressão do *proPo* destas abelhas.

Resumindo, as alterações de expressão gênica detectadas nas abelhas *KDusp* possuem sua correspondência nos fenótipos externos observados durante o desenvolvimento pupal das abelhas. Estas alterações morfológicas são explicadas se consideramos que a diminuição da expressão de *usp* trouxe uma atenuação equivalente na atividade de outros genes com função reguladora (*ftz-f1* e *ehj*) e uma queda de sua participação direta em certos processos do desenvolvimento pupal. De maneira interessante, parece haver diferenças nos graus de sensibilidade nos genes estudados à diminuição da presença de transcritos de *usp*. *ftz-f1* e *ehj* apresentaram uma maior diminuição na sua expressão do que *proPo*, que foi atenuado só nas abelhas com alto grau de *KDusp* (não mostrado).

4. Expressão de *ultraspiracle* e desenvolvimento ovariano em castas de *Apis mellifera*

4.1.-Introdução

Como amplamente conhecido em *Apis mellifera*, diferenças nutricionais durante o período larval (ver em Beetsma, 1979; Jung-Hoffmann, 1966) induzem um alto nível de síntese de HJ pelos *corpora allata* das futuras rainhas, o qual conduz a diferenças em tamanho e peso das fêmeas e ao desenvolvimento diferencial de órgãos chave nas atividades casta-específicas destes insetos (ver Michener, 1974; Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990). Um destes órgãos, o ovário, é o responsável pela característica fundamental que determina a diferenciação de castas, o trabalho reprodutivo (ver Figura 4.1).

O ovário é uma estrutura modular que em rainhas adultas é normalmente formada por 150-200 unidades funcionais, os ovariolos. Já as operárias adultas, que normalmente não produzem ovos, apresentam ovários com 2-10 ovariolos (Zander et al., 1916; ver também Engels et al., 1990). O estabelecimento do número final de ovariolos acontece após o início do 4º instar larval, já que até aí o número de primórdios de ovariolos em ambas castas é de aproximadamente 150-180. Mas apesar desta diferenciação morfológica acontecer relativamente tarde no desenvolvimento larval, os níveis favoráveis de HJ às futuras rainhas encontram-se já no primeiro instar larval, estendendo-se até o início do 5º instar (ver Hartfelder & Engels, 1998). O HJ, de fato, cumpre um papel importante na definição deste polimorfismo. Schmidt Capella & Hartfelder (1998, 2002) mostraram que títulos altos de HJ estão associados à prevenção da morte celular programada e a proliferação celular no 5º estágio larval de ovários de rainhas.

Em díperos existe um exemplo interessante da participação de *usp* na diferenciação de ovários, que mostra, ademais, uma clara conexão entre a qualidade da nutrição larval, a expressão de *usp* e o desenvolvimento deste órgão. Em larvas de *Heteropeza pygmaea* e *Mycophila speyeri* (Cecidomyiidae, Diptera), espécies que apresentam pedogênese (larvas com capacidade reprodutiva),

quando criadas em ambiente com alimento com altos valores nutritivos, a diferenciação das células ováricas é acompanhada por um aumento na expressão de *usp*, o que termina no desenvolvimento dos ovários, permitindo, assim, a mudança do ciclo de vida destes organismos de metamórfico para pedogenético (Hodin & Riddiford, 2000).

Se o HJ cumpre algumas de suas funções ligando-se a *Usp* ou simplesmente induzindo a sua expressão durante o desenvolvimento larval, este fator de transcrição (induzido pelos altos títulos de HJ, associados por sua vez a um diferencial alimentar em favor de rainhas) poderia estar protegendo de alguma forma as células ováricas de rainhas da morte celular e permitindo um maior índice de proliferação celular, processos responsáveis pelo desenvolvimento diferencial destes órgãos. Assim, decidimos avaliar o comportamento de *usp* nos ovários durante o desenvolvimento larval de *Apis mellifera*.

4.2.-Resultados

4.2.1.-O mRNA de *usp* em ovários de larvas de *Apis mellifera*

Para determinar o perfil de expressão de *usp* em ovários de larvas de rainhas e operárias, tomamos amostras (n=20) de RNA dos estágios de desenvolvimento L4, L5F2, L5S1 e L5PP3 (ver Tabela 5.1 e Figura 4.1) e as submetemos a análises por RT-PCR semiquantitativa. Os resultados mostram que *usp* se expressa em níveis mais importantes em rainhas entre os estágios L4 e L5F2, apesar de que neste último a diferença respeito a expressão em operárias não é significativa estatisticamente (Figura 4.2). A partir daqui a expressão de *usp* em ambas castas sofre uma leve queda tornando-se seus níveis muito parecidos no estágio L5S1. Já em PP3 a expressão em operárias parece sofrer um pequeno aumento (não significativo estatisticamente), enquanto os níveis em rainhas permanecem constantes. De maneira geral, os perfis de expressão do mRNA de *usp* em ambas castas parecem ser mui semelhantes, havendo uma diferença em favor das rainhas somente no 4º estágio larval.

4.2.2.- A proteína *Usp* é detectada somente em ovários de larvas de operárias

Para determinar se o perfil de expressão do mRNA de *usp* encontrado nos ovários corresponde a um padrão semelhante de expressão protéica e, assim, com a participação em algum processo biológico no desenvolvimento destes órgãos, realizamos experimentos de imunofluorescência em ovários inteiros utilizando anticorpo anti *Usp* de *Drosophila melanogaster* (AB11). Foram estudados ovários de rainhas e operárias nos estágios larvais L4, F1, F2, F3, S1, S2, S3, PP1, PP2 e PP3 (ver tabela 5.1 e Figura 4.1).

Exemplos de resultados obtidos encontram-se na Figura 4.4. Observamos estruturas marcadas especificamente só na região de formação de clusters nos ovários de operárias nos estágios L5F3 e L5S1. Nem nos ovários dos demais estágios larvais de operárias nem nos ovários de rainhas foram encontradas estruturas marcadas fluorescentemente.

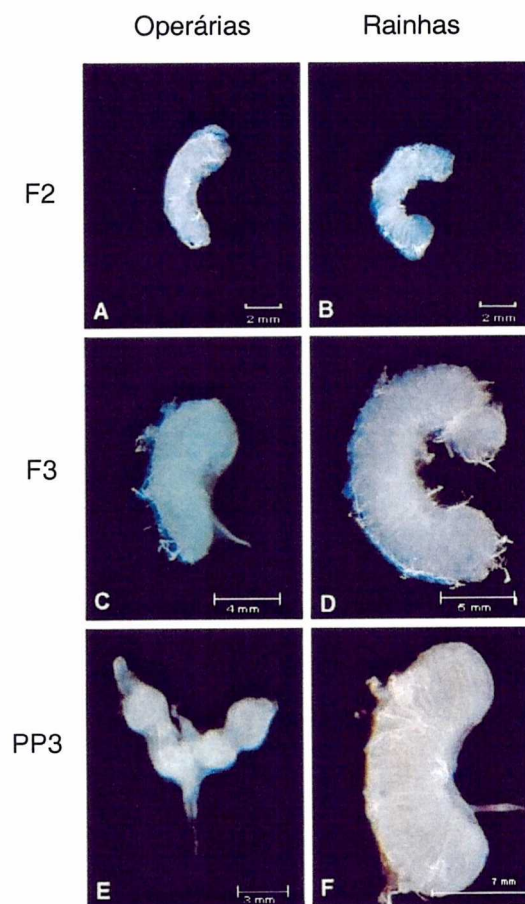


Figura 4.1.- Ovários de rainhas e operárias *Apis mellifera* durante o 5^o estágio de desenvolvimento larval (V. Favaretto).

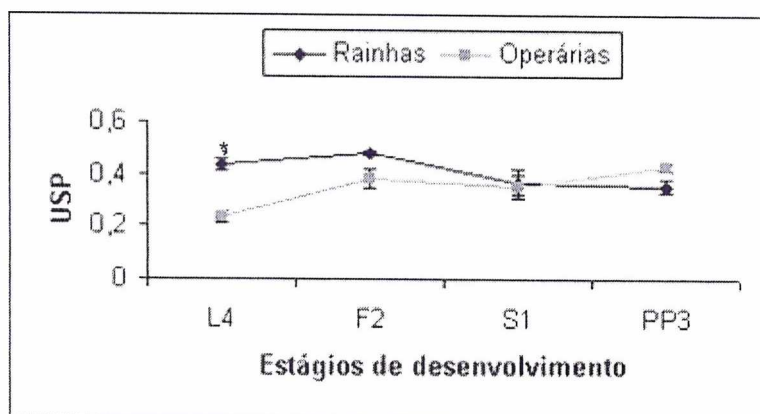


Figura 4.2.- Perfil de expressão de *usp* nos ovários de fêmeas *Apis mellifera* durante os estágios finais do desenvolvimento larval (F2, S1 e PP3=L5). Representação gráfica dos valores densitométricos correspondentes a bandas de amplificação por RT-PCR semiquantitativa. *=Estágio com diferença estatisticamente significativa na expressão de *usp* entre ambas castas (test-t, P=0,004).

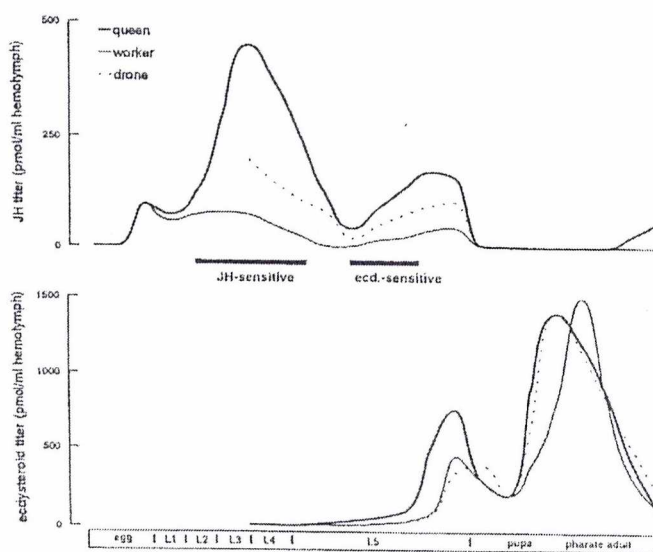


Figura 4.3.- Títulos hemolinfáticos de hormônio juvenil e de ecdisteróides durante o desenvolvimento de *Apis mellifera* (de Hartfelder & Engels, 1998).

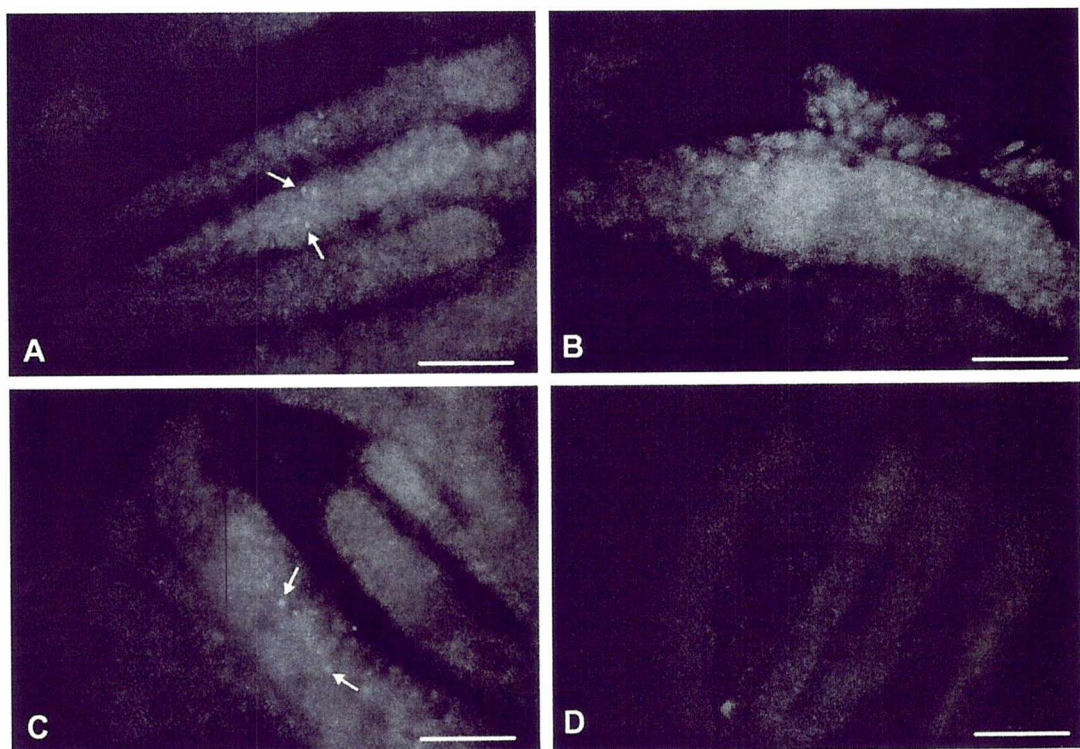


Figura 4.4.- Ovariolos dos estágios larvais L5F3 e L5S1 de operárias (A e C) e rainhas (B e D) *Apis mellifera*. As marcações fluorescentes (positivas para anti Usp) se localizam na região das células germinativas (setas). Barras: D= 105 μ m; O resto=60 μ m

4.3.-Discussão

Os nossos resultados obtidos sobre os níveis de expressão de *usp* em ovários de larvas avaliados mediante a quantificação do seu transcrito não se correspondem com os obtidos mediante a imunolocalização da proteína Usp. Enquanto o perfil do transcrito não sofre alterações significativas nem dentro nem entre castas depois do 4º estágio larval, a proteína foi detectada somente em determinadas regiões dos ovaríolos de operárias prontas para a muda metamórfica.

A diferença na expressão do mRNA de *usp* em favor de rainhas no 4º estágio larval coincide exatamente com a maior diferença também em favor de rainhas nos títulos de HJ (os ecdisteróides em ambas castas são indetectáveis), situação que parece se manter até F2 (ver Figura 4.3 e Hartfelder & Engels, 1998). Já nos seguintes estágios estudados, os níveis semelhantes de expressão de *usp* correspondem as fases do desenvolvimento onde os títulos de HJ são equivalentes entre castas (em S1) e com a presença simultânea de HJ e ecdisteróides em importantes quantidades em ambas castas (em PP3). Estes resultados sugerem que durante estes estágios do desenvolvimento larval, tal como ocorre durante os últimos estágios do desenvolvimento pupal e em abelhas jovens, a transcrição de *usp* é regulada pelo HJ.

Níveis relativamente importantes de expressão de *usp* durante o final do último estágio larval e durante a muda metamórfica foram também encontrados em *Drosophila melanogaster* (Henrich et al., 1994). Estes níveis estariam suportando as necessidades da proteína Usp, no complexo receptor de ecdisona, por parte do mecanismo de resposta aos pulsos de ecdisteróides próprios desta fase do desenvolvimento. A aparente desvinculação, em *Apis mellifera*, dos níveis de mRNA de *usp* dos de sua proteína sugere a existência de alguma forma de regulação pós-transcricional ou a expressão desta última em níveis não detectados pela técnica utilizada.

O 5º estágio larval de *Apis mellifera* é um estágio de diferenciação morfológica ovariana entre ambas castas que está caracterizado pela formação de clusters de células germinativas em rainhas e a morte celular em ovários de operárias (Hartfelder & Steinbrück, 1997; Schmidt Capella & Hartfelder, 1998; 2002). Estes dois processos são os responsáveis pela redução de mais de 10 vezes no número de ovários ao contar do fim do 4º estágio larval até o final do 5º nas operárias, e do desenvolvimento de uma “usina reprodutiva” no interior de rainhas.

Schmidt Capella & Hartfelder (1998) mostraram que títulos altos de HJ estão associados à prevenção da morte celular programada no 5º estágio larval nos ovários de rainhas. Estes autores observaram, por microscopia óptica, que ovários de operárias que tinham sido tratadas com HJ no início do 5º estágio larval mostravam uma nítida diminuição no número de núcleos apoptóticos, se assemelhando assim ao encontrado em ovários de rainhas. A morte celular observada normalmente em ovários de operárias (presente inicialmente na região das células germinativas) é precedida pela dissociação do sistema actina-espectrina-fusoma, sistema que depende de HJ (Schmidt Capella & Hartfelder, 2002). A região de células germinativas, que parece ser o centro de origem do evento de morte celular, é justamente a região que apresentou marcações positivas para Usp nos experimentos de imunofluorescência. Assim, apesar de que a transcrição de *usp* pareça depender de HJ durante o período estudado, a sua proteína parece estar associada ao processo de morte celular, característica de ovários de operárias.

Curiosamente, o momento das primeiras evidências de morte celular observadas em ovários de operárias coincide com o início do aumento nos títulos de ecdisteróides (que até o ai não eram detectados) em presença dos menores títulos de HJ. Esta morte celular se acentua na fase S do 5º estágio larval e

continua presente até a vida adulta (Schmidt Capella & Hartfelder, 1998; Lambertucci, 2002).

Morte celular associada aos ecdisteróides não é um evento raro no desenvolvimento de insetos (Robinow et al., 1993; Streichert et al., 1997; Zee & Weeks, 2001; Pinto et al., 2003). As glândulas salivares de *Drosophila* sofrem morte celular no início do desenvolvimento pupal, justamente após o pulso de ecdisona que marca a muda metamórfica (ver Thummel, 2001). A ecdisona, mediada pelo seu complexo receptor, induz a expressão de uma cascata gênica que inclui produtos reguladores e produtos específicos de morte celular. Um deles, E93, parece poder desencadear eventos de morte celular sem fragmentação de material genético (ver Thummel, 2001b). Curiosamente, Hartfelder & Steinbrück (1997) não conseguiram detectar DNA genômico fragmentado em géis de agarose quando analisaram extratos de ovários de operárias no 5º estágio de desenvolvimento larval.

Estes resultados, embora sugiram uma relação positiva entre os títulos de HJ e níveis do mRNA de *usp*, não indicam a proteína Usp como responsável pela mediação da prevenção da morte celular de ovários, mas sim, como associada ao processo. Se for assim, provavelmente esteja fazendo parte do complexo receptor de ecdisona. Desta maneira, níveis altos de HJ poderiam prevenir a morte celular em ovários de rainhas sem a mediação de *usp*, ou através da participação de uma isoforma expressa diferencialmente e não detectada em nossos experimentos.

5. Material e Métodos

5.1.-Animais e tratamentos hormonais

As abelhas (*Apis mellifera*, africanizadas) foram obtidas do Apiário Experimental do Departamento de Genética da FMRP-USP, em Ribeirão Preto (SP).

Para se obter animais em desenvolvimento com idade controlada, uma rainha adulta era capturada e deixada em condições para ovipositar durante 6 horas num quadro adequado, e isolada por uma tela de confinamento. Para a obtenção de rainhas, larvas recém eclodidas eram transferidas instrumentalmente para células "realeiras" provisionadas com geléia real e colocadas em quadros dentro de colônias de recria para seu desenvolvimento até o estágio desejado (Tabela 5.1). Para a obtenção de operárias, o quadro com as larvas restantes, obtidas da postura controlada, era mantido na mesma colônia de recria até que os animais estivessem no estágio desejado. Em casos de necessidade de manutenção fora da colônia, as realeiras, pupas acondicionadas em placas de Petri ou quadros inteiros, eram mantidos em estufa a 34°C e 80% de umidade relativa.

Para o experimento de avaliação dos níveis de expressão de *usp* em fêmeas jovens (de 0 a 10 dias), as rainhas eram confinadas em pequenas gaiolas individuais (que continham uma pasta de açúcar e mel em proporção 4:1) fixas a uma barra de madeira e esta colocada dentro de uma colônia de recria e mantidas até a idade desejada (Figueiredo et al., 2000). Para a obtenção de operárias adultas, animais recém emergidos eram marcados, com caneta, no tórax e introduzidos numa colônia pequena (núcleo) até a idade desejada.

Nos experimentos de avaliação da resposta de *usp* a HJ, foram realizados tratamentos tópicos de 10µg de HJ-III (*C₁₆-juvenile hormone*, Fluka Biochemika, 59992) dissolvidos em 1µl de acetona, com o auxílio de uma seringa tipo Hamilton (ou com micropipeta automática). As utilizadas como controle recebiam 1µl de

acetona. As pupas tratadas com 20E recebiam uma injeção entre o 2º e 3º segmentos abdominais de 5µg do hormônio dissolvidos em 1µl de 0,9% de NaCl. As utilizadas como controle recebiam 1µl de 0,9% de NaCl.

Tabela 5.1.- Estágios de desenvolvimento e características identificatórias de operárias *Apis mellifera* africanizadas (modificado de Michelette and Soares, 1993).

Estágio	Características
L1	0,0001-0,0003g
L2	0,0003-0,001g
L3	0,0015-0,004g
L4	0,004-0,0248g
L5F1	0,029-0,06g
L5F2	0,06-0,11g
L5F3	0,11-0,16g
L5S1	intestino totalmente cheio
L5S2	metade do intestino cheio
L5S3	intestino totalmente vazio
PP1	pouco movimento, cabeça para cima e comprimento tibia-tarso= 1,4-1,99mm, ainda bem transparente permitindo a visualização do intestino
PP2	imóvel, cabeça para cima e comprimento tibia-tarso=2,0-2,6mm
PP3	imóvel, cabeça para cima e compr. tibia-tarso> 2,6mm. Corpo opaco
Pw	pupa de olho branco (<i>white</i>)
Pp	pupa de olho rosa (<i>pink</i>)
Pdp	pupa de olho rosa-escuro (<i>dark-pink</i>)
Pb	pupa de olho marrom (<i>brown</i>)
Pbl	pupa de olho marrom, com pigmentação leve no tórax
Pbm	pupa de olho marrom, com pigmentação torácica média
Pbd	pupa de olho marrom com pigmentação torácica forte (<i>dark</i>)
Pha	semelhante ao adulto (adulto farato, <i>pharate adult</i>)

5.2.-Imunofluorescência em ovários

Foram extraídos ovários de rainhas e operárias nos estágios larvais L4, F1, F2, F3, S1, S2, S3, PP1, PP2 e PP3 (ver tabela 5.1). As extrações foram feitas com o animal mergulhado em solução fixadora (paraformaldeído 4%). Após a extração, os ovários (8-12 de cada estágio) eram mantidos em solução fixadora por 2h, posteriormente lavados (2x10min) em solução de PBS (0,1M de fosfato de sódio pH 7; 0,15M de NaCl) e mantidos a 4-8°C até processamento ulterior (Schmidt Capella & Hartfelder, 2002) .

Antes da incubação com os respectivos anticorpos, os ovários (pares provenientes de rainhas e operárias da mesma idade) eram permeabilizados através de lavagens (2x15min) em PBS-T (PBS com 0,2% de Tritón-X 100). Seguidamente eram incubados durante 2h a temperatura ambiente em solução 1:25 do anticorpo monoclonal (AB11) anti Usp de *Drosophila melanogaster* (Christianson et al., 1992). Após 3 lavagens de 15min cada em PBS-T, os ovários eram incubados por 2x15min em solução bloqueadora (1% de BSA e 2% de NGS em PBS-T). Seguidamente, estes órgãos eram incubados durante 2h em *anti-mouse* IgG conjugado com Cy3 (1:1500; C2181, Sigma). Em seguida, os ovários eram lavados 2x15min em PBS e montados sob leve pressão (para conseguir separação entre ovariolos) em lâminas com Mowiol (Elvanol, Hoechst, Germany; 5g Mowiol, 20ml PBS; 10ml glicerina, 2,5% N-propil-galato, pH 8,2). As lâminas controle possuíam ovários processados sem o primeiro anticorpo. As preparações foram analisadas e fotografadas sob microscopia epi-fluorescente (Axioshop 2, ZEISS).

5.3.-Extração de RNA total

A região animal dissecada ou o animal inteiro era rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C para a posterior extração de RNA. Alternativamente, as amostras eram previamente mergulhadas em TRIzol, para posterior armazenamento.

A extração de RNA por TRIzol (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento de RNA total, Cat. No. 15596, Gibco Brl.) seguia, resumidamente, o seguinte protocolo: A região animal dissecada ou o animal inteiro num tubo de microcentrifuga de 2ml era homogeneizado em 1ml de Trizol e incubado a temperatura ambiente (TA) por 5 min para a dissociação de complexos nucleoprotéicos. Em seguida, a suspensão era centrifugada a 12000g (e 4°C , como nas seguintes centrifugações) por 10 min. O sobrenadante (850-900 μl) era transferido para outro tubo e submetido a 200 μl de clorofórmio, agitado fortemente na mão durante 15seg e incubado a TA por 3min. Posteriormente, a solução era centrifugada por 15min a 12000g. O sobrenadante (fase aquosa, 400-500 μl) era passado para outro tubo, ao qual eram adicionados posteriormente mais 500 μl de clorofórmio, agitado no vortex e centrifugado por 10min a 12000g. À fase aquosa resultante eram adicionados 500 μl de isopropanol, e o conjunto, submetido a vortex e incubado a TA por 10min. Seguia a isto, uma centrifugação por 10min a 12000g e posterior descarte de sobrenadante. Em seguida, o pellet era lavado em 1ml de etanol 75% (e armazenado se necessário a -70°C) mediante uma centrifugação (depois de vortex) por 5min a 10000g. O sobrenadante era eliminado e o pellet secado a $55-60^{\circ}\text{C}$ durante 5min em banho seco. Finalmente, o pellet era redissolvido em 15-20 μl de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e a concentração da solução final estimada por absorvância óptica em espectrofotômetro a 260/280nm. Qualquer que tenha sido o método de extração e

a utilização posterior, o RNA extraído era tratado com DNase antes de sua quantificação. Assim, a cada uma das amostras era adicionado aproximadamente 0,3µl de DNase (*RQ1 RNase-Free DNase*, Cat. M6101, Promega) e quantidade suficiente de seu tampão (10X). As amostras eram assim incubadas a 37°C durante 30min (para a ação deoxirribonucleásica) e posteriormente a 65°C durante 10min (inativação da DNase).

5.4.-Síntese de cDNAs

Tanto para os experimentos de clonagem quanto para a quantificação de amostras de mRNA, os RNAs totais eram submetidos diretamente a retro-transcrição (RT) usando-se o kit *SuperScript II* (Cat. 18064-014, Gibco Brl) com o *Oligo (dT)₁₂₋₁₈* (Cat. 18418-012, Invitrogen) como primer.

5.5.-Amplificação de cDNA por PCR convencional

Nos experimentos realizados visando a amplificação de fragmentos do cDNA de *ultraspiracle* de rainhas *Apis mellifera*, foram utilizados *primers* construídos com base na seqüência correspondente de operárias. As amplificações foram feitas nas seguintes condições:

- 1 µl de *forward* primer (10µM)
- 1 µl de cDNA
- 1 µl de *reverse* primer (10µM)
- 22 µl água destilada estéril
- 1 *bead (puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads*, Cat. 27-9557-01, Amersham),

colocados num tubo de 200µl (sendo adicionados 30µl de óleo mineral

nos casos de utilização de ciclador térmico sem *hot bonnet*) e submetidos a:

94°C por 2'00"	45X
94°C por 0'30"	
XX°C por 0'30"	
72°C por 0'40"	
72°C por 10'00"	

As amplificações eram feitas no PTC-100 *Programmable Thermal Controller Peltier-Effect Cycling*, MJ Research ou no *GeneAmp PCR System 9700*, Applied Biosystems.

Os produtos de amplificação eram separados em géis de agarose e as bandas obtidas eram cortadas e submetidas à recuperação do DNA mediante o uso do *QIAquick Gel Extraction Kit* (Cat. 28706, QIAGEN). Este processo foi realizado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante (levando a peça de gel a 50°C em tampão até dissolver a agarose e submetendo a solução a uma coluna de filtração onde o DNA era lavado e posteriormente recuperado no tampão de eluição). Quando o produto de amplificação rendia só uma banda no gel de agarose, se procedia à ligação direta de 2µl de produto.

5.6.-Clonagem de fragmentos de DNA

5.6.1.-Ligação

Os fragmentos de cDNA amplificados e recuperados dos géis de agarose (ou provenientes diretamente da PCR) eram inseridos no vetor plasmidial Topo TA Cloning (pCR 2.1-TOPO, Invitrogen, Cat. K4500-01; Figura 5.1) e clonados na cepa de *E. coli* DH5α.

Assim, para a ligação do fragmento ao vetor misturavam-se:

4µl de DNA recuperado
1µl de tampão de ligação (*salt solution*)
1µl *Topo vector*

e deixava-se incubando a TA até 30min.

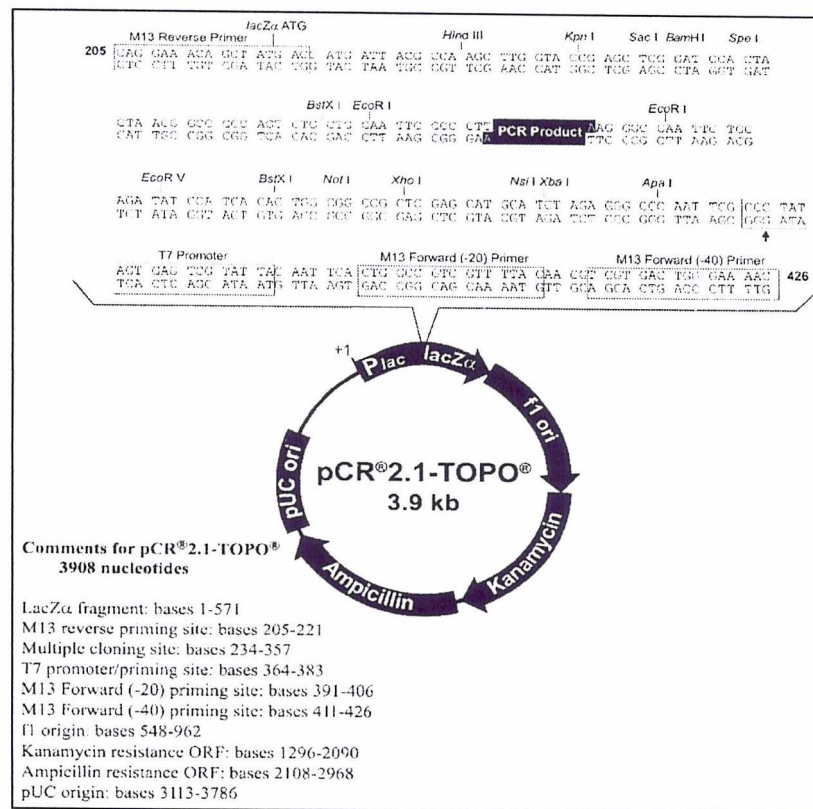


Figura 5.1.- Mapa e seqüência da região de clonagem do vetor utilizado (protocolo Invitrogen).

5.6.2.-Obtenção de células competentes (DH5α)

Um pellet bacteriano, produto de crescimento (de células em estoque) *overnight* a 37°C em 5ml de meio líquido (LB) em agitação contínua, foi ressuspensionado em 5ml de Cloreto de Ca 0,1M e incubado em gelo por 25min. Esta suspensão foi centrifugada a 4000rpm durante 5min e o pellet ressuspensionado em 5ml de Cloreto de Ca com 15% de glicerol. As suspensões assim preparadas foram aliquotadas (200μl) em criotubos de 2ml, congeladas em Nitrogênio líquido e estocadas a -80°C. Alternativamente, eram usadas células competentes incluídas no kit do Topo (pCR 2.1-TOPO, Invitrogen, Cat. K4500-01).

5.6.3.-Transformação bacteriana e avaliação de produtos de clonagem

Após a ligação, os 6 μ l de solução plasmidial contendo o inserto eram usados para transformação bacteriana. Para isso, 200 μ l de suspensão bacteriana (células competentes) eram transferidos para um tubo de 1,5ml (ou usadas diretamente as células do Kit Topo) ao qual era adicionado o plasmidio ligado, e o conjunto incubado em gelo durante 30min. Posteriormente, a suspensão era submetida a 42°C durante 30-90seg e a gelo durante outros 90seg. Depois disso, eram adicionados 200-800 μ l de meio líquido (LB) e o conjunto incubado a 37°C durante 1h sob agitação, centrifugado e o pellet (aprox. 200 μ l) usado para semear uma placa de Petri com meio sólido contendo X-Gal, IPTG e ampicilina. As placas eram mantidas 12h a 37°C depois do que as colônias brancas eram inoculadas em 4ml de meio líquido, cultivadas *overnight* e o pellet resultante de uma centrifugação leve, submetido a uma minipreparação para extração de DNA plasmidial.

As minipreparações plasmidiais eram feitas com o *NucleoSpin Plus Plasmid Miniprep Kit* (Cat. K3063-2, Clontech), que rendem 50 μ l de DNA eluído. Este produto era submetido a digestão enzimática (EcoR I, ver Figura 5.2) para avaliação da presença de inserto, da seguinte maneira:

3 μ l de DNA plasmidial
2 μ l de tampão 10X p/EcoR I
14,5 μ l de água destilada estéril
0,5 μ l de EcoR I,

eram misturados e incubados durante 1h a 37°C. Posteriormente, os produtos de digestão eram separados em géis de agarose e visualizados sob luz ultravioleta.

5.6.4.-Seqüenciamento de fragmentos de cDNA e análise de seqüências

Os sequenciamentos eram feitos pelo método de Sanger et. al. (1977), mediante a utilização do *GeneScan, Automated DNA Sequencing e Genetic Analyzer ABI PRISM 310* da *Applied Biosystems*, com primers M13/SP6. As seqüências correspondentes aos fragmentos clonados foram ensambladas usando o pacote de programas phredPhrap e os *contigs* obtidos eram analisados mediante o uso de programas disponíveis nos seguintes endereços:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>
<http://www.clustalw.genome.ad.jp/>
<http://www.justbio.com>

Os resultados dos alinhamentos feitos utilizando o ClustalW foram transformados para o formato Mega 2.1 (Kumar et al., 2001). A construção de árvores usando o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*; Mount, 2001) esteve baseada em 100 repetições (*bootstrap*).

5.7.-Marcação de sondas “luminescentes”

Nos nossos experimentos de PCR-*Southern blott* e nos de *Southern blot* para a estimativa do número de cópias gênicas, onde se supunha que os alvos de hibridação encontravam-se suficientemente representados, resolvemos utilizar sondas que fossem capazes de impressionar placas radiográficas mediante fenômenos outros que a emissão de radiação de alta energia. Assim, utilizamos para a marcação dos DNAs o *Gene Images random prime labelling module* (Cat. RPN 3540-1, Amersham-pharmacia). Num tubo de 200 μ l era diluído aproximadamente 1 μ g de DNA (correspondente ao clone do respectivo cDNA) em 30 μ l (ou quantidade suficiente para volume final de 50 μ l) de água destilada estéril. Posteriormente, era fervido por 5min e resfriado rapidamente em gelo. Em seguida,

eram adicionados 10 μ l de mistura de nucleotídeos (incluindo fluoresceína-11-dUTP), 5 μ l de primers (nonámeros aleatórios) e 1 μ l de enzima Klenow (5 unidades/ μ l). Esta mistura de reação era incubada a 37°C durante 1h, e ao final da síntese eram adicionados 5 μ l de EDTA 0,5M e a sonda assim marcada era congelada a -20°C.

5.8.-Marcação de sonda radiativa e hibridação

O DNA era marcado com α -³²P pelo método de *random priming* usando-se o kit *Random Primers DNA Labelling System* (Gibco Brl). Aproximadamente 50ng de DNA eram diluídos em 20 μ l de água destilada estéril em tubos de polipropileno. Posteriormente, eram fervidos por 5min e resfriados rapidamente em gelo. Em seguida, eram adicionados 15 μ l de tampão *Random Primers Mixture* [HEPES 0,67M, Tris-HCl 0,17M, MgCl₂ 17mM, 2-mercaptoetanol 33 mM, BSA 1,33mg ml⁻¹, oligodeoxirribonucleotídeo primers (hexámeros) 18 OD₂₆₀ unidades ml⁻¹, pH 6,8], dATP 10 μ M, dGTP 10 μ M, dTTP 10 μ M, (α -³²P)dCTP 50 μ Ci, 1 μ l da enzima Klenow (2 unidades) e 49 μ l de água destilada estéril. A solução era incubada para a reação a TA por 1h e interrompida pela adição de 5 μ l de tampão Stop (Na₂ EDTA 0,2M, pH 7,5). Para eliminar nucleotídios não incorporados, a mistura era filtrada em colunas de Sephadex G-50, previamente hidratadas em tampão TE. Logo após, a sonda era fervida por 5min, resfriada em gelo e utilizada nas hibridações.

Depois da fixação do ácido nucléico correspondente, as membranas eram pré-hibridadas durante 2h a 55-65°C em 15ml de solução de hibridação [SSC 10X 15ml, Solução de Denhardt 100X 1,25ml, Solução SDS 10% 1,25ml, água destilada para 25ml e 0,5ml de Solução de esperma de salmão (1mg ml⁻¹) fervida por 5min e resfriada]. Após 2h era adicionada a sonda marcada radiativamente (previamente

fervida e resfriada em gelo) e o sistema incubado em forno sob movimento leve durante 12-24h. Após hibridação, as membranas eram submetidas a 2 lavagens de 15min a 65°C nas respectivas soluções seguintes: SSC 2X, SDS 0,1% (m/v) e SSC 1X, SDS 1% (m/v). Posteriormente, as membranas eram embrulhadas em papel plástico e expostas a filmes auto-radiográficos (XAR-5 X-ray, Kodak) a -70°C até a obtenção de sinal (5-7 dias) e reveladas manualmente.

5.9.-Estimando o número de cópias de *usp*

5.9.1.-Obtenção de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico, foi usada uma pupa de operária por tubo de extração, a qual era macerada com auxílio de almofariz e pistilo, após congelamento em nitrogênio líquido. A suspensão foi transferida rapidamente para tubos estéreis e incubada sob agitação branda, em presença de 10ml de tampão de extração estéril (Tris-HCl 200mM, NaCl 250mM, EDTA 25mM, SDS 0,5% e água destilada para 1000ml, pH8,5). A extração do DNA era feita adicionando-se 1 volume de fenol/clorofórmio e centrifugando-se o macerado por 10min a 20000g. O DNA era recuperado do sobrenadante mediante precipitação com acetato de sódio 0,3M (pH 5,2) e 2,5 volumes de etanol absoluto. O DNA assim obtido era ressuspenso em água estéril e estocado a 4°C. Sua concentração final era estimada por absorvância óptica em espectrofotômetro a 260nm.

5.9.2.-Digestão de DNA genômico e Southern blot

Trinta µg de DNA genômico foram digeridos com as seguintes endonucleases e de acordo com o respectivo protocolo: Stu I (Biolabs), Kpn I (Invitrogen), Eco RI (Invitrogen), Bam HI (Invitrogen), Sma I (Biolabs), Bcl I (Gibco).

As enzimas não podiam cortar a região do cDNA correspondente à seqüência da sonda utilizada. Os produtos de digestão foram separados em géis de agarose (1%) e transferidos para membrana (de náilon, *Biodyne B Membrane* 45 μ m, Cat. 14856-017, Gibco Brl) mediante um sistema de "sandwich" (transferência por capilaridade, modificado de Sambrook et al., 1989) por 12-24h em SSC 10X (em lugar de colocar o tampão num recipiente, este era usado para umedecer uma pilha de 6 camadas de papel de tipo Whatman 3MM). Após a transferência, o DNA era fixado à membrana mediante 200Jw/cm² de UV 254nm durante 4min. Seguidamente, a membrana era submetida ao processo de hibridação ou guardada em geladeira, embrulhada em papel plástico e alumínio e umedecida em SSC 10X.

Para a hibridação, as membranas eram incubadas em movimento lento durante aproximadamente 2h a 60°C em 20ml de solução de pré-hibridação (0,02g SDS, 5ml SSC 20X, 1g Sulfato de dextrano, 1ml de Solução bloqueadora e água estéril em quantidade suficiente). Em seguida, eram adicionados à solução de pré-hibridação 15 μ l da sonda luminescente previamente fervida e resfriada. Seguidamente, a membrana era incubada em movimento lento durante aproximadamente 16h.

Após a hibridação, a membrana era lavada em movimento durante 15min à mesma temperatura em 100ml de 0,1g de SDS e 5ml de SSC 20X em água destilada estéril. Em seguida, era lavada por igual tempo e temperatura em 100ml de 0,1g de SDS e 2,5ml de SSC em água destilada estéril. Posteriormente, a membrana era incubada a TA e movimento lento durante 1h numa solução bloqueadora (que igual que os reagentes utilizados nas seguintes etapas da revelação das membranas, forma parte do *Gene Images CDP-Star detection module*, Cat. RPN 3510-1, Amersham-pharmacia) que continha 45ml de "tampão A" e 5ml de Solução bloqueadora 10x. O "tampão A", elaborado e autoclavado no dia

anterior, está constituído por 6,05g de Tris e 8,76g de NaCl em 500ml de água destilada (pH 9,5). Uma vez bloqueados os epitopes inespecíficos, a membrana era incubada a TA e movimento lento durante 1h numa solução de anticorpo (0,125g de albumina bovina, 25ml de tampão A e 5 μ l de antifluoresceína conjugada com fosfatase alcalina, FA). Logo após, a membrana era lavada 4x10min num excesso de tampão A com 0,3% de Tween 20 (eliminação de anticorpo ligado inespecificamente).

Finalmente, a membrana era submetida durante 3min a uma solução de detecção (com dioxetano como substrato da FA, que ao ser decomposto emite luz visível) e em seguida posta em contacto com um filme (*BioMax*, *X-Omat AR*, Cat. Z35,848-7, Sigma) entre 35seg-20min a TA (a revelação era feita manualmente).

5.10.-RT/PCR semi-quantitativa/Southern blot

Em todos os experimentos de quantificação de níveis de expressão de mRNAs utilizamos PCR semiquantitativa, isto é, RT seguida de PCR e *Southern blot* (os primeiros resultados destes experimentos foram confirmados por *real time PCR*).

O RNA total extraído das amostras respectivas era submetido a 2-3 medições de concentração e uma alíquota de 1-2 μ g foi utilizada como amostra inicial para a avaliação da expressão dos genes em estudo. O RNA era submetido seguidamente a RT da maneira exposta na Seção 5.4.

A realização dos experimentos de PCR semiquantitativa requer a determinação do número de ciclos de amplificação que corresponda à fase linear da curva de amplificação do gene alvo, o qual pode ser avaliado pela visualização dos produtos num gel de agarose corado com brometo de etídio (pegando amostras depois de diferentes números de ciclos). Requer também a amplificação controle

de um RNA presente em proporções relativamente constantes durante o desenvolvimento ou cuja expressão não seja modificada por eventuais tratamentos. Em nosso caso, utilizamos o rRNA 28S e o mRNA da β -actina (sub-clonados e seqüenciados em nosso Laboratório). Para a amplificação definitiva dos cDNAs das amostras, foram adicionados em tubos de 200 μ l:

1 μ l de *forward* primer (10 μ M; ver Tabela 5.2)
1 μ l de cDNA (obtido segundo detalhado em Seção 5.3-4)
1 μ l de *reverse* primer (10 μ M; ver Tabela 5.2)
10 μ l de Máster Mix (2,5X; Eppendorf, Cat. 0032.002.250)
12 μ l água destilada estéril

Esta mistura de reação era submetida às seguintes condições de amplificação:

94°C por 2'00"	15-29X
94°C por 0'30"	
58°C por 0'30"	
72°C por 0'40"	

As amplificações foram feitas no PTC-100 *Programmable Thermal Controller Peltier-Effect Cycling*, MJ Research ou no *GeneAmp PCR System 9700*, Applied Biosystems.

Os produtos de amplificação foram testados em géis de agarose (1%, com brometo de etídio) depois da adição de tampão corante. As corridas foram feitas (30-35V/cm²) por aproximadamente 1:45h. Imediatamente depois, os géis foram fotografados e incubados em agitação lenta durante 25min em solução de desnaturação (1,5M NaCl e 0,5M NaOH) e 30min em solução de neutralização (1,5M NaCl e 0,5M Tris-HCl pH 7,5), com uma passagem rápida por água destilada estéril entre ambas. Em seguida, os géis eram montados para transferência para membrana por capilaridade e deixados a TA por 16h e processados como descrito na Seção 5.9.2.

Tabela 5.2.-Primers utilizados nos experimentos de PCR semiquantitativa.

Gene	Seqüência	No de acesso/Ref.
<i>usp</i>	F – A G A C T G C C A A G A T G A T G A A G	AY273778; Barchuk et al., 2004
	R - T C T C T C T T C A T T C C C A T C G C	
<i>vg</i>	F – T T G C T A C T T C T A A C G C T T T T	AJ517411; Piulachs et al., 2003
	R - C G T T T T C T C C A T C T T T G C T A	
<i>ehj</i>	F – G C T T T T C A A T T A G G T A G T G G	A. Mackert, com. pessoal
	R – G A A T G G A T T A T A A T A G A A T C G	
<i>ftz-f1</i>	F - A T C A T C G T C A T C C T C T T C C T	BI946427
	R - C A G G G T T G A G A T T G T G C A G	
<i>proPo</i>	F – C G T C C T G G G A A A T A T C A T G G	AAO72539; Lourenço et al., 2004
	R - G T C C G C G T G A C A A A T C T A C A	
<i>β-actina</i>	F - T G C C A A C A C T G T C C T T T C T G	AB023025
	R - A G A A T T G A C C C A C C A A T C C A	
<i>rRNA</i>	F - T G C T A C T A C C A C C A A G A T C T	AJ302936
	R - A C G A C C T C A C C T A T T C T C A	

F: forward, R: reverse

5.11.-Avaliação da expressão gênica em abelhas knock-down

5.11.1.-Preparação dos dsRNAs

Para a síntese dos dsRNAs, primeiramente obtivemos suficiente quantidade de DNA molde mediante PCR, utilizando *primers* desenhados com base na seqüência do clone AP4a5 de cDNA da *vg* (Piulachs et al., 2003) e do clone 5/6 de cDNA do *usp* (AY273778). Estes *primers* incluem a seqüência correspondente à região promotora T7 (em **negrito**):

vg:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGAACGACTCGACCAACGACTT-3' e

5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGAAACGAAAGGAACGGTCAATTCC-3'

usp:

5'-TAATACGACTCACTATAGGCCGACGACGCTGGAAGATTC-3' e

5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGATAGGCATCCATTGTTC-3'

As amplificações foram feitas mediante PCR convencional, com temperaturas de pareamento calculadas a partir de AT(.2)+GC(.4) (da seqüência gene específica). Os produtos de amplificação foram identificados em géis de agarose e purificados mediante o kit QIAquick™ (QIAGEN).

O dsRNA foi obtido mediante a utilização do kit RiboMax™ T7 system (Promega). Esse kit permite a síntese das cadeias *sense* e *antisense* de RNA numa mesma reação. Seguidamente à transcrição, o produto de reação foi extraído mediante fenol-clorofôrmio e precipitado com acetato de sódio e isopropanol. O pellet foi dissolvido em água livre de RNase para uma concentração de 5µg/µl, e a integridade do produto foi avaliada em gel de agarose após a medição da concentração por absorbância a 260nm.

5.11.2.-Injeção de dsRNA e obtenção de amostras

Nós injetamos 1µl de uma solução de dsRNA (5µg/µl) no abdome de operárias recém nascidas. As injeções foram feitas entre os segmentos abdominais 5º e 6º mediante o uso de uma seringa tipo Hamilton. Abelhas controle não foram injetadas, receberam 1µl de água tratada com DEPC (0,1%), solvente do dsRNA, ou 1µl de água autoclavada. Depois de serem injetadas, as abelhas foram marcadas com caneta e mantidas em gaiolas de madeira (20x20cm) com água e alimento *ad libitum*. Depois de 7 dias as abelhas foram coletadas e anestesiadas em gelo para a coleta de amostras.

A hemolinfa, para a medição dos títulos de HJ, foi obtida com microcapilar de vidro a partir de uma incisão dorsal entre o 2º e o 3º segmentos abdominais. Após a coleta de hemolinfa, os abdomes foram mergulhados em TRIzol e congelados a -80°C para a posterior extração de RNA (segundo protocolo descrito na Seção 5.3).

5.11.3.-Extração de hormônio juvenil a partir de amostras de hemolinfa

Para a medição dos títulos de HJ, foram extraídos 3-5µl de hemolinfa e dissolvidos em 500µl de acetonitrila, agitados em vórtex e armazenados a -20°C em frascos de vidro com tampa de Teflon. O método de extração seguiu o protocolo estabelecido para a hemolinfa de abelhas (Huang et al., 1994). Resumidamente, 1ml de NaCl (0.9%) e 1ml de hexano foram sucessivamente adicionados à fase de acetonitrila e agitados vigorosamente. Depois de 10min em gelo, as fases foram separadas mediante centrifugação lenta (700g). Seguidamente, a fase hexano foi removida e transferida para um novo tubo. A extração foi repetida duas vezes adicionando hexano à fase acetonitrila/solução salina. O *pool* das 3 extrações foi seco em centrifugação a vácuo e o resíduo foi redissolvido em 50µl de tolueno.

5.11.4.-Radioimunoensaio para hormônio juvenil

O anti-soro, anti-HJ, foi diluído para 1:1250 em tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) suplementado com 0,1% da fração V de soro-albumina bovina (Sigma), 0,1% de imunoglobulina G de coelho (Sigma) e 0,02% de azida sódica (Goodman et al., 1990; Goodman et al., 1995). Finalmente foi acrescentado HJ marcado com Trício [10^{-3}H(N)]-juvenile hormone III (*spec. activity* 19.4 Ci/mmol, NEN Life Science Products, Boston) diluído em tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) para 6000-6500cpm por 50µl. Hormônio juvenil III (Fluka) foi usado como ligande não radioativo numa concentração de 100pg/µl. As curvas padrão foram estabelecidas para cobrir a faixa de 50pg a 10ng.

Depois da evaporação do solvente (tolueno), foram adicionados aos tubos correspondentes à solução padrão e aos correspondentes às amostras 50µl de ligande radioativo. Essa solução foi agitada extensivamente, submetida a 200µl de

solução de anti-soro, e o total incubado a 4°C *overnight*. A separação de ligande unido de ligande não unido foi feita por *quenching* com sulfato de amônia (50% de concentração final) durante 30min a 4°C. Após centrifugação (7500g, 15min, 4°C), foi descartado o sobrenadante e o *pellet* foi lavado em sulfato de amônia (50%) para eliminar restos de antígeno não ligado. O pellet assim obtido foi re-dissolvido em 40µl de água antes da adição de 5ml de cocktail para cintilação líquida (HiSafe3, Packard).

Os títulos de HJ de amostras desconhecidas foram calculados mediante regressão linear a partir de uma curva padrão. Os resultados foram expressos em equivalentes de HJ3 (pg/µl de hemolinfa).

5.11.5.-Separação eletroforética de esterases

O fenótipo das abelhas *knock down* para *usp* foi também estudado mediante análises do padrão de expressão de esterases conhecidas em *Apis mellifera* (Bitondi & Mestriner, 1983; Figueiredo et al., 1996). Para tal fim, as abelhas coletadas nos estágios de desenvolvimento desejados eram mantidas a -20°C até seu processamento.

Para a obtenção de amostras, as pupas eram homogeneizadas em uma solução de 0,02M de Tris-HCl, pH 7,5. Seguidamente, a suspensão resultante era centrifugada a 12.400g durante 20min a 5°C. As amostras eram separadas mediante eletroforese em géis de Penetrose 30 (amilóide de peso molecular 23.000, Refinações de Milho do Brasil, Ltda.) 10% em 0,02M de Tris-HCl, pH 4,8-5,9, segundo Figueiredo et al. (1996). Fragmentos de papel Whatman N3 (5x6mm) eram embebidos no sobrenadante, obtido após centrifugação de amostras homogeneizadas, e inseridos em espaços pré-estabelecidos nos géis de penetrose. As separações eram feitas a 7°C e 5V/cm durante 4-5h. Como tampão de eletrodos era utilizada uma solução 0,3M de Tris-HCl, pH 7,5.

A detecção das bandas correspondentes às isoformas de esterases foi realizada mediante a utilização de substratos comprovadamente efetivos para estas enzimas em *Apis mellifera*. Assim, os géis eram cobertos com uma solução de butirato ou acetato (éster de 4-metil-umbeliferil) 0,01% em 0,05M de tampão acetato, pH 5,4 (Bitondi and Mestriner, 1983; Figueiredo et al., 1996), incubados a temperatura ambiente durante 15min e inspecionados sob luz ultravioleta.

6.Considerações finais

Nossos resultados indicam que AmUsp possui maior similaridade com os ortólogos de *Locusta*, *Celuca* e vertebrados do que com outros insetos. Esta característica e sua rápida resposta transcricional a HJ, tanto em rainhas quanto em operárias, sugere que algumas de suas funções podem depender de ligande, e indicam o gene *usp* como um membro primário na cascata de expressão gênica promovida pelo HJ.

Apesar de Usp ser o parceiro de EcR no complexo receptor de ecdisona, em nossos experimentos não observamos um aumento na expressão de *usp* depois do tratamento com este hormônio, mas pelo contrário, observamos uma redução na expressão de *usp* depois de 24h.

Os perfis de expressão de *usp* durante o período pupal parecem ser específicos de casta, com operárias mostrando níveis mais importantes no início do período e um pico em Pbm, contrastando assim com o que acontece em rainhas, onde *usp* parece possuir níveis basais de expressão. Já, a expressão de *usp* durante os primeiros dias de vida adulta, tanto de rainhas quanto de operárias, segue claramente os títulos hemolinfáticos de HJ.

Os resultados obtidos pela utilização da técnica de interferência por RNA mostram a possibilidade da sua utilização para o estudo da diminuição da expressão de genes reguladores durante o desenvolvimento pupal em *Apis mellifera*. Estes resultados, ademais, abrem possibilidades de estudo de função gênica em organismos não tradicionalmente tidos como modelo de estudo e para os quais não se dispõem de mutantes específicos.

O atraso no desenvolvimento (avaliado pela pigmentação corporal, formação de cerdas e asas e persistência da atividade de esterase 2a) das abelhas *knock down* para *usp* sugere a sua participação no início dos processos de desenvolvimento pupal. Como Usp é considerado constituinte do complexo receptor de ecdisona, sua deficiência em abelhas Pw não permitiria a mediação

correta dos processos dependentes deste hormônio. As alterações morfológicas observadas nas abelhas *KDusp* são explicadas se consideramos que a diminuição da expressão de *usp* trouxe acarretada, ademais de uma queda na sua participação direta em certos processos, uma equivalente atenuação na atividade de outros genes com função reguladora (*ftz-f1* e *ehj*). Estes experimentos, por outro lado, não confirmaram a participação direta de *Usp* no controle da expressão de vitelogenina e da pro-fenoxidase no final do desenvolvimento pupal, processos que merecem o estudo da organização molecular das diferentes regiões importantes na biologia destes genes, inclusive de *usp*. Estes estudos podem ver-se facilitados atualmente pela disponibilidade de boa parte da seqüência genômica de *Apis mellifera* (Baylor College of Medicine; <http://hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>) e de numerosas ferramentas informáticas, algumas, de livre acesso.

Os perfis de expressão de *usp* em ovários de rainhas e operárias durante o desenvolvimento larval, embora sugiram uma relação positiva entre os títulos de HJ e níveis do mRNA deste gene, não indicam à proteína *Usp* como responsável pela mediação da prevenção da morte celular de ovaríolos, mas sim, como associada ao processo. De ser assim, provavelmente o faça formando parte do complexo receptor de ecdisona. Desta maneira, níveis altos de HJ poderiam prevenir a morte celular em ovários de rainhas sem a mediação de *usp*, ou através da participação de uma isoforma expressa diferencialmente e não detectada em nossos experimentos.

Os dados obtidos durante a realização do presente trabalho permitem começar a elaboração de um modelo conceitual da rede de expressão gênica promovida pelo HJ durante o desenvolvimento e diferenciação de castas de *Apis mellifera* (Figura 6.1). No modelo apresentado, que funcionaria basicamente como hipótese de trabalho, o HJ atuaria ativando a proteína *Usp* e induzindo a expressão

de *usp*, o qual levaria a uma amplificação do sinal original. Posteriormente, o complexo poderia, através do recrutamento de co-reguladores, mediar o controle da expressão de genes alvo (*ehj*, *ftz-f1*, etc.).

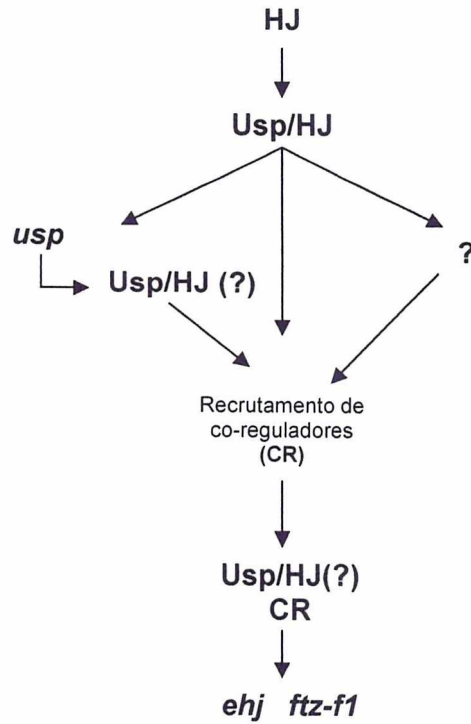


Figura 6.1.- Modelo hipotético (de trabalho) de ação do HJ durante o desenvolvimento pupal de *Apis mellifera*.

7. Referências bibliográficas

- Ahmed A., Martín D., Manetti A.G.O., Han S.J., Lee W.J., Mathiopoulos K.D., Mülller H.M., Kafatos F.C., Raikhel A. and Brey P.T.** (1999) Genomic structure and ecdysone regulation of the prophenoloxidase 1 gene in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 26:14795-14800
- Amdam G.V., Simões Z.L.P., Guidugli K.R., Norberg K. and Omholt S.W.** (2003) Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnology*, <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/3/1>
- Arbeitman M.N. and Hogness D.S.** (2000) Molecular chaperons activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell*, 101:67-77
- Asahina M., Jindra M. and Riddiford L.M.** (1997) Developmental expression of Ultraspiracle proteins in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, during larval life and the onset of metamorphosis. *Dev. Genes Evol.*, 20:381-388
- Ashburner M.** (1974) Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. The effects of inhibitors of protein synthesis. *Dev. Biol.*, 39:141-157
- Ashburner M., Chihara C., Meltzer P. and Richards G.** (1974) Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 38:655-662
- Baehrecke E.H.** (1996) Ecdysone signaling cascade and regulation of *Drosophila* matamorphosis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 33:231-244
- Baker K.D., Warren J.T., Thumel C.S., Gilbert L.I. and Mangelsdorf D.J.** (2000) Transcriptional activation of the *Drosophila* ecdysone receptor by insect and plant ecdysteroids. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 30:1037-1043

- Barchuk A.R., Bitondi M.M.G. and Simões Z.L.P.** (2002) Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. 9pp. *J. Insect Science*, 2:1. Available online: insectscience.org/2.1
- Barchuk A.R., Maleszka R. and Simões Z.L.P.** (2004) *Apis mellifera ultraspiracle*: cDNA sequence and rapid up-regulation by juvenile hormone. *Insect Mol. Biol.*, 13:000-000
- Barton Browne L.** (2001) Quantitative aspects of the regulation of ovarian development in selected anautogenous Diptera: integration of endocrinology and nutrition. *Ent. Exp. Appl.*, 100:137-149
- Beetsma J.** (1979) The process of queen-worker differentiation in the honey bee. *Bee Wld*, 60:24-39
- Beye M., Hartel S., Hagen A., Hasselmann M. and Omholt S.W.** (2002) Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Mol. Biol.*, 11:527-532
- Billas I.M.L., Moulinier L., Rochel N. and Moras D.** (2001) Crystal structure of the ligand-binding domain of the ultraspiracle protein USP, the ortholog of retinoid X receptors in insects. *J. Biol. Chem.*, 276:7465-7474
- Bitondi M.M.G. and Mestriner M.A.** (1983) Esterase isozymes of *Apis mellifera*: Substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny, and electrophoretic variability. *Biochem. Gen.*, 21:985-1002
- Bitondi M.M.G., Mora I.M., Simões Z.L.P. and Figueiredo V.L.C.** (1998) The *Apis mellifera* pupal melanization program is affected by treatment with a juvenile hormone analogue. *J. Insect Physiol.*, 44:499-507

- Bloch G., Wheeler D.E. and Robinson G.E.** (2002) Endocrine influences on the organization of insect societies. In: Pfaff D.W., Arnold A.P., Ettgen A.M., Fahrbach S.E. and Rubin R.T. (Eds.). *Hormones, brain and behavior*. Elsevier USA, pp. 195-235
- Boleli I.C., Hartfelder K. and Simões Z.L.P.** (1995) Serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and neuroendocrine system of honey bee (*Apis mellifera*) larvae and pupae. *Zoology*, 99:58-67
- Boleli I.C., Simões Z.L.P. and Bitondi M.M.G.** (1999) Cell death in ovarioles causes permanent sterility in *Frieseomelitta varia* worker bees. *J. Morphol.*, 242:271-282
- Boleli I.C., Simões Z.L.P. and Bitondi M.M.G.** (2000) Regression of the lateral oviducts during the larval-adult transformation of the reproductive system of *Melipona quadrifasciata* and *Frieseomelitta varia*. *J. Morphol.*, 243:141-151
- Boleli I.C., Simões Z.L.P. and Hartfelder K.** (1998) The stomatogastric nervous system of the honey bee (*Apis mellifera*) in a critical phase of caste development. *J. Morphol.*, 236:139-149
- Bourguet W., Ruff M., Chambon P., Gronemeyer H. and Moras D.** (1995) Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor α -RXR. *Nature*, 375:377-382
- Bownes M.** (1994) The regulation of the yolk protein genes, a family of sex differentiation genes in *Drosophila melanogaster*. *BioEssays*, 10:745-752
- Bownes M., Ronaldson E. and Mauchline D.** (1996) 20-Hydroxyecdysone, but not juvenile hormone, regulation of yolk protein gene expression can be mapped to *cis*-acting DNA sequences. *Dev. Biol.*, 173:475-89
- Brink M., Humbel B.M., De Kloet E.R. and Vandriel R.** (1992) The unliganded glucocorticoid receptor is localized in the nucleus, not in the cytoplasm. *Endocrinology*, 130:3577

- Broadus J., McCabe J.R., Endrizzi B., Thummel C.S. and Woodard C.T.** (1999) The *Drosophila* β -FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Mol. Cell*, 3:143-149
- Campos L.A. de O., Velthuis H.H.W. and Velthuis-Kluppel F.M.** (1975) Juvenile hormone and caste determination in a stingless bee. *Naturwissenschaften*, 62:98-99
- Chambon P.** (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.*, 10:940-954
- Christianson A.M.K., King D.L., Hatzivassiliou E., Casas J.E., Hallenbeck P.L., Nikodem V.M., Mitsialis S.A. and Kafatos F.C.** (1992) DNA binding and heterodimerization of the *Drosophila* transcription factor chorion factor 1/ultraspiracle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:11503-11507
- Chung A.C.K., Durica D.S., Clifton S.W., Roe B.A. and Hopkins P.M.** (1998) Cloning of crustacean ecdysteoid receptor and retinoid-X receptor gene homologs and elevation of retinoid-X receptor mRNA by retinoic acid. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 139:209-227
- Clayton G.M., Peak-Chew S.Y., Evans R.M. and Schwabe J.W.R.** (2001) The structure of the ultraspiracle ligand-binding domain reveals a nuclear receptor locked in an inactive conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:1549-1554
- Clever U. and Karlson P.** (1960) Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrusenchromosomen von *Chironomus tentans* durch Ecdyson. *Exp. Cell Res.*, 20:623-626
- Cnaani J., Borst D.W., Huang Z.Y., Robinson G.E. and Hefetz A.** (1997) Caste determination in *Bombus terrestris*: Differences in development and rates of JH biosynthesis between queen and worker larvae. *J. Insect Physiol.*, 43:373-381

- Copper M.P., Klaassen I., Brakenhoff R.H., Cloos J., Snow G.B. and Braakhuis B.J.M.** (1997) All-trans retinoic acid induced gene expression and growth inhibition in head and neck cancer cell lines. *Oral Oncol.*, 33:270-274
- Crossgrove K., Bayer C.A., Fristrom J.W. and Guild G.M.** (1996) The *Drosophila Broad-Complex* early gene directly regulate late gene transcription during the ecdysone-induced puffing cascade. *Dev. Biol.*, 180:745-758
- Danielian P.S., White R., Lees J.A. and Parker M.G.** (1992) Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.*, 11:1025-1033
- Davey K.G. and Gordon D.R.** (1996) Fenoxycarb and thyroid hormones have JH-like effects on the follicle cells of *Locusta migratoria in vitro*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 32:613-622
- Dedej S., Hartfelder K., Aumeier P., Rosenkranz P. and Engels W.** (1998) Caste determination is a sequential process: effect of larval age at grafting on ovariole number, hind leg size and cephalic volatiles in the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *J. Apic. Res.*, 37:183-190
- Durand B., Saunders M., Gaudon C., Roy B., Losson R. and Chambon P.** (1994) Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J.*, 13:5370-5382
- Egea P.F., Mitschler A. and Moras D.** (2002) Molecular recognition of agonist ligands by RXRs. *Mol. Endocrinol.*, 16:987-997
- Engelmann F.** (1995) The juvenile hormone receptor of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 25:721-726

- Engels W. and Imperatriz-Fonseca V.L.** (1990) Caste development, reproductive strategies and control of fertility in honey bees and stingless bees. In: Engels W. (Ed.). *Social insects. An evolutionary approach to castes and reproduction*. Springer-Verlag, Berlin, pp 167-230
- Engels W., Kaatz H., Zillikens A., Paulino Simões Z.L., Trube A., Braun R. and Dittrich F.** (1990) Honeybee reproduction: Vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In Hoshi M. and Yamashita O. (Eds). *Advances in Invertebrate Reproduction 5*. Elsevier, Amsterdam, pp 495-502
- Evans J.D. and Wheeler D.E.** (2001) Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. *BioEssays*, 23:62-68
- Evans R.M.** (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240:889-895
- Figueiredo V.L.C., Bitondi M.M.G. and Paulino-Simões Z.L.** (1996a) Esterase inhibition during several immature worker stages of *Apis mellifera* following topical application of DDVP insecticide. *J. Apic. Res.*, 35:37:43
- Figueiredo V.L.C., Laure M.A.F.B., Cremonez T.M. and Aguiar L.R.** (2000) Seleção de métodos de confinamento de rainhas virgens por um período longo. Anais do XIII Congresso Brasileiro de Apicultura. Florianópolis, Brasil
- Figueiredo V.L.C., Paulino-Simões Z.L. and Bitondi M.M.G.** (1996b) Developmental pattern of esterases in *Apis mellifera* L. honey bees. I. Stage-dependent changes of esterase isoenzymes in Africanized workers. *Apidologie*, 27:47-54
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E. and Mello C.C.** (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391:806-811

- Fluri P., Lüscher M., Wille H. and Gerig L.** (1982) Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *J. Insect Physiol.*, 28:61-69
- Forman B.M., Goode E., Chen J., Oro A.E., Bradley D.J., Perlmann T., Noonan D.J., Burka L.T., McMorris T. and Lamph W.W., et al.** (1995) Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*, 81:687-93
- Gianini F., Maestro R., Vukosavljevic T., Pomponi F. and Boicchi M.** (1997) All-*trans*, 13-*cis* and 9-*cis* retinoic acids induce a fully reversible growth inhibition in HNSC cell lines: implications for in vivo retinoic acid use. *Int. J. Cancer*, 70:194-200
- Gilbert L.I., Granger N.A. and Roe R.M.** (2000) The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 30:617-644
- Gissendanner C.R., Crossgrove K., Kraus K.A., Maina C.V. and Sluder A.E.** (2003) Expression and function of conserved nuclear receptor genes in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 266:399-416
- Glass C. and Rosenfeld M.G.** (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.*, 14:121-141
- Goodman W.G., Coy D.C., Baker F.C., Xu L. and Toong Y.C.** (1990) Development and application of a radioimmunoassay for the juvenile hormones. *Insect Biochem.*, 20:357-364
- Goodman W.G., Orth A.P., Toong Y.C., Ebersohl R., Hiruma K. and Granger N.A.** (1995) Recent advances in radioimmunoassay technology for the juvenile hormones. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 30:295-306
- Hagenguth H. and Rembold H.** (1978) Identification of juvenile hormone III as the only JH homolog in all developmental stages of the honey bee. *Z. Naturforsch.*, 33c:847-850

- Hall B.L. and Thummel C.S.** (1998) The RXR homolog Ultraspiracle is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor. *Development*, 125:4709-4717
- Hannan G.N. and Hill R.J.** (2001) *Lcusp*, an *ultraspiracle* gene from the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*: cDNA cloning, developmental expression of RNA and confirmation of function. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31:771-781
- Hannon G.J.** (2002) RNA interference. *Nature*, 418:244-251
- Hartfelder K.** (1990) Regulatory steps in caste development of eusocial bees. In: Engels W. (Ed.). Social insects. An evolutionary approach to castes and reproduction. Springer-Verlag, Berlin, pp 245-264
- Hartfelder K. and Engels W.** (1998). Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr. Top. Dev. Biol.* 40:45-77
- Hartfelder K. and Steinbrück G.** (1997) Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. *Inv. Reprod. Dev.*, 31:237-250
- Hartfelder K., Bitondi M.M.G., Santana W.C. and Simões Z.L.P.** (2002) Ecdysteroid titer and reproduction in queens and workers of the honey bee and of a stingless bee: loss of ecdysteroid function at increasing levels of sociality? *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32:211-216.
- Hartfelder K., Cnaani J. and Hefetz A.** (2000) Caste-specific differences in ecdysteroid titers in early larval stages of the bumblebee *Bombus terrestris*. *J. Insect Physiol.*, 46:1433-1439
- Hartfelder K., Köstlin K. and Hepperle C.** (1995) Ecdysteroid-dependent protein synthesis in caste-specific development of the larval honey bee ovary. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 205:73-80

- Haydak M.H.** (1943) Larval food and development of castes in the honeybee. *J. Econ. Entomol.*, 36:778-792
- Hayward D.C., Dhadialla T.S., Zhou S., Kuiper M.J., Ball E.E., Wyatt G.R. and Walker V.K.** (2003) Ligand specificity and developmental expression of RXR and ecdysone receptor in the migratory locust. *J. Insect Physiol.*, 49:1135-1144
- Hefetz A., Taghizadeh T. and Francke W.** (1996) The exocrinology of the queen bumble bee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 51:409-422
- Henrich V.C. and Brown N.E.** (1995) Insect Nuclear Receptors: A developmental and comparative perspective. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 25:881-897
- Henrich V.C., Szekely A.A., Kim S.J., Brown N.E., Antoniewski C., Hayden M.A., Lepesant J.A., and Gilbert L.I.** (1994) Expression and function of the *ultraspiracle (usp)* gene during development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 165:38-52
- Hepperle C. and Hartfelder K.** (2001) Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development. *Naturwissenschaften*, 88:113-116
- Hiruma K., Shinoda T., Malone F. and Riddiford L.M.** (1999) Juvenile hormone modulates 20-hydroxyecdysone-inducible ecdysone receptor and ultraspiracle gene expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Genes Evol.*, 209:18-30
- Hodin J. and Riddiford L.M.** (2000) Parallel alterations in the timing of ovarian Ecdysone Receptor and Ultraspiracle expression characterize the independent evolution of larval reproduction in two species of gall midges (Diptera: Cecidomyiidae). *Dev. Genes Evol.*, 210:358-372
- Hollenberg S.M. and Evans R.M.** (1988) Multiple and cooperative *trans*-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*, 55:899-906

- Horner M.A., Chen T. and Thummel C.S.** (1995) Ecdysteroid regulation and DNA binding properties of *Drosophila* nuclear hormone receptor superfamily members. *Dev. Biol.*, 168:490-502
- Huang Z.Y., Robinson G.E. and Borst D.W.** (1994) Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. *J. Comp. Physiol. A*, 174:731-739
- Huet F., Ruiz C. and Richards G.** (1993) Puffs and PCR: the in vivo dynamics of early gene expression during ecdysone responses in *Drosophila*. *Development*, 118:613-627
- Huet F., Ruiz C. and Richards G.** (1995) Sequential gene activation by ecdysone in *Drosophila melanogaster*: the hierarchical equivalence of early and early late genes. *Development*, 121:1195-1204
- Ismail S.M., Satyanarayana K., Bradfield J.Y., Dahm K.H. and Bhaskaran G.** (1998) Juvenile hormone acid: Evidence for a hormonal function in induction of vitellogenin in larvae of *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 37:305-314
- Jiang H., Gyda M., Harnish D.C., Chandraratna R.A., Soprano K.J., Kochhar D.M. and Soprano D.R.** (1994) Teratogenesis by retinoic acid analogs positively correlates with elevation of retinoic acid receptor- β 2 mRNA levels in treated embryos. *Teratology*, 50:38-43
- Jindra M., Huang J.Y., Malone F., Asahina M. and Riddiford L.M.** (1997) Identification and mRNA developmental profiles of two Ultraspiracle isoforms in the epidermis and wing of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Molec. Biol.*, 6:41-53
- Jones G.** (1995) Molecular mechanisms of action of juvenile hormone. *Annu. Rev. Entomol.*, 40:147-169

- Jones G. and Jones D.** (2000) Considerations on the structural evidence of a ligand-binding function of ultraspiracle, an insect homolog of vertebrate RXR. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30:671-679
- Jones G. and Sharp P.A.** (1997) Ultraspiracle: An invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:13499-13503
- Jones G., Wozniak M., Chu Y., Dhar S. and Jones D.** (2001) Juvenile hormone III-dependent conformational changes of the nuclear receptor ultraspiracle. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32:33-49
- Jung-Hoffmann L.** (1966) Die Determination von Königin und Arbeiterin der Honigbiene. *Z. Bienenforsch.*, 8:296-322
- Kageyama Y., Masuda S., Hirose S. and Hueda H.** (1997) Temporal regulation of the mid-prepupal gene *ftz-f1: DHR3* early late gene is one of the plural positive regulators. *Genes cells*, 2:559-569
- Kapitskaya M., Wang S., Cress D.E., Dhadialla T.S. and Raikhel A.S.** (1996) The mosquito ultraspiracle homolog, a partner of ecdysteroid receptor heterodimer: cloning and characterization of isoforms expressed during vitellogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 121:119-132
- Keightley M.C.** (1998) Steroid receptor isoforms: Exception or rule? *Mol. Cell. Endocrinol.*, 137:1-5
- Kerr W.E.** (1950) Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics*, 35:143-152
- Kerr W.E.** (1987) Sex determination in bees. 17: Systems of caste determination in the Apinae, Meliponinae and Bombinae and their phylogenetic implications. *Rev. Bras. Genét.*, 10:685-694
- Kerr W.E., Akahira Y. and Camargo C.A.** (1975) Sex determination in bees. 4: Genetic control of juvenile hormone production in *Melipona quadrifasciata* (Apidae). *Genetics*, 81:749-756

- Kethidi D.R., Perera S.C., Zheng S., Feng Q.L., Krell P., Retnakaran A. and Palli S.R.** (2004) Identification and characterization of a juvenile hormone (JH) response region in the JH esterase gene from spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *J. Biol. Chem.*, 279:19634-19642
- King W.J. and Green G.L.** (1984) Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature*, 307:745
- Klowden M.J.** (1987) Distention-mediated egg maturation in the mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.*, 33:83-87
- Koelle M.R., Talbot W.S., Seagraves W.A., Bender M.T., Cherbas P. and Hogness D.S.** (1991) The *Drosophila EcR* gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell*, 67:59-77
- Kostrouch Z., Kostrouchova M., Love W., Jannini E., Piatigorsky J. and Rall J.E.** (1998) Retinoic acid X receptor in the diploblast, *Tripedalia cystophora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:13442-13447
- Kozlova T., Pokholkova G.V., Tzertzinis G., Sutherland J.D., Zhimulev I.F. and Kafatos F.C.** (1998) *Drosophila* hormone receptor 38 functions in metamorphosis: a role in adult cuticle formation. *Genetics*, 149:1465-1475
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B. and Nei M.** (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*, 17:1244-1245
- Lambertucci A.H.** (2002) Influência da rainha sobre o desenvolvimento dos ovários de operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae), com ênfase na morte celular programada e na morfogênese do citoesqueleto. Dissertação de Mestrado, FFCLRP-USP, Brasil
- Lavorgna G., Karim F.D., Thummel C.S. and Wu C.** (1993) Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3004-3008

- Lee J.W., Lee Y.C., Na S.Y., Ju Jung D. and Lee S.K.** (2001) Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: Coactivators and corepressors. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58:289-297
- Lee M.S., Kliewer S.A., Provencal J., Wright P.E. and Evans R.M.** (1993) Structure of the retinoid X receptor α DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Science*, 260:1117-1121
- Lee S.K., Na S.Y., Kim H.J., Soh J., Choi H.S. and Lee J.W.** (1998) Identification of critical residues for heterodimerization within the ligand-binding domain of retinoid X receptor. *Mol. Endocrinol.*, 12:325-332
- Levine M. and Tjian R.** (2003) Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, 424:147-151
- Lewin B.** (1997) *Genes VI*. Oxford University Press, Oxford
- Li C., Kapitskaya M., Zhu J., Miura K., Segraves W. and Raikhel A.S.** (2000) Conserved molecular mechanism for the stage specificity of mosquito vitellogenic response to ecdysone. *Dev. Biol.*, 224:96-110
- Li T.R. and Bender M.** (2000) A conditional rescue system reveals essential functions for the *ecdysone receptor (EcR)* gene during molting and metamorphosis in *Drosophila*. *Development*, 127:2897-2905
- Liu M.A., Jones G.L., Stoffolano J.G. and Yin C.M.** (1988) Conditions for estimation of corpus allatum activity in the blowfly, *Phormia regina*, *in vitro*. *Physiol. Entomol.*, 13:69-79
- Lourenço A.P., Zufelato M.S., Bitondi M.M.G. and Simões Z.L.P.** (2004) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the prophenoloxidase from *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, submitted
- Mangelsdorf D.J., Borgmeyer U., Heyman R.A., Zhou J.Y., Ong E.S., Oro A.E., Kakizuka A. and Evans R.M.** (1992) Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-*cis* retinoic acid. *Genes Dev.*, 6:329-344

- Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P. and Evans R.** (1995) The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell*, 83:835-839
- Martín D., Wang S.F. and Raikhel A.S.** (2001) The vitellogenin gene of the mosquito *Aedes aegypti* is a direct target of ecdysteroid receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 173:75-86
- Matsuoka T. and Fujiwara H.** (2000) Expression of ecdysteroid-regulated genes is reduced specifically in the wing discs of the wing-deficient mutant (*ff*) of *Bombyx mori*. *Dev. Genes Evol.*, 210:120-128
- Michelette E.R. and 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, Massachusetts
- Minakuchi C., Nakagawa Y., Kiuchi M., Seino A., Tomita S. and Kamimura M.** (2003) Molecular cloning and expression analysis of Ultraspiracle (USP) from the rice stem borer *Chilo suppressalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33:41-49
- Misquitta L. and Paterson B.M.** (1999) Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): A role for *nautilus* in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:1451-1456
- Mount D.W.** (2001) *Bioinformatics. Sequence and genome analysis.* Cold Spring Harbor Lab. Press, New York
- Müller H.M., Dimopoulos G., Blass C. and Kafatos F.C.** (1999) A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes. *J. Biol. Chem.*, 274:11727-11735

- Neves C.A., Bhering L.L., Serrão J.E. and Gitirana L.B.** (2002) FMRFamide-like midgut endocrine cells during the metamorphosis in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). *Micron*, 33:453-460
- Nijhout H.F.** (1975) A threshold size for metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Biol. Bull.*, 149:214-225
- Nijhout H.F.** (1994) *Insect hormones*. Princeton University Press, New Jersey
- Novina C.D. and Sharp P.A.** (2004) The RNAi revolution. *Nature*, 430:161-164
- Oro A.E., McKeown M. and Evans R.M.** (1990) Relationship between the product of the *Drosophila ultraspiracle* locus and the vertebrate retinoid X receptor. *Nature*, 347:298-301
- Palli S.R., Osir E.O., Eng W., Boehm M.F., Edwards M., Kulcsar P., Ujvary I., Hiruma K., Prestwich G.D. and Riddiford L.M.** (1990) Juvenile hormone receptors in insect larval epidermis: identification by photoaffinity labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:796-800
- Palli S.R., Touhara K., Charles J.P., Bonning B.C., Atkinson J.K., Trowell S.C., Hiruma K., Goodman W.G., Kyriakides T., Prestwich G.D., et al.** (1994) A nuclear juvenile hormone-binding protein from larvae of *Manduca sexta*: a putative receptor for the metamorphic action of juvenile hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:6191-6195
- Perrimon N., Engstrom L. and Mahowald A.P.** (1985) Developmental genetics of the 2C-D region of the *Drosophila* X chromosome. *Genetics*, 111:23-41
- Pinto L.Z., Bitondi M.M.G. and Simões Z.L.P.** (2000) Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *J. Insect Physiol.*, 46:153-160
- Pinto L.Z., Hartfelder K., Gentile Bitondi M.M. and Paulino Simões Z.L.** (2002) Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J. Insect Physiol.*, 48:783-790

- Pinto L.Z., Laure M.A., Bitondi M.M., Hartfelder K. and Simoes Z.L.** (2003) Ventral nerve cord remodeling in a stingless bee (*Melipona quadrifasciata* anthidioides, Hymenoptera, Apidae) depends on ecdysteroid fluctuation and programmed cell death. *Int. J. Dev. Biol.*, 47:385-388
- Piulachs M.D., Guidugli K.R., Barchuk A.R., Cruz J., Simões Z.L.P. and Bellés X.** (2003) The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33:459-465
- Rachinsky A., Strambi C., Strambi A. and Hartfelder K.** (1990) Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honey bee larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 79:31-38
- Raes H. and Verbeke M.** (1994) Light and electron microscopical study of two types of endocrine cells in the midgut of the adult worker honeybee (*Apis mellifera*). *Tissue and Cell*, 26:223-230
- Rembold H.** (1987) Caste differentiation of the honeybee-Fourteen years of biochemical research at Martinsried. In Eder J and Rembold H (Eds). *Chemistry and Biology of social insects*. Verlag J. Peperny, Munchen, pp 3-13
- Rembold H.** (1976) The role of determinant in caste formation in the honey bee. In: Lüscher M. (Ed.) Phase and caste determination in insects. Pergamon, Oxford, pp 521-534
- Rembold H., Lackner B. and Geistbeck I.** (1974) The chemical basis of honeybee, *Apis mellifera*, caste formation. Partial purification of queen bee determinant from royal jelly. *J. Insect Physiol.*, 20:307-314
- Riddiford L.M.** (1994) Cellular and molecular actions of Juvenile Hormone I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect Physiol.*, 24:213-274
- Riddiford L.M., Cherbas P. and Truman J.W.** (2000) Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam. Horm.*, 60:1-73

- Robinow S., Talbot W.S., Hogness D.S. and Truman J.W.** (1993) Programmed cell death in the *Drosophila* CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform. *Development*, 119:1251-1259
- Robinson G.E. and Vargo E.L.** (1997) Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: Gonadotropin and behavioral pacemaker. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 35:559-583
- Rutz W., Gerig L., Wille H. and Luscher M.** (1976) The function of juvenile hormone in adult worker honeybees, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.*, 22:1485-1491
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T.** (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463
- Sasorith S., Billas I.L.M., Iwema T., Moras D. and Wurtz J.M.** (2002) Structure-based analysis of the ultraspiracle protein and docking studies of putative ligands. 11p. *J. Insect Science*, 2.25. insectscience.org/2.25
- Schmidt Capella I.C. and Hartfelder K.** (1998) Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J. Insect Physiol.*, 44:385-391
- Schmidt Capella I.C. and Hartfelder K.** (2002) Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honey bee ovary. *Cell Tissue Res.*, 307:265-272
- Shemshedini L., Lanoue M. and Wilson T.G.** (1990) Evidence for a juvenile hormone receptor involved in protein synthesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 265:1913-1918

- Silva E.J.B., Barchuk A.R. e Simões Z.L.P.** (2003) Expressão diferencial de *ultraspiracle* na espermateca de *Apis mellifera*. CD Resumos 49º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia
- Silva E.J.B., Bitondi M.M.G. e Simões Z.L.P.** (2002) Análise histológica da espermateca de rainhas e operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera-Apidae). Resumos 19º Congresso Brasileiro de Entomologia, Manaus, pp 33
- Solomons T.W.G.** (1996) Organic chemistry. 6th Edition John Wiley, NY
- Song Q., Alnemri E.S., Litwack G. and Gilbert L.I.** (1997) An immunophilin is a component of the insect ecdysone receptor (EcR) complex. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 27:973-982
- Streichert L.C., Pierce J.T., Nelson J.A. and Weeks J.C.** (1997) Steroid hormones act directly to trigger segment-specific programmed cell death of identified motoneurons *in vitro*. *Dev. Biol.*, 183:95-107
- Sullivan A.A. and Thummel C.S.** (2003) Temporal profiles of nuclear receptor gene expression reveal coordinate transcriptional responses during *Drosophila* development. *Mol. Endocrinol.*, 17:2125-2137
- Sun G., Zhu J. and Raikhel A.S.** (2004) The early gene E74B isoform is a transcriptional activator of the ecdysteroid regulatory hierarchy in mosquito vitellogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 218:95-105
- Sun X., Song Q. and Barrett B.** (2003) Effect of ecdysone agonists on vitellogenesis and the expression of EcR and USP in codling moth (*Cydia pomonella*). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 52:115-129
- Sutherland J.D., Kozlova T., Tzertzinis G. and Kafatos F.C.** (1995) *Drosophila* hormone receptor 38: a second partner for *Drosophila* USP suggests an unexpected role for nuclear receptors of the nerve growth factor-induced protein B type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7966-7970

- Swevers L., Cherbas L., Cherbas P. and Iatrou K.** (1996) *Bombyx* EcR (BmEcR) and *Bombyx* USP (BmCF1) combine to form a functional ecdysone receptor. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 26:217-221
- Tata J.R.** (2000) Autoinduction of nuclear hormone receptors during metamorphosis and its significance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30:645-651
- Thummel C.S.** (1996) Flies on steroids – *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *TIG*, 8:306-310
- Thummel C.S.** (2001a) Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. *Dev. Cell*, 1:453-465
- Thummel C.S.** (2001b) Steroid-triggered death by autophagy. *BioEssays*, 23:677-682
- Tsai M.J. and O'Malley B.W.** (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:451-486
- Tzertzinis G., Malecki A. and Kafatos F.C.** (1994) BmCF1, a *Bombix mori* RXR-type receptor related to the *Drosophila ultraspiracle*. *J. Mol. Biol.*, 238:479-486
- Velthuis H.H.W. and Velthuis-Kluppel F.M.** (1975) Caste differences in a stingless bee, *Melipona quadrifasciata* Lep., influenced by juvenile hormone application. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet., C*, 78:81-94
- Vogtli M., Imhof M.O., Brown N.E., Rauch P., Spindler-Barth M., Lezzi M. and Henrich V.C.** (1999) Functional characterization of two Ultraspiracle forms (CtUSP-1 and CtUSP-2) from *Chironomus tentans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29:931-942
- Wang S.F., Miura K., Miksicek R.J., Segraves W.A. and Raikhel A.S.** (1998) DNA binding and transactivation characteristics of the mosquito ecdysone receptor-Ultraspiracle complex. *J. Biol. Chem.*, 273:27531-27540

- White K.P., Hurban P., Watanabe T. and Hogness D.S.** (1997) Coordination of *Drosophila* metamorphosis by two ecdysone-induced nuclear receptors. *Science*, 276:114-117
- Wilson E.O.** (1971) *The insect societies*. Belknap Press/Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Wirtz P. and Beetsma J.** (1972) Induction of caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera* L.) by juvenile hormone. *Ent. Exp. Appl.*, 15:517-520
- Wyatt G.R. and Davey K.G.** (1996) Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Adv. Insect Physiol.*, 26:1-155
- Xu Y., Fang F., Chu Y., Jones D. and Jones G.** (2002) Activation of transcription through the ligand-binding pocket of the orphan nuclear receptor ultraspiracle. *Eur. J. Biochem.*, 269:6026-6036
- Yao T.P., Forman B.M., Jiang Z., Cherbas L., Chen J.D., McKeown M., Cherbas P. and Evans R.M.** (1993) Functional ecdysone receptor is the product of *EcR* and *Ultraspiracle* genes. *Nature*, 366:476-479
- Yao T.P., Segraves W.A., Oro A.E., McKeown M. and Evans R.M.** (1992) *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, 71:63-72
- Yin C.M., Zou B.X., Li M.F. and Stoffolano J.G.** (1994) Discovery of a midgut peptide hormone which activates the endocrine cascade leading to oögenesis in *Phormia regina* (Meigen). *J. Insect Physiol.*, 40:283-292
- Zander E., Löschel F. and Meyer K.** (1916) Die Ausbildung des Geschlechts bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Z. Angew. Entomol.*, 3:1-74
- Zee M.C. and Weeks J.C.** (2001) Developmental change in the steroid hormone signal for cell-autonomous, segment-specific programmed cell death of a motoneuron. *Dev. Biol.*, 235:45-61

- Zhou X. and Riddiford L.M.** (2002) Broad specifies pupal development and mediates the “status quo” action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. *Development*, 129:2259-2269
- Zhu J., Miura K., Chen L. and Raikhel A.S.** (2003) Cyclicality of mosquito vitellogenic ecdysteroid-mediated signaling is modulated by alternative dimerization of the RXR homologue Ultraspiracle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:544-549
- Zou B.X., Yin C.M., Stoffolano J.G. and Tobe S.S.** (1989) Juvenile hormone biosynthesis and release during oocyte development in *Phormia regina* Meigen. *Physiol. Entomol.*, 14:233-239
- Zufelato M.S., Bitondi M.M.G., Simões Z.L.P. and 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 Dev.*, 29:111-119

Apis mellifera ultraspiracle: cDNA sequence and rapid up-regulation by juvenile hormone

A. R. Barchuk*, R. Maleszka† and Z. L. P. Simões‡

*Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil; †Visual Sciences, Research School of Biological Sciences, Australian National University, Canberra, Australia; and ‡Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil

Abstract

Two hormones, 20-hydroxyecdysone (20E) and juvenile hormone (JH) are key regulators of insect development including the differentiation of the alternative caste phenotypes of social insects. In addition, JH plays a different role in adult honey bees, acting as a 'behavioural pacemaker'. The functional receptor for 20E is a heterodimer consisting of the ecdysone receptor and ultraspiracle (USP) whereas the identity of the JH receptor remains unknown. We have cloned and sequenced a cDNA encoding *Apis mellifera* ultraspiracle (AMUSP) and examined its responses to JH. A rapid, but transient up-regulation of the AMUSP messenger is observed in the fat bodies of both queens and workers. *AMusp* appears to be a single copy gene that produces two transcripts (~4 and ~5 kb) that are differentially expressed in the animal's body. The predicted AMUSP protein shows greater sequence similarity to its orthologues from the vertebrate–crab–tick–locust group than to the dipteran–lepidopteran group. These characteristics and the rapid up-regulation by JH suggest that some of the USP functions in the honey bee may depend on ligand binding.

Keywords: honey bee, USP, JH, ecdysone, juvenile hormone receptor, fat body, brain.

Received 21 January 2004; accepted following revision 24 May 2004. Correspondence: Angel Roberto Barchuk, Depto. Genética, Bloco A, FMRP-USP, Avenida Bandeirantes 3900, 14049–900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel.: +55 16 6023153; fax: +55 16 6336482; e-mail: barchuk@rge.fmrp.usp.br

Introduction

Juvenile hormone (JH) and ecdysteroids, especially 20-hydroxyecdysone (20E), ultimately control many aspects of insect development. 20E triggers the key regulatory cascades controlling the synchronized changes in developmental pathways during moulting and metamorphosis (White *et al.*, 1997; Thummel, 2001). The actions of 20E are mediated by ligand-dependent transcription factors that belong to the steroid hormone receptor super-family (Evans, 1988; Henrich & Brown, 1995; Riddiford *et al.*, 2000). Members of this protein family share a common modular structure that includes a highly conserved DNA-binding domain and a more variable C-terminal domain encoding ligand-binding and dimerization functions (Yao *et al.*, 1992). The receptor for 20E has been well characterized in *Drosophila* and is a heterodimer consisting of the ecdysone receptor (EcR) and ultraspiracle (USP) (Oro *et al.*, 1990; Koelle *et al.*, 1991; Yao *et al.*, 1992, 1993). In contrast to 20E, the receptor for JH has not yet been identified in spite of efforts by numerous labs, including a somewhat controversial report that USP is at least one of the JH receptors (Jones & Sharp, 1997). Consequently, USP has been considered as an auxiliary component to EcR in the receptor complex. In recent years, however, USP has been shown to exhibit EcR-independent transcriptional regulation activity, which may depend on ligand binding (Jones & Sharp, 1997; Jones & Jones, 2000; Jones *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002).

Based on its role in development JH is known as the 'status quo' hormone because, as long as its levels are high, dramatic changes in morphology are prevented. In holometabolous insects JH falls at the time of larval–pupal and pupal–adult moults, allowing dramatic reorganization of the body. In addition to its 'status quo' role in development JH plays a somewhat different role in adult insects, acting as a gondotropin in some species and as a 'behavioural pacemaker' in others (Robinson & Vargo, 1997). An example of the latter role in the honey bee is that JH levels, which rise throughout adulthood, appear to determine when an adult worker bee will switch from working exclusively within the hive to becoming a forager.

In the honey bee, caste-specific profiles of the JH titres during postembryonic development are responsible for the

activation of different developmental patterns leading to the differentiation of two distinct female phenotypes, the highly fertile queens and the quasi-sterile workers (see Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990; Hartfelder & Engels, 1998). Low JH titre during the last stages of larval development has been shown to trigger programmed cell death in the ovaries of worker larvae to the point that only a few ovarioles remain to form the functional reproductive system of these females (Schmidt Capella & Hartfelder, 1998, 2002). In addition, the onset of vitellogenin (*vg*) gene expression during pupal development in *Apis mellifera* occurs in the context of an increasing JH titre and decreasing levels of ecdysteroids (Barchuk *et al.*, 2002; Piulachs *et al.*, 2003).

In an attempt to shed more light on the molecular mode of action of JH and its possible link with USP we have cloned and sequenced two cDNAs encoding the honey bee USP and carried out experiments to test whether the transcription of this gene is modulated by varied titres of juvenile hormone. Our findings provide evidence that the expression of USP in the honey bee is sensitive to JH treatment, in particular in the fat bodies of both queens and workers. Furthermore, the comparative sequence analysis confirms the notion that the USP molecule underwent an important structural change in the line leading to the higher insects.

Results

Comparative analyses of *Apis mellifera* ultraspiracle (AMusp)

We have cloned and sequenced two cDNAs isolated from worker brains and queen fat bodies, respectively. Both sequences have been deposited in GENBANK under the accession numbers AF263459 (brain) and AY273778 (fat body). The cDNA sequence isolated from the brain is 3754 bp long, which agrees with the estimates obtained by Northern blot experiments (~4 kb). The sequence contains a 427 amino acid ORF (Figs 1 and 2). Poly(A)⁺ RNA hybridization with a 5'-end probe of *AMusp* cDNA shows an additional, larger band (~5 kb) in samples obtained from worker heads (Fig. 2). This indicates the production of two *AMusp* transcripts in this organ. As different transcripts can result either from a single-copy gene (differential splicing or alternative transcription initiation sites) or from a multicopy gene, we performed a Southern blot to estimate the number of *usp* copies in the honeybee genome. The hybridization pattern with a probe spanning the weakly conserved E/F domain and part of the 3' untranslated region (Fig. 1) shows a consistent and unique band (Fig. 3). This suggests that *usp* is present in a single copy in this species, and that the two bands observed in Northern blots correspond to alternatively spliced transcripts.

Both cDNAs (from workers and queens) encode identical polypeptides that show high level of sequence similarity with

USPs in other animal species. Figure 1 illustrates the modular organization of proteins belonging to this nuclear receptor superfamily. We conclude that both cDNAs correspond to *ultraspiracle*, an orthologue of the vertebrate RXR (Evans, 1988; Henrich & Brown, 1995; Riddiford *et al.*, 2000).

The predicted translation product of the honey bee *usp* gene is a 427 amino acid polypeptide with an estimated molecular mass of 48 kDa, and a pI value of 8.80 (calculated by using the Compute pI/Mw tool, http://www.expasy.org/tools/pi_tools.html). This value is similar to that estimated for USP from *Aedes aegypti* (51 and 54 kDa, Kapitskaya *et al.*, 1996), *Lucilia cuprina* (51 kDa; Hannan & Hill, 2001), *Chilo suppressalis* (47 kDa, Minakuchi *et al.*, 2003), and other animals studied so far.

The N-terminal A/B domain of *Apis mellifera* ultraspiracle encodes 109 amino acids that are relatively poorly conserved in other species (Fig. 1). The amino acids 46–58 near the N-terminus of the honey bee USP represent a motif (SPLDMKPDTASLI) that is also found in USPs from *Locusta migratoria* and *Tenebrio molitor*, both species showing close phylogenetic clustering with the honey bee.

The most conserved region C consisting of sixty-six amino acids encoding the DNA-binding domain (DBD) is localized downstream of the A/B domain (Fig. 1B). It contains two zinc fingers (C-4 type) and the consensus sequences that confer DNA binding specificity (EGCKG, P-box) and dimerization capacity (REEKS, D-box).

A short hinge domain, designated D, occupies a twenty-three amino acid long section of the middle part of AMUSP (Fig. 1). This region has a consensus sequence of ten amino acids (REAVQEERQR) that is present in all species considered in our study, except for *Schistosoma mansoni*. The rest of the D domain of the honey bee USP has a greater similarity to that of *Locusta*, *Tenebrio* and vertebrates than to the other holometabolans. *Apis* and *Locusta* share another six identical amino acids immediately after the aforementioned consensus sequence.

The E/F domain, which lies at the C-terminus of the honey bee USP spans 229 amino acids and is the largest domain of this protein commonly referred to as ligand-binding domain (LBD; Fig. 1). Multiple alignment analysis of this domain shows that in spite of its poor conservation, a formation of two clusters can be observed (Figs 1B and 4). One cluster is formed by the sequences from *Apis*, *Locusta*, *Tenebrio* (ApLoTe), *Celuca* and vertebrates, and the other by the USP sequences of all other holometabolans considered here (dipterans and lepidopterans). Near the C-terminus of the honey bee USP is the consensus sequence **FLMEMLE** (Fig. 1A, italicized and bold), called activation function 2 (AF-2; Danielian *et al.* 1992; Durand *et al.*, 1994; Bourguet *et al.*, 1995). In AMUSP the first methionine of this motif is replaced with valine. Again, this sequence is more conserved in ApLoTe, *Celuca* and vertebrates, than in the rest of insects.

A)

```

1 - ATGATGAGAAGGAGAAACCGATGATGTCGGTGACCGCCATCATCCAAGGGACTCAGGCC - 60
- M M K K E K P M M S V T A I I Q G T Q A
61 - CAACATGGTCCCGTGGCAACACTTGGCTAAGTCTGGACAACAGCAACATGTCATGTCC - 120
- Q H N S R G N T W L S L D N S N M S M S
121 - TCAGTGGGCCCGCAAAGTCCACTGGACATGAAGCCGACACAGCAAGCCTCATCAACCCC - 180
- S V G P Q S P L D M K P D T A S L I N P
181 - GGAAACTTCAGTCTTCCGGCCCAACAGCCCGGATCCTTCACCCGTGGTTGTGCACAGC - 240
- G N F S P S G P N S P G S F T A G C H S
241 - AACCTTCTAAGTACGTGCGCCGAGTGGCCAGAACAAAGCAGTCCGACCCCTACCCGCGAAC - 300
- N L L S T S P S G Q N K A V A P Y P P N
301 - CACCTCTCTCCGGAAGTAAGCACCTCTGCTCGATTGCGGTGACCGTCCAGTGGCAAG - 360
- H P L S G S K H L C S I C G D R A S G K
361 - CATTATGGTGTCTATAGTTCGAGGGTTGCAAGGATTTTCAAGAGGACCGTGGCGAAG - 420
- H Y G V Y S C E G C K G F F K R T V R R
421 - GACCTGTCTGACCGTGTCCGGAAGAGAAATCCTGCATCATGACAAACAGAGAGAAAT - 480
- D L S Y A C R E E K S C I I D K R Q R N
481 - CGATGTCAGTATTCAGATACCAGAAATGCTGGCGATGGGAATGAGAGAGAGCGGTC - 540
- R C Q Y C R Y Q K C L A M G M K R E A V
541 - CAAGAGAACGTCACCGTACCAGGAAAGGGATCAGAGCGAGGTTGAGAGCCTAGTAGT - 600
- Q E E R Q R T K E R D Q S E V E S T S S
601 - CTGCATTCGGACATGCCGATCGAGCCTATCCTGGAGGCGGAGAGAGAGTCCGAATGTAAG - 660
- L H S D M P I E R I L E A E K R V E C K
661 - ATGGAGCAACAGGAAATACGAGAATGCAAGTTCGCACATTTGCAACGCCACGAAACAA - 720
- M E Q Q G N Y E N A V S H I C N A T N K
721 - CAGCTGTTCAGCTGGTAGCATGGCGAAACACATCCCGCATTTACCTCGTGGCACTG - 780
- Q L F Q L V A W A K H I P H F T S L P L
781 - GAGGATCAGTACTTCTGCTCAGGGCCGGTGGAAACGAGTTGGATGATAGCCTCTTCC - 840
- E D Q V L L L R A G W N E L L I A S F S
841 - CACCGTTCCATCGAGTGAAGGACGGTATCCTGCTGCGAGCGGGATCACCCTGCATCGG - 900
- H R S I D V K D G I V L A T G I T V H R
901 - AACTCGGCGCAGCAGGCCGGCGTGGCCAGCATATTCGACCGTTCCTCTCCGAGCTTGTG - 960
- N S A Q Q A G V G T I F D R V L S E L V
961 - TCGAAAATCGTGAATGAAGATGGACAGGACAGAGCTTGGCTGTCTCATGCTATAATA - 1020
- S K M R E M K M D R T E L G C L R S I I
1021 - CTCTTCAATCCCGAGGTTCCGAGGACTGAAATCCATCCAGGAAGTGCACCTGCTCCGAG - 1080
- L F N P E V R G L K S I Q E V T L L R E
1081 - AAGATCTACGGCCCGCTGGAGGTTATTGCCGCTAGCTTGGCCGACGACAGCAGTGGAGA - 1140
- K I Y G A L E G Y C R V A W P D D A G R
1141 - TTCGGAAATTAATCTTACGCGCTCCCGCCATCCGCTCGATCGGATTAAGGTCCTCGAG - 1200
- F A K L L L R L P A I R S I G L K C L E
1201 - TACCTGTCTTCTCAAATGATCGGTGACGTACCGATCGACGATTTCTCGTGGAGATG - 1260
- Y L F F F K M I G D V P I D D F L V E M
1261 - TTAGAATCGGATCAGATCCT - 1281
- L E S R S D P
    
```

Figure 1. Organization of *Apis mellifera* USP protein. (A) Nucleotide and deduced amino acid sequences of the honey bee *usp* cDNA. The predicted polypeptide is shown by a one-letter code below the respective nucleotide sequence. Amino acids belonging to the conserved DBD (C domain) are shaded and those belonging to D domain are underlined. The first and the last residues belong to domains A/B and E/F, respectively. The numbers on both sides correspond to the cDNA sequence. Conserved amino acid sequences are bold and italicized. (B) Schematic diagram of AMUSP structure indicating the number of amino acids in each domain (top) and the percentage of identical residues in various LBD sequences relatively to LBD of AMUSP (bottom). The cDNA sequences (from the worker's brain and queen's fat body) are deposited in GENBANK under the accession numbers AF263459 and AY273778, respectively. Lm = AF136372; Tm = AJ251542; Cp = AF032983; Hs = NM_002957; Mm = XM_123763; Aa = AF305213; Cf = AF016368; Ms = U44837; Bm = U06073; Dm = X53417; Lc = AY007213; Ct = AF045891; Sm = AF158102.

B)

	A/B	C	D	E/F
N	109	66	23	229

	DBD	LBD
<i>Locusta migratoria</i>	97	78
<i>Tenebrio molitor</i>	97	69
<i>Celuca pugilator</i>	94	65
<i>Homo sapiens</i> (alpha)	88	69
<i>Mus musculus</i> (alpha)	88	68
<i>Aedes aegypti</i> (isoform-A)	94	50
<i>Choristoneura fumiferana</i>	95	48
<i>Manduca sexta</i>	92	41
<i>Bombyx mori</i>	94	46
<i>Drosophila melanogaster</i>	91	52
<i>Lucilia cuprina</i>	83	52
<i>Chironomus tentans</i>	91	43
<i>Schistosoma mansoni</i>	82	22

Molecular phylogeny of AMUSP

To run a molecular phylogeny analysis using Mega2.1 we included *Schistosoma mansoni* USP as an out-group. The trees were obtained using UPGMA, and their significance was tested by 100 bootstrap repetitions.

The results of the phylogenetic analyses are somewhat variable depending on the region of the honey bee

USP considered (we have utilized complete sequences deposited in the GENBANK and *alpha* isoforms of RXRs). When using the highly conserved DBD alone, the retrieved dendrograms generally agree with the current phylogeny, showing that insect and vertebrate lineages split with high bootstrap values (data not shown). In contrast, invertebrate branching could not be resolved, most likely due to the insufficient length of the analysed sequences. The DBDs

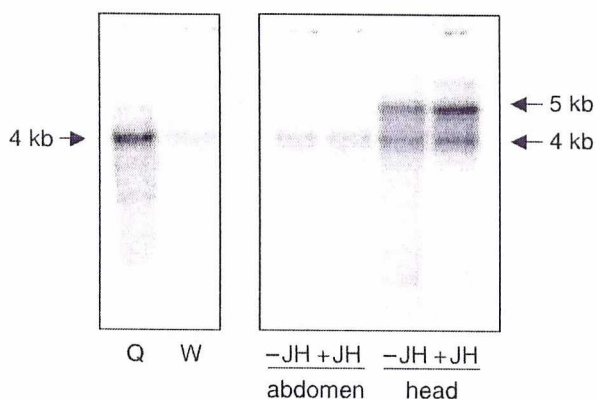


Figure 2. Northern blot showing the expression of *AMusp* in the abdomens of queens (Q) and worker honey bees (W) (left panel), and in the abdomens and heads of 24 h-old workers (right panel). JH+ indicates treatment with juvenile hormone. Eleven μ g of polyadenylated RNA was used per lane. The probe was a radioactively labelled 0.3 kb *Bam*HI fragment of the 5' end of the *AMusp* cDNA (AF263459).

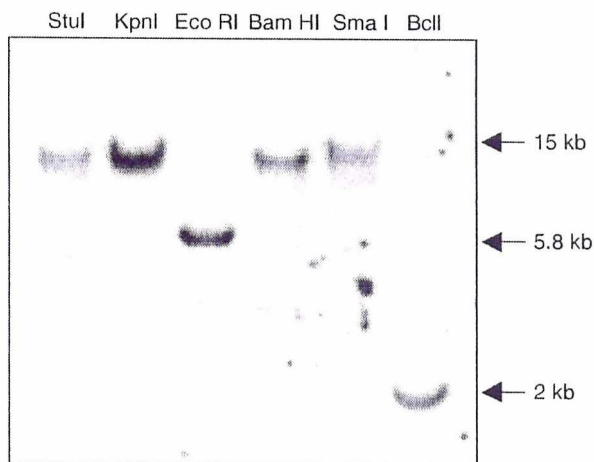


Figure 3. *Apis mellifera* genomic Southern blot probed with a fluorescently labelled 840 bp 3' fragment of the honey bee *usp* cDNA. Thirty μ g of genomic DNA were digested with the indicated endonucleases.

in USPs from the honey bee, *Locusta* and *Tenebrio* are almost 97% identical, or about 90% identical when compared to the rest of the insects and the vertebrates. Even with *Schistosoma*, the honey bee USP shares more than 80% identity (see Fig. 1B).

However, when we compared the LBD domains, the retrieved trees showed some surprising morphologies, with ApLoTe, *Celuca* and vertebrates splitting (with 100% bootstrap value) from the rest of the insects (Fig. 4). The highest similarities were found between the honey bee USP and that from *Locusta* (78%), followed by the *Tenebrio* (69%), *Homo sapiens* (68.5%) and *Mus musculus* (68%) orthologues. Phylogenetic trees obtained by using the entire honey bee USP sequence are similar to those

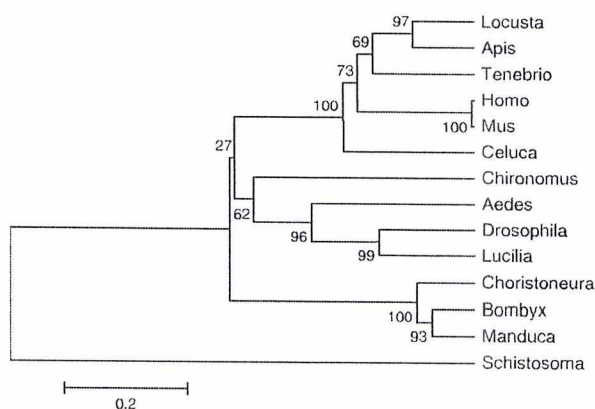


Figure 4. A phylogenetic tree illustrating the evolutionary relationships among USPs/RXR. The dendrogram is based on the LBD. The accession numbers of all sequences are in Fig. 1B.

obtained with the LBDs alone (as the variability of the LBDs outweighs the conservation of DBDs).

Usp is rapidly, but transiently up-regulated by JH in the fat bodies

Usp expression during the critical phase of the onset of Vg synthesis during postembryonic development and during the first days after emergence of queens and workers of *Apis mellifera* (A. R. Barchuk and Z. L. P. Simões, unpublished data) suggested that *usp* might be induced by JH. When binding JH (present at basal levels), USP might induce its own expression, thus amplifying the initial hormonal signal. To test the response of *usp* to artificially raised JH titres, we carried out hormone application experiments *in vivo* and tested *usp* expression by RT-PCR. We applied 10 μ g of JH-III to Pbm-Pbd (brown-eyed pupae with intermediary pigmented cuticle and dark pigmented cuticle, respectively) queen and worker pupae and determined *usp* expression levels in the fat body. The utilized stages are characterized by having relatively low ecdysteroid and increasing JH levels in the haemolymph (Rembold, 1987; Pinto *et al.*, 2002). It is in this context that the initiation of *vg* expression occurs during the pupal development of these insects (Barchuk *et al.*, 2002; Piulachs *et al.*, 2003). The results are summarized in Fig. 5. Both queens and workers show a significant increase in *usp* expression shortly (1.5–4.5 h) after JH treatment.

To test the duration of *usp* response we carried out a similar experiment with samples being taken at 2.5 h, 12 h and 24 h after hormone treatment (independent treatments, with all samples taken in Pbd, 10 h before adult emergence). Although *usp* response to JH appears to be very rapid the increased level of its transcription is relatively transient. Our results show that *AMusp* begins to be down-regulated about 5 h after hormonal treatment, as we could not detect differences in *AMusp* expression between

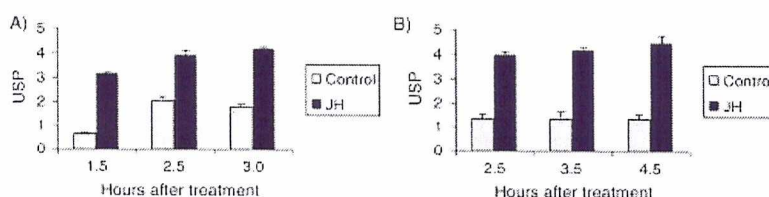


Figure 5. Rapid up-regulation of *AMusp* by juvenile hormone. Queens (A) and workers (B) of *Apis mellifera* in Pbm-Pbd developmental stages received a topical application of 10 µg juvenile hormone III and the expression of *AMusp* was tested in their fat bodies by the RT-PCR method. The ordinate represents densitometric units and each value is an average of three separate experiments. SEMs are indicated by vertical bars. All control/treated sets represent statistically significant differences ($P < 0.05$, Mann-Whitney test).

3

control and treated animals 12 h after JH application (data not shown). Applications of small quantities of JH on newly emerged workers (which were sampled 24 h after treatment) either did not or only slightly affected *usp* expression, and if so, this was only observed in the head of worker bees and not in the other tissues examined in this study (Fig. 2).

Discussion

Structural organization and functional molecular phylogeny of honey bee USP

The high level of sequence identity of the honey bee USP with its orthologues from other animal species and the protein domain organization determined by *in silico* analyses indicate the honey bee USP as a member of the nuclear receptor superfamily, especially as an orthologue of vertebrate RXR (Evans, 1988; Henrich & Brown, 1995; Riddiford *et al.*, 2000).

Like in some other species, a single *usp* gene in the bee gives rise to more than one transcript. The two hybridizing bands observed in samples from worker heads and the single one detected in RNA extracts from the abdomens suggest a differential transcription pattern in these organs resulting most likely from alternative splicing. In *Aedes aegypti* (Kapitskaya *et al.* 1996), *Manduca sexta* (Jindra *et al.*, 1997; Asahina *et al.*, 1997) and *Chironomus tentans* (Vogtli *et al.*, 1999) isoforms differing in the N-terminal A/B region are produced by alternative splicing. By contrast, only one protein is encoded by multiple transcripts with diverse UTRs in *Bombyx mori* (Tzertzinis *et al.*, 1994). Another possibility is that one of these two bands represents cross-hybridization to another member of the nuclear receptor superfamily.

Unlike the vertebrate homologue, RXR, the insect USP ligand has not yet been identified, so it is still commonly considered to be an orphan nuclear receptor. Crystallographic studies and molecular modelling of USP/RXR have suggested that the LBDs of dipteran and lepidopteran USP are not able to bind ligands because of some conserved motifs (especially FLRVGP) which may result in an antagonist conformation of the ligand-binding-pocket, thereby preventing the binding of coactivators (Billas *et al.*, 2001;

Clayton *et al.*, 2001). Nevertheless, the honey bee USP has some characteristics that may provide ligand binding activity. Firstly, its sequence is very similar to that of RXR from vertebrates, which binds 9-*cis* retinoic acid (Mangelsdorf *et al.*, 1992; Chambon, 1996), a molecule that has structural similarity with JH, a major arthropod hormone. This structural resemblance is reflected in the topology of the trees retrieved from the analyses of either the LBD or the entire protein sequence of the honey bee USP. In both cases, the honey bee USP clusters together with USPs in *Locusta*, *Tenebrio*, *Celaca* and the RXRs of *Homo sapiens* and *Mus musculus*. These species clearly form a distinct group despite the wide phylogenetic gap between the arthropods and the vertebrates (Hayward *et al.*, 1999). In addition, the honey bee USP contains nineteen out of the twenty-two amino acids that in the human RXR α confer 9-*cis* retinoic acid binding ability (Bourguet *et al.*, 1995; Sasorith *et al.*, 2002), with the three remaining residues showing to be conservative substitutions. Finally, the honey bee USP has the consensus sequence FLMEMLE, the so called activation function 2 (AF-2, Danielian *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1994; Bourguet *et al.*, 1995). In ligand-binding dependent nuclear receptors, this sequence is the union site of coregulator molecules having LxxLL domain (Danielian *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1994; in Glass & Rosenfeld, 2000).

A ligand binding activity for USP, especially for JH, has been proposed for *Drosophila melanogaster* and *Heliothis virescens*. In these cases, USP supposedly homodimerizes, and by changing its conformation gains transcriptional activation functions (Jones & Sharp, 1997; Jones & Jones, 2000; Jones *et al.*, 2001; Sasorith *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002). Thus, our results shed some doubts on the meaning of the observed structural similarities in the USP LBD within ApLoTe and in relation to the orthologous vertebrate sequences. If the ApLoTe group also possesses USP as a JH receptor, what is the meaning of the molecular resemblance? A plausible explanation would be the existence of more than one ligand, with different affinities. In this model USP could act as a multifunctional, context-dependent protein depending on the type of attached ligand. A recent study on the human RXR α LBD revealed that it specifically

binds two different and chemically unrelated agonist compounds, docosa hexaenoic acid, present in mammalian cells and recently identified as a potential endogenous RXR ligand in the mouse brain, and the synthetic ligand BMS 649. In both cases, the RXR-LBD formed homodimers and exhibited the active conformation previously observed with 9-*cis*-RA (Egea *et al.*, 2002). Moreover, crystallographic studies carried out with USP from *Drosophila melanogaster* and *Heliothis virescens* suggest the possibility that this transcription factor could bind lipid molecules like diacylglycerol and various phospholipids (Billas *et al.*, 2001; Clayton *et al.*, 2001), in addition to the binding of JH (Jones & Sharp, 1997; Jones & Jones, 2000; Jones *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002). Thus, the ApLoTe group could not only share the same ligand with the rest of arthropods (e.g. JH), but could also have more than one ligand, each with its own affinity level. These ligands could, for instance, be metabolites of JH-III, the only confirmed JH in *Apis mellifera* (Hagenguth & Rembold, 1978). There are several of these metabolites and precursors, such as farnesol, farnesoic acid, methyl farnesoate and juvenile hormone acid. The latter compound (and not JH) has been found to have a hormonal function in competence induction for *vg* transcription during postembryonic development of *Manduca sexta* (Ismail *et al.*, 1998).

In addition, a new form of USP has been recently discovered in *Locusta migratoria*. It is characterized by an increased number of amino acids in the region of helices 2 and 3 of LBD (Hayward *et al.*, 2003). This 'insertion' brings it closer to *Apis mellifera* USP and the human RXR. According to these authors, this characteristic makes the *Locusta migratoria* large USP (unlike the minor one) a good candidate for having ligand-dependent activity.

The existence of ligand(s) for the RXRs and for USPs in some dipterans and for the ApLoTe group would suggest the possibility of an independent evolutionary appearance of the USP ligand binding among different animal groups (suggested by Escriva *et al.*, 2000). Nevertheless, the discovery that RXR from *Tripedalia cystophora* (a cnidarian) binds 9-*cis* RA (Kostrouch *et al.*, 1998) suggests an early existence of ligand utilization and the possibility of its loss in some groups. Another possibility is that we are simply ignorant of the presence of ligands in the remaining groups.

Usp expression in *Apis mellifera* is stimulated by JH

In addition to the structural organization of the honey bee USP, other experimental evidence suggests that the USP in this species may bind JH (or its metabolite), and that its expression may be modulated by JH titres. First, we observed a direct relationship between the JH titre and *Vg* levels in the haemolymph of *Apis mellifera* females during the final hours of pupal development and during the first days of adult life (see Rembold, 1987; Barchuk *et al.*, 2002). *Usp* expression closely follows the JH titre profiles (ARB &

ZLPS, unpublished). Furthermore, *usp* levels increase following a topical application of JH in female pupae. These results and the structural characteristics discussed above suggest that USP is the primary JH binding protein and imply the *usp* gene is an early member in the cascade of gene activation promoted by JH. A similar result was obtained by Chung *et al.* (1998) who applied retinoic acid (RA) to the crab *Celuca pugilator* (whose RXR was shown to be similar to the ApLoTe group of orthologues). They found that *CpRXR* expression was significantly higher in animals immersed in seawater with all-*trans*-RA when compared to control animals. Furthermore, all-*trans*-RA is able to induce the expression of its receptors RXRs and RARs in mouse embryos and several human cell lines (Jiang *et al.*, 1994; Copper *et al.*, 1997; Gianini *et al.*, 1997).

Experimental procedures

Bees and JH treatments

Pupae and adults were collected from *Apis mellifera* colonies (Africanized hybrids) maintained at the Experimental Apiary of the University of São Paulo at Ribeirão Preto, Brazil, and from *Apis mellifera ligustica* colonies at the Australian National University in Canberra. Pupae were obtained as in Barchuk *et al.* (2002). The developmental stages were classified according to the criteria proposed by Michelette & Soares (1993).

To test *usp* response to exogenous JH, pupae received a topical application of 10 µg juvenile hormone III (Fluka; diluted in acetone to a stock solution of 2.5 µg/µl). The amount of applied hormones was based on our previous experiments in which we examined the induction of *vg* expression by JH during pupal development (Barchuk *et al.*, 2002). Emerging adult insects were treated with JH (typically within one hour after emergence) by applying 1 µl JH (1.25% JH-III from Sigma in dimethyl formamide, Fluka) on the thorax. The bees were then transferred to a small cage containing a tube of honey and incubated at 32 °C until the desired age. Pupae were maintained in an incubator at 34 °C and 80% relative humidity for 1.5–48 h. At least three groups consisting of 3–7 individuals each (for a total of 9–21 bees) were used in each experiment. After incubation, the extracted fat bodies (where *Vg* synthesis takes place) were suspended in TRIzol reagent (Invitrogen) and frozen at –80 °C until RNA extraction.

RNA and DNA extraction

Total RNA was extracted from abdomen, head and fat bodies using a TRIzol (Invitrogen) protocol and incubated in the presence of DNase I (Promega) for 30 min at 37 °C to eliminate contaminating DNA. For DNA extraction, unpigmented pupae were frozen in liquid nitrogen, ground to a fine powder and processed according to Sambrook *et al.* (1989).

Library screening and sequencing of *Apis mellifera* ultraspiracle cDNA

Approximately 5×10^5 plaques of *A. mellifera* worker's brain library (in lambda ZapII, a gift from G. Robinson, University of Illinois, Urbana) were screened with a DNA probe obtained via RT-PCR using degenerate primers representing conserved peptides in

USP proteins from other species. The longest cDNA was selected for sequencing (DNA sequencing was performed by the Australian Genome Research Facility in Brisbane using double-stranded plasmid DNA templates). The cloning of queen's USP cDNA was performed using primers based on the sequence of worker's USP cDNA. Database searches were carried out at the National Center for Biotechnology Information using the BLAST server with orthologues aligned by ClustalW. For the molecular phylogeny analysis of USP, the ClustalW results were transformed to Mega 2.1 format (Kumar *et al.*, 2001). Trees construction was performed using the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) procedure, and trees branch significance was evaluated by 100 bootstrap repetitions.

Northern blot analysis, semiquantitative assay by RT-PCR and Southern blotting

Poly A⁺ RNA was obtained from the abdomen- and head-total RNA samples using an Oligotex (QIAGEN) protocol. Electrophoresis, blotting and hybridization (a 5'-cDNA fragment of honey bee USP was utilized as probe) were carried out as in Kucharski & Maleszka (2002).

4 First-strand cDNA was synthesized as in Nascimento *et al.*, 2004. Forward USP-1 (5'-AGACTGCCAAGATGATGAAG-3') and reverse USP-2 (5'-TCTCTCTTCATTCCCATCGC-3') primers were utilized in PCR reactions for *usp* expression quantification. The thermal cycling program was 2 min at 94 °C followed by 26–32 cycles (depending on developmental stage the samples were obtained from) of 30 s at 94 °C, 40 s at 58 °C and 40 s at 72 °C. For normalization we performed RT-PCR on an *A. mellifera* β -actin or 28S rRNA genes (GENBANK accession numbers AB023025 and AJ302936). Act forward (5'-TGCCAACTGTCTTTCTG-3') and Act reverse (5'-AGAATTGACCCACCAATCCA-3'), primers were used for β -actin amplification and the respective annealing temperature was 62 °C. The primers used for 28S amplification were Ribo-1 forward (5'-TGCTACTACCACCAAGATCT-3') and Ribo-2 reverse (5'-ACGACCTCACCTATTCTCA-3'), with the respective annealing temperature of 54 °C. The amplification products, which included a 550 bp sequence for AMUSP, 154 bp sequence for β -actin and 473 bp sequence for 28S rDNA, were run in 1% agarose gels and transferred to membranes (Biodyne B Membrane, Invitrogen) by capillary blotting in the presence of 10 × SSC for 16 h. The membranes were subsequently processed according to Amersham (Gene Images™ Random Prime Labeling Module, RPN 3540–1; Gene Images CDP-Star Detection Module, RPN 3510–1) protocol utilizing a fluorescein-labelled 544 bp AMUSP cDNA (5' end). Band intensities were estimated using Tnimage Image Analysis 3.3.7a, and AMUSP cDNA levels were normalized against the respective levels of β -actin or 28S cDNA. Statistical analyses were performed using SigmaStat version 2.0.

To determine whether the two transcripts of AMUSP identified by Northern blotting result from alternative splicing of a single-copy gene or from single transcripts of a multicopy gene, we estimated the number of gene copies by performing a genomic Southern blot. Thirty μ g of genomic DNA were digested with the following endonucleases according to the respective protocol: *StuI* (Biolabs), *KpnI* (Invitrogen), *EcoRI* (Invitrogen), *BamHI* (Invitrogen), *SmaI* (Biolabs), *BclI* (Gibco). No enzyme could cut the cDNA probe sequence (850 bp), which corresponded to a region characterized by low sequence conservation (near 3' end). Digests were run on 1% agarose gels, transferred to membranes and processed as mentioned above (Amersham protocol).

Acknowledgements

We wish to thank Luíz Roberto Aguiar for technical assistance in the apiary of Ribeirão Preto. We also thank Klaus Hartfelder for critically reading and commenting on previous version of this manuscript. This research was supported by FAPESP (ARB and ZLPS) and by the Australian Research Council Special Centre for the Molecular Genetics and Development (RM).

References

- Asahina, M., Jindra, M. and Riddiford, L.M. (1997) Developmental expression of Ultraspiracle proteins in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, during larval life and the onset of metamorphosis. *Dev Genes Evol* **20**: 381–388.
- Barchuk, A.R., Bitondi, M.M.G. and Simões, Z.L.P. (2002) Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *J Insect Sci* **2**:1: 8pp.
- Billas, I.M.L., Moulinier, L., Rochel, N. and Moras, D. (2001) Crystal structure of the ligand-binding domain of the ultraspiracle protein USP, the ortholog of retinoid X receptors in insects. *J Biol Chem* **276**: 7465–7474.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995) Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor α -RXR. *Nature* **375**: 377–382.
- Chambon, P. (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* **10**: 940–954.
- Chung, A.C.K., Durica, D.S., Clifton, S.W., Roe, B.A. and Hopkins, P.M. (1998) Cloning of crustacean ecdysteroïd receptor and retinoid-X receptor gene homologs and elevation of retinoid-X receptor mRNA by retinoic acid. *Mol Cell Endocrinol* **139**: 209–227.
- Clayton, G.M., Peak-Chew, S.Y., Evans, R.M. and Schwabe, J.W.R. (2001) The structure of the ultraspiracle ligand-binding domain reveals a nuclear receptor locked in an inactive conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1549–1554.
- Copper, M.P., Klaassen, I., Brakenhoff, R.H., Cloos, J., Snow, G.B. and Braakhuis, B.J.M. (1997) All-trans retinoic acid induced gene expression and growth inhibition in head and neck cancer cell lines. *Oral Oncol* **33**: 270–274.
- Danielian, P.S., White, R., Lees, J.A. and Parker, M.G. (1992) Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J* **11**: 1025–1033.
- Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R. and Chambon, P. (1994) Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J* **13**: 5370–5382.
- Egea, P.F., Mitschler, A. and Moras, D. (2002) Molecular recognition of agonist ligands by RXRs. *Mol Endocrinol* **16**: 987–997.
- Engels, W. and Imperatriz-Fonseca, V.L. (1990) Caste development, reproductive strategies and control of fertility in honey bees and stingless bees. In *Social Insects. An Evolutionary Approach to Castes and Reproduction* (Engels, W., ed.), pp. 167–230. Springer-Verlag, Berlin.
- Escriva, H., Delaunay, F. and Laudet, V. (2000) Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays* **22**: 717–727.

- Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**: 889–895.
- Gianini, F., Maestro, R., Vukosavljevic, T., Pomponi, F. and Boicchi, M. (1997) All-*trans*, 13-*cis* and 9-*cis* retinoic acids induce a fully reversible growth inhibition in HNSC cell lines: implications for in vivo retinoic acid use. *Int J Cancer* **70**: 194–200.
- Glass, C. and Rosenfeld, M.G. (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* **14**: 121–141.
- Hagenguth, H. and Rembold, H. (1978) Identification of juvenile hormone III as the only JH homolog in all developmental stages of the honey bee. *Z Naturforsch* **33c**: 847–850.
- Hannan, G.N. and Hill, R.J. (2001) *Lcusp*, an *ultraspiracle* gene from the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*: cDNA cloning, developmental expression of RNA and confirmation of function. *Insect Biochem Mol Biol* **31**: 771–781.
- Hartfelder, K. and Engels, W. (1998) Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr Top Dev Biol* **40**: 45–77.
- Hayward, D.C., Bastiani, M.J., Trueman, J.W.H., Truman, J.W., Riddiford, L.M. and Ball, E.E. (1999) The sequence of *Locusta* RXR, homologous to *Drosophila* *Ultraspiracle*, and its evolutionary implications. *Dev Genes Evol* **209**: 564–571.
- Hayward, D.C., Dhadialla, T.S., Zhou, S., Kuiper, M.J., Ball, E.E., Wyatt, G.R. and Walker, V.K. (2003) Ligand specificity and developmental expression of RXR and ecdysone receptor in the migratory locust. *J Insect Physiol* **49**: 1135–1144.
- Henrich, V.C. and Brown, N.E. (1995) Insect Nuclear Receptors: a developmental and comparative perspective. *Insect Biochem Mol Biol* **25**: 881–897.
- Ismail, S.M., Satyanarayana, K., Bradfield, J.Y., Dahm, K.H. and Bhaskaran, G. (1998) Juvenile hormone acid: Evidence for a hormonal function in induction of vitellogenin in larvae of *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol* **37**: 305–314.
- Jiang, H., Gyda, M., Harnish, D.C., Chandraratna, R.A., Soprano, K.J., Kochhar, D.M. and Soprano, D.R. (1994) Teratogenesis by retinoic acid analogs positively correlates with elevation of retinoic acid receptor- $\beta 2$ mRNA levels in treated embryos. *Teratology* **50**: 38–43.
- Jindra, M., Huang, J.Y., Malone, F., Asahina, M. and Riddiford, L.M. (1997) Identification and mRNA developmental profiles of two *ultraspiracle* isoforms in the epidermis and wing of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Mol Biol* **6**: 41–53.
- Jones, G. (1995) Molecular mechanisms of action of juvenile hormone. *Annu Rev Entomol* **40**: 147–169.
- Jones, G. and Jones, D. (2000) Considerations on the structural evidence of a ligand-binding function of *ultraspiracle*, an insect homolog of vertebrate RXR. *Insect Biochem Mol Biol* **30**: 671–679.
- Jones, G. and Sharp, P.A. (1997) *Ultraspiracle*: An invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13499–13503.
- Jones, G., Wozniak, M., Chu, Y., Dhar, S. and Jones, D. (2001) Juvenile hormone III-dependent conformational changes of the nuclear receptor *ultraspiracle*. *Insect Biochem Mol Biol* **32**: 33–49.
- Kapitskaya, M., Wang, S., Cress, D.E., Dhadialla, T.S. and Raikhel, A.S. (1996) The mosquito *ultraspiracle* homolog, a partner of ecdysteroid receptor heterodimer: cloning and characterization of isoforms expressed during vitellogenesis. *Mol Cell Endocrinol* **121**: 119–132.
- Koelle, M.R., Talbot, W.S., Segraves, W.A., Bender, M.T., Cherbas, P. and Hogness, D.S. (1991) The *Drosophila EcR* gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **67**: 59–77.
- Kostrouch, Z., Kostrouchova, M., Love, W., Jannini, E., Piatigorsky, J. and Rall, J.E. (1998) Retinoic acid X receptor in the diploblast, *Tripedalia cystophora*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13442–13447.
- Kucharski, R. and Maleszka, R. (2002) Evaluation of differential gene expression during behavioral development in the honeybee using microarrays and northern blots. *Genome Biol* **3**: 7.1–7.7.9.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Nei, M. (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244–1245.
- Mangelsdorf, D.J., Borgmeyer, U., Heyman, R.A., Zhou, J.Y., Ong, E.S., Oro, A.E., Kakizuka, A. and Evans, R.M. (1992) Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-*cis* retinoic acid. *Genes Dev* **6**: 329–344.
- Michelette, E.R. and Soares, A.E.E. (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **24**: 431–440.
- Minakuchi, C., Nakagawa, Y., Kiuchi, M., Seino, A., Tomita, S. and Kamimura, M. (2003) Molecular cloning and expression analysis of *Ultraspiracle* (USP) from the rice stem borer *Chilo suppressalis*. *Insect Biochem Mol Biol* **33**: 41–49.
- do Nascimento, A.M., Cuvillier-Hot, V., Barchuk, A.R., Paulino Simões, Z.L. and Hartfelder, K. (2004) Honey bee (*Apis mellifera*) transferrin – gene structure and the role of ecdysteroids in the developmental regulation of its expression. *Insect Biochem Mol Biol* in press.
- Oro, A.E., McKeown, M. and Evans, R.M. (1990) Relationship between the product of the *Drosophila ultraspiracle* locus and the vertebrate retinoid X receptor. *Nature* **347**: 298–301.
- Pinto, L.Z., Hartfelder, K., Gentile Bitondi, M.M. and Paulino Simões, Z.L. (2002) Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J Insect Physiol* **48**: 783–790.
- Piulachs, M.D., Guidugli, K.R., Barchuk, A.R., Cruz, J., Simões, Z.L.P. and Bellés, X. (2003) The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem Mol Biol* **33**: 459–465.
- Rembold, H. (1987) Caste differentiation of the honeybee – fourteen years of biochemical research at Martinsried. In *Chem Biol Social Insects* (Eder, J. and Rembold, H., eds.), pp. 3–13. Verlag J. Peperny, Munchen.
- Riddiford, L.M., Cherbas, P. and Truman, J.W. (2000) Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam Horm* **60**: 1–73.
- Robinson, G.E. and Vargo, E.L. (1997) Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: Gonadotropin and behavioral pacemaker. *Arch Insect Biochem Physiol* **35**: 559–583.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sasorith, S., Billas, I.L.M., Iwema, T., Moras, D. and Wurtz, J.M. (2002) Structure-based analysis of the *ultraspiracle* protein and docking studies of putative ligands. *J Insect Sci* **2**: 25: 11pp.
- Schmidt Capella, I.C. and Hartfelder, K. (1998) Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J Insect Physiol* **44**: 385–391.

- Schmidt Capella, I.C. and Hartfelder, K. (2002) Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honey bee ovary. *Cell Tissue Res* 307: 265–272.
- Thummel, C.S. (2001) Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. *Dev Cell* 1: 453–465.
- Tzertzinis, G., Malecki, A. and Kafatos, F.C. (1994) BmCF1, a *Bombix mori* RXR-type receptor related to the *Drosophila ultraspiracle*. *J Mol Biol* 238: 479–486.
- Vogtli, M., Imhof, M.O., Brown, N.E., Rauch, P., Spindler-Barth, M., Lezzi, M. and Henrich, V.C. (1999) Functional characterization of two *Ultraspiracle* forms (C1USP-1 and C1USP-2) from *Chironomus tentans*. *Insect Biochem Mol Biol* 29: 931–942.
- White, K.P., Hurban, P., Watanabe, T. and Hogness, D.S. (1997) Coordination of *Drosophila* metamorphosis by two ecdysone-induced nuclear receptors. *Science* 276: 114–117.
- Xu, Y., Fang, F., Chu, Y., Jones, D. and Jones, G. (2002) Activation of transcription through the ligand-binding pocket of the orphan nuclear receptor ultraspiracle. *Eur J Biochem* 269: 6026–6036.
- Yao, T.P., Forman, B.M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J.D., McKeown, M., Cherbas, P. and Evans, R.M. (1993) Functional ecdysone receptor is the product of *EcR* and *Ultraspiracle* genes. *Nature* 366: 476–479.
- Yao, T.P., Segraves, W.A., Oro, A.E., McKeown, M. and Evans, R.M. (1992) *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* 71: 63–72.