



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Expressão de genes da via de biossíntese do
Hormônio Juvenil em *Melipona scutellaris*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**

Aluno: Renato Pereira Silva

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Maria Bonetti / UFU

Uberlândia – MG

2011



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Expressão de genes da via de biossíntese do Hormônio Juvenil em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Aluno: Renato Pereira Silva

Orientadora: Profª Drª Ana Maria Bonetti / UFU

Co-orientador: Prof Dr Carlos Ueira Vieira / UFU

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética).

Uberlândia – MG
2011



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Expressão de genes da via de biossíntese do Hormônio Juvenil em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Aluno: Renato Pereira Silva

COMISSÃO EXAMINADORA:

Presidente: Dr^a Ana Maria Bonetti (Orientadora)

Examinadores: Dr^a Zilá Luz Paulino Simões / FFCLRP-USP

Dr Klaus Hartfelder / FMRP-USP

Data da defesa:

As sugestões da Comissão Examinadora e as normas PGGB para o formato da dissertação foram contempladas.

Prof^a Dr^a Ana Maria Bonetti

Uberlândia – MG

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586e Silva, Renato Pereira, 1987-
2011 Expressão de genes da via de biossíntese do hormônio juvenil em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) / Renato Pereira Silva. — 2011.
60 f. : 15 il.

Orientadora: Ana Maria Bonetti.

Co-orientador: Carlos Ueira Vieira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Abelha - Genética - Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II. Vieira, Carlos Ueira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Agradecimentos

Aos meus colegas do Labgen que muito me ajudaram a concluir esta etapa: Luciana, Naiara, Isabel, Denis, Fernando, Tininha, Carlos Júnior, Roberta, Mariana, Jéssica e Célio.

Ao Profº Carlos Ueira pelo apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Profº Klaus Hartfelder e à Profª Zilá Luz pelas contribuições na correção desta dissertação.

À minha amiga Débora Nunes, verdadeiro exemplo de amizade, por me apoiar e socorrer sempre que precisei.

Em especial, agradeço à minha orientadora Ana Maria Bonetti. Sua compreensão e sabedoria foram fundamentais nessa etapa da minha vida. Sua atitude me ensinou mais que mil palavras. Obrigado pelo apoio incondicional. Você é um exemplo que levarei pelos meus novos caminhos.

"Pare de se queixar do que não tem e comece a criar o que quer." Dr. Phil McGraw

Sumário

Capítulo I – Fundamentação Teórica

1. Abelhas sem ferrão	3
2. Hormônio Juvenil	6
3. A via de síntese do Hormônio Juvenil (HJ).....	9
4. Referências Bibliográficas	11

Capítulo II – Expressão de genes da via de biossíntese do Hormônio Juvenil em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

1. Resumo	17
2. Abstract.....	17
3. Introdução.....	18
4. Objetivos.....	20
5. Material e Métodos	21
5.1. Material Biológico	21
5.2. Extração de RNA Total e síntese da 1ª fita de cDNA	22
5.3. RT-PCR Semiquantitativo.....	23
5.4. Análise por RT-PCR em Tempo Real.....	25
5.5. Análise estatística.....	26
6. Resultados.....	27
6.1.Cinética de Reação RT-PCR semiquantitativo para transcritos do gene <i>hmgr</i>	27
6.2. Níveis de transcritos do gene <i>hmgr</i> durante o desenvolvimento de <i>Melipona scutellaris</i>	28
6.3. Níveis de transcritos do gene <i>mfe</i> em abelhas adultas de <i>Melipona</i> <i>scutellaris</i>	32
6.4. Expressão tecido - específica dos genes <i>hmgr</i> e <i>mfe</i>	33
6.5. Níveis de transcritos do gene <i>famet</i> em larvas e adultos de <i>Melipona</i> <i>scutellaris</i>	34

7. Discussão	38
8. Conclusões	45
9. Conclusões gerais	46
10. Referências Bibliográficas	47

Apresentação

O Hormônio Juvenil (HJ) pertence a um grupo de hormônios sesquiterpenóides acíclicos, com um grupo epoxi em uma extremidade da molécula e um metil ester na outra. É um fator regulador da embriogênese, do desenvolvimento larval e adulto, da determinação de castas em insetos sociais, da metamorfose e do metabolismo em todos os insetos, inclusive em *Melipona scutellaris*, objeto do presente estudo. Os níveis de HJ são controlados, dentre outros fatores, por processos de síntese, degradação e ligação a proteínas específicas na hemolinfa.

O presente trabalho foi desenvolvido em dois capítulos. O primeiro trata-se de uma revisão da literatura sobre os aspectos gerais da abelha sem ferrão *M. scutellaris*, o papel do hormônio juvenil em insetos, finalizando com enfoque na via de síntese desse hormônio. No segundo capítulo descrevemos a análise, em estágios do desenvolvimento e diferentes tecidos de *M. scutellaris*, da expressão dos genes codificadores das enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductase (HMGR) e metil-farnesoate epoxidase do hormônio juvenil (MFE), enzimas da via de síntese do HJ. Analisamos, ainda, a expressão de transcritos do gene codificador da enzima O-metil transferase do ácido farnesóico (FAMeT), também da via de síntese do HJ, em larvas e adultos de *M. scutellaris*.

Capítulo 1

Fundamentação Teórica

1. Abelhas sem ferrão

Dentre os insetos da Ordem Hymenoptera destacam-se as abelhas com alta complexidade na organização social. As abelhas sem ferrão pertencem a Subordem Apocrita, Superfamília Apoidea, Família Apidae, Subfamília Apinae e Tribo Meliponini, que inclui todas as abelhas indígenas sem ferrão (Michener, 2000). Segundo Camargo & Pedro (2008) foram descritos, para Meliponini, 33 gêneros, incluindo um extinto. Dentre os Meliponini, *Melipona* apresenta o maior número de espécies, distribuindo-se desde o México até a Argentina, com ampla diversificação na bacia amazônica.

As abelhas do gênero *Melipona* constroem células de cria (alvéolos) para a postura dos ovos e potes de cera, para armazenamento de pólen e mel. O aprovisionamento de alimento nas células de cria é massal. O alimento, que consiste de pólen, secreção glandular e mel, é semi-líquido e sobre ele o ovo é posicionado verticalmente. Em seguida, a célula é fechada e aberta apenas para a eclosão do imago.

Todas as espécies da Tribo Meliponini são eussociais, com castas e sistema de divisão de trabalho bem definidos. As abelhas sem ferrão, assim como as demais eussociais, apresentam duas castas: rainha e operária. As rainhas são fêmeas férteis e possuem como funções, dentro da colônia, a reprodução e a manutenção da coesão da colônia por meio de produção de feromônios. As operárias são fêmeas estéreis ou semi-estéreis, responsáveis pelas tarefas de manutenção da colônia e, eventualmente, postura de ovócitos que darão origem a machos (ovos reprodutivos) ou alimentarão a rainha (ovos tróficos) (Velthuis *et al.*, 2001).

Nos meliponídeos os machos têm como função copular com as rainhas jovens. Em *Melipona*, eles permanecem na colméia durante o primeiro terço da vida e já foram vistos trabalhando no aquecimento de cria, produção e manipulação de cera e coleta de pólen nas flores (Kerr *et al.*, 1996).

A determinação de castas nos Hymenoptera, de forma geral, é via alimentação diferencial da larva (Kerr & Nielsen, 1966). Nas abelhas da espécie *Apis mellifera* (Apini) as larvas se tornam rainhas ou operárias de acordo com a quantidade e a qualidade do alimento que recebem durante o estágio larval

(Beetsma, 1979). No gênero *Trigona* (Meliponini) a quantidade de alimento recebida pela larva é o fator crítico para a diferenciação das castas (Camargo, 1972; Campos, 1979). Em *Scaptotrigona postica* existem grandes células de cria, conhecidas como realeiras, que possuem o dobro ou triplo do alimento larval em relação a uma célula normal e delas emergem as rainhas (Hartfelder & Engels, 1998).

Em *Frieseomelita varia* (Meliponini) o estímulo alimentar, também, é o desencadeador da produção de rainhas. Uma larva pré-defecante que ingere além das provisões de sua própria célula, o alimento de célula vizinha, diferencia-se em rainha (Terada, 1974; Faustino *et al.*, 2002).

Nas abelhas do gênero *Melipona* as nutridoras não fornecem alimento para as larvas de modo progressivo. O aprovisionamento dos alvéolos de cria é massal. As operárias constroem as células de cria e armazenam, sem distinção, uma massa alimentar onde ocorre a postura dos ovos pela rainha fisogástrica (Zucchi *et al.*, 1999). Assim, diferentemente, dos outros gêneros dos Meliponini, as operárias e as rainhas emergem de células de cria do mesmo tamanho, com a mesma quantidade e qualidade de alimento. Em *Melipona*, a quantidade e qualidade do alimento larval não são suficientes para a diferenciação da larva em rainha ou operária (Kerr *et al.*, 1996) porém, Jarau *et al.* (2010) descrevem que a adição no alimento larval de um componente da glândula labial, o geraniol, é capaz de aumentar o número de larvas que se desenvolve em rainha.

Em 1948, Kerr sugeriu um controle genético-alimentar para a determinação de castas em *Melipona*. Nesse modelo, as divergências de morfologia, fisiologia e comportamento entre rainhas e operárias seriam devidas a dois genes, x^a e x^b , com dois alelos cada um, x^a_1 , x^a_2 e x^b_1 , x^b_2 . Esses genes teriam expressão desde o terço final de L3 (Larva 3) até metade de LPD (Larva Pré - Defecante). A dupla heterozigose (x^a_1 , x^a_2 , x^b_1 , x^b_2) leva à diferenciação da larva em rainha, desde que a quantidade de alimento recebida pela larva seja suficiente (Kerr, 1948; Kerr, 1950; Kerr & Nielsen, 1966; Kerr, 1974) (Figura 1). Homozigose para um ou ambos os genes resultaria no desenvolvimento de operária, independentemente da quantidade de alimento ingerida. Na situação de dupla heterozigose, mas sem a quantidade de alimento suficiente, surgiriam fenocópias, fêmeas com fenótipo

de operárias e características morfológicas internas de rainha (Cruz-Landim *et al.*, 1980).

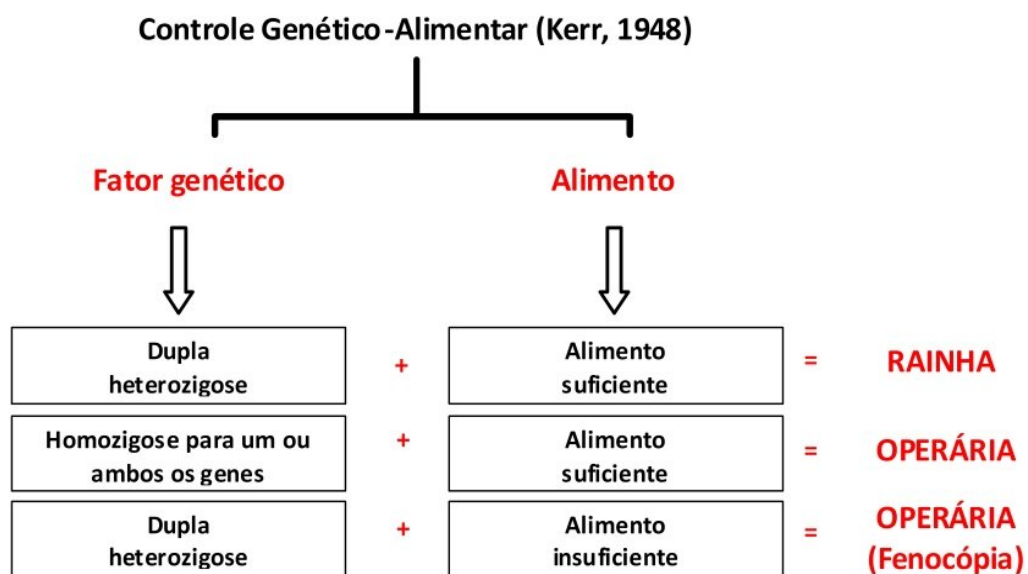


Figura 1: Controle genético-alimentar para determinação de castas em *Melipona*, proposto por Kerr em 1948.

A abelha sem ferrão, que constitui objeto de estudo desse trabalho é popularmente conhecida como Uruçu do Nordeste, com nome científico *Melipona scutellaris*. No Brasil, *M. scutellaris* ocorre nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe (Camargo & Pedro, 2008) (Figura 2).

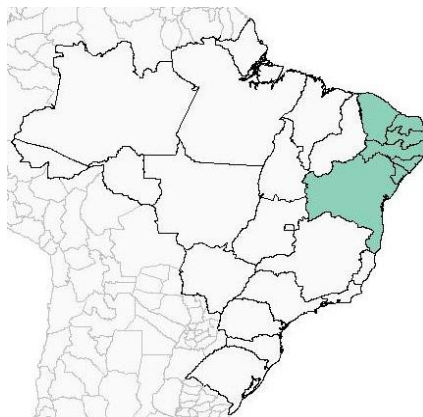


Figura 2: Ocorrência natural de *Melipona scutellaris* no Brasil. Em destaque Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe. Fonte: Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>

2. Hormônio Juvenil

O Hormônio Juvenil (HJ) pertence a um grupo de hormônios sesquiterpenóides acíclicos, com um grupo epoxi em uma extremidade da molécula e um metil ester na outra (Roller *et al.*, 1967). Já foram descritas várias formas de HJ: HJ-I e o HJ-II foram identificados em Lepidóptera. HJ-0 e 4-metil-HJ-I parecem ser exclusivos de Lepidóptera. Nos dípteros foi encontrada outra forma de HJ: o 6,7-epóxido-HJ-III (Baker *et al.*, 1990), também chamado de HJB3 ou HJ-III bisepoxy (Bellés *et al.*, 2005). O HJ-III é o encontrado na maioria das espécies de insetos (Bowers *et al.*, 1965).

O HJ é um importante fator regulador da embriogênese, do desenvolvimento larval e pupal, da metamorfose e do metabolismo em todos os insetos, da reprodução e, nos insetos sociais, também da determinação de castas, o que o torna importante para o entendimento dos processos biológicos em insetos (Bonetti, 1983 Bonetti *et al.*, 1984; Hammock, 1985; Roe & Venkatesh, 1990; Nijhout, 1994; Hartfelder & Engels, 1998; Barchuk *et al.*, 2002).

Os níveis de HJ são controlados por processos de síntese, degradação e ligação a proteínas específicas na hemolinfa. Neuropeptídeos que controlam a síntese de HJ foram identificados em insetos. As alatotropinas estimulam a

produção de HJ e as alatostatinas inibem a produção desse hormônio (Taylor *et al.*, 1996). Esses neuropeptídeos atuam no sistema nervoso sobre os *corpora allata* (CA), um par de glândulas responsáveis pela síntese de HJ, localizadas no complexo retrocerebral (Gilbert *et al.*, 2000; Hartfelder, 2000).

A divergência fenotípica entre castas (rainhas e operárias) pode ser resultado de modulação casta-específica dos títulos de HJ e ecdisteróides durante o desenvolvimento larval (Hepperle & Hartfelder, 2001). Além disso, há diferenças fisiológicas, especialmente em relação à produção de proteínas vitelogênicas. Todas essas diferenças distinguem as duas castas em relação à capacidade de ovopositar (Bonetti, 1982; Engels *et al.*, 1990; Barchuk *et al.*, 2002).

A administração de HJ ou análogos induz diferenças fenotípicas em larvas de várias espécies do gênero *Melipona*, sendo que larvas de *Melipona* tratadas com HJ tornam-se rainhas (Campos, 1978; Bonetti, 1983; Bonetti, 1984; Bonetti *et al.*, 1994; Bonetti *et al.*, 1995). Larvas de meliponídeos respondem à aplicação de HJ desde que sejam tratadas no final do instar Larva 3, de L3-3 até o estágio de larva pré-defecante (LPD). O tratamento com HJ antes de L3-3 provoca alta mortalidade e após LPD não promove a diferenciação da larva em rainha (Bonetti *et al.*, 1994; Bonetti *et al.*, 1995).

As rainhas induzidas pelo tratamento com HJ e as rainhas naturais são idênticas em relação à morfologia e peso dos ovários, volume de espermateca, capacidade de fecundação e presença de vitelogenina na hemolinfa (Bonetti, 1982; Bonetti, 1984; Bonetti *et al.*, 1994; Bonetti *et al.*, 1995) entretanto, até o momento, rainhas induzidas pelo tratamento com HJ, em *Melipona*, não foram capazes de estabelecer colônias estáveis (Kerr; Campos; Bonetti; comunicação pessoal).

Além de papel fundamental na determinação de castas, os níveis de HJ são, também, responsáveis pelo polietismo etário em abelhas eussociais. Aumento progressivo nos níveis de HJ na hemolinfa de operárias de *A. mellifera* está relacionado com o desenvolvimento de comportamentos associados à idade nessas abelhas, que iniciam as atividades com as tarefas internas da colméia e terminam realizando atividades de forrageamento (Jaycox *et al.*, 1974; Fluri *et al.*, 1982; Robinson & Vargo, 1997).

Nos meliponídeos, a divisão de trabalho nas operárias se modifica, também, de acordo com a idade. Nas primeiras horas do nascimento as abelhas realizam a limpeza corporal e permanecem sobre os favos de cria. No 9º dia de vida as operárias começam a manipular cera, construir células de cria e participar do processo de postura e provisionamento das células (nutridoras). A partir do 14º dia são lixeiras internas e após o 25º dia são guardas, receptoras de néctar, desidratadoras de néctar, ventilam a colméia e saem para o campo (forrageiras) em busca de pólen, néctar, barro, resina e água (forrageiras) (Kerr *et al.*, 1996). Em *A. mellifera*, a relação do HJ com o desenvolvimento do comportamento está ligada à mudança de função desse hormônio, que passa de regulador de processos reprodutivos para integrador da vida social (Hartfelder, 2000).

A maioria dos estudos de polietismo etário foi realizado com a abelha *A. mellifera*, nas quais a aplicação de HJ em operárias recém-emergidas provoca transição mais rápida das tarefas internas na colméia para as tarefas externas (Robinson, 1992). O tratamento com HJ promove degeneração prematura das glândulas hipofaríngeas em operárias. Essas glândulas secretam substâncias que fazem parte da composição do alimento larval. Esse processo acompanha a mudança de atividade das operárias, que passam da atividade no ninho (nutridoras) para atividades em campo (forrageamento) (Beetsma & Houten, 1974; Jaycox *et al.*, 1974; Rutz *et al.*, 1974; Sakagawa *et al.*, 1986). A carência de forrageiras em colônias com abelhas de mesma idade causa um aumento nos níveis de HJ nas operárias jovens, induzindo-as a uma atividade de forrageamento precoce (Robinson *et al.*, 1989) o que demonstra a plasticidade comportamental dessas abelhas.

3. A via de síntese do Hormônio Juvenil (HJ)

A síntese do HJ é regulada por neuropeptídeos (alotropinas e alatostatinas) e neurotransmissores (octopamina, glutamato e dopamina) (Gilbert, 2005). O primeiro passo para a formação do HJ é a transformação de acetil-CoA em farnesil-pirofosfato, passo comum para vertebrados e invertebrados. Essa via é chamada de via do mevalonato (Bellés, 2005) (Figura 3).

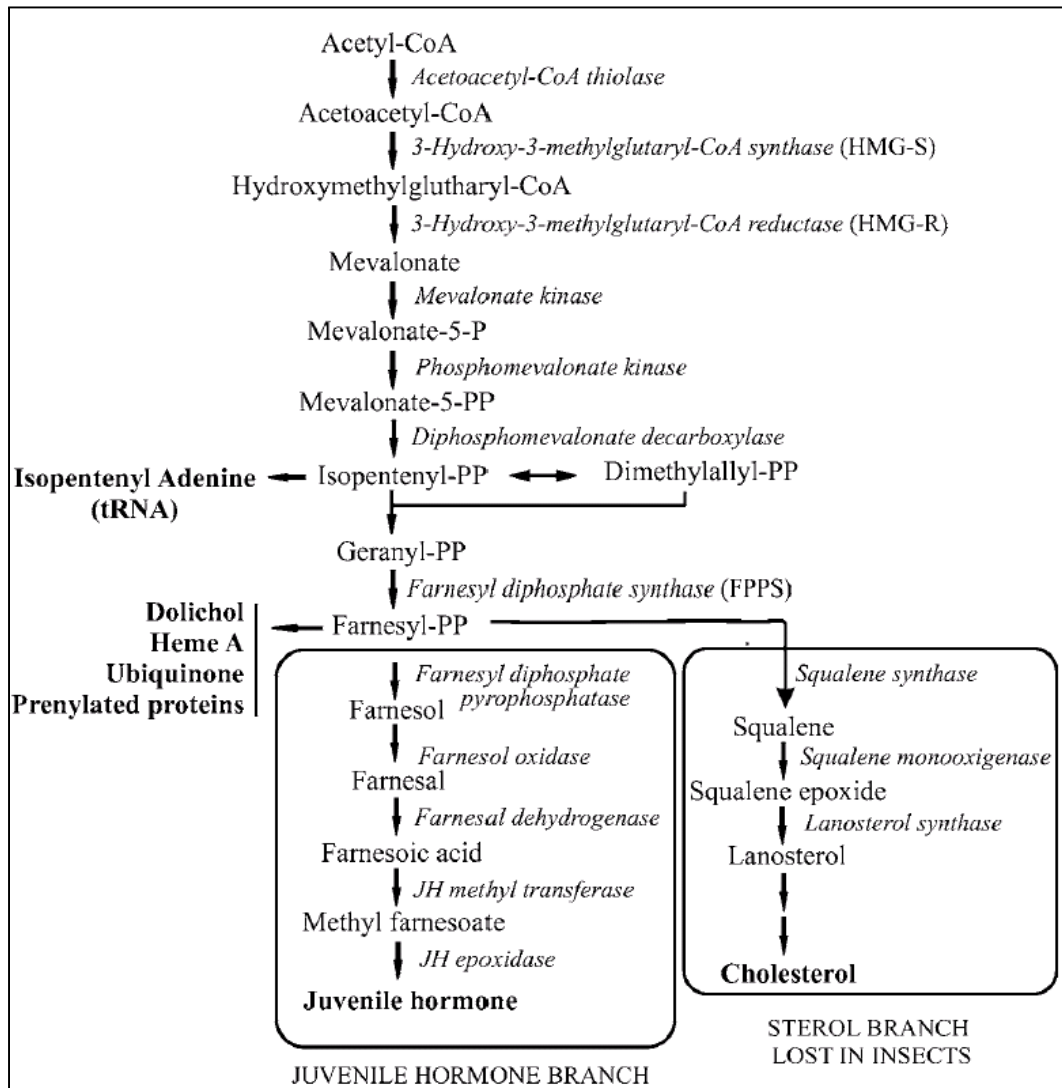


Figura 3: Diagrama da via do mevalonato e síntese de HJ em insetos e passos finais na síntese de colesterol em vertebrados. Fonte: Bellés *et al.*, (2005).

Os insetos não sintetizam colesterol *de novo* por não possuírem genes codificadores da enzima esqualeno sintase, assim, neles a via mevalonato segue para a produção de HJ.

As enzimas que participam dos passos da via metabólica desde acetil-CoA até farnesil-pirofosfato apresentam, entre insetos e vertebrados, identidade entre 40 a 60% nas sequências de nucleotídeos. Nos insetos, as enzimas que atuam nessa via metabólica só se tornam diferentes após a formação do farnesil-pirofosfato (Bellés, 2005).

Em *Bombyx mori*, todas as enzimas da via mevalonato, envolvidas na síntese de HJ, foram clonadas e sequenciadas a partir dos *corpora allata* (Kinjoh *et al.*, 2007). Em *A. mellifera* a investigação dos genes codificadores das enzimas da via do mevalonato mostrou que eles são conservados em relação a outros insetos (Santos, 2008).

4. Referências Bibliográficas

- Baker, F.C., Reuter, C.C., Tsai, L.W., Brindle, P.A. & Richard, D.S. (1990) Use of microderivatization techniques in combination with thin-layer chromatography, liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for investigation of juvenile hormones and related compounds. In: *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones*, Plenum Press, New York, 19-31.
- Barchuk, A.R., Bitondi, M.M. & Simões, Z.L. (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.
- Beetsma, J. & Houten, T. (1974) Effects of juvenile hormone analogues in the food of honeybee colonies. *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie*, 77, 292-300.
- Beetsma, J. (1979) The process of queen-worker differentiation in the honeybee. *Bee World*, 60 (1), 24-39.
- Bellés, X., Martín, D. & Piulachs, M.D. (2005) The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu Rev Entomol*, 50, 181-199.
- Bonetti, A.M. (1982) *Ação do Hormônio Juvenil sobre a Expressão Gênica em Melipona (Hymenoptera, Apidae, Meliponidae)*. Mestrado, FMRP/USP, 140 p.
- Bonetti, A.M. (1983) Action of Juvenile Hormone on gene expression in *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponidae). *Revista Brasileira de Genética*, 4, 583.
- Bonetti, A.M. (1984) Efeitos do Hormônio Juvenil no desenvolvimento ovariano de *Melipona quadrifasciata*. *Revista Brasileira de Biologia*, 4(44), 509-518.
- Bonetti, A.M., Cruz-Landim, C. & Kerr W.E. (1994) Sex determination in bees. XXX. Effects of Juvenile Hormone in development of tergal glands in *Melipona*. *J. Apic. Res.*, 1 (33), 11-14.

- Bonetti, A.M., Kerr W.E. & Matusita, S.H. (1995) Effects of Juvenile Hormone I, II, III in single and fractionated dosage in *Melipona* bees. *Revista Brasileira de Biologia*, 1 (55), 113-120.
- Bowers, W.S., Thompson, M.J. & Uebel, E.C. (1965) Juvenile and gonadotropic hormone activity of 10,11-epoxyfarnesenic acid methyl ester. *Life Sci*, 4, 2323-2331.
- Camargo, C.A. (1972) Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apoidea). *Revista Brasileira de Biologia*, 32, 133-138.
- Camargo, J.M.F. & Pedro, S.R.M. (2008) Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure J.S., Urban D. & Melo, G.A.R. *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region* – online version. Available online (<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>).
- Campos, L.A.O. (1978) Sex determination in bees. VI. Effect of a Juvenile Hormone analogue in males and females of *Melipona quadrifasciata* (Apidae). *J Kansas Entom Soc*, 51 (2), 228-234.
- Campos, L.A.O. (1979) Determinação do sexo nas abelhas XIII. Determinação das castas em *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae). Papel do Hormônio Juvenil. *Ciência e Cultura*, 31 (1), 65-70.
- Cruz-Landim, C., Santos S.M.F. & Hofling M.C.A. (1980) Identification of queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae) with the worker phenotype by study of the tergal glands. *Rev. Bras. Genet.*, 3, 295-302.
- Engels, W., Kaatz, H., Zillikens, A., Simões, Z.L.P., Trube, A., Braun, R. & Dittrich, F. (1990) Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In: Hoshi, M. & Yamashita, O. *Advances in Invertebrate Reproduction*, 5, Elsevier, Amsterdam.
- Faustino, C.D., Silva-Matos, E.V., Mateus, S. & Zucchi, R. (2002) First record of emergency queen rearing in stingless bees (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) *Insectes. Soc.*, 46.

- Fluri, P., Luscher, M., Wille, H. & Geric, L. (1982) Changes in weight of the pharyngeal gland and hemolymph titers of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 28 (1), 61-68.
- Gilbert, L.I. (2005). *Comprehensive Molecular Insect Science*, 7, Volume Set, USA, Elsevier Pergamon. Available online Science Direct (www.info.sciencedirect.com)
- Gilbert, L.I., Granger, N.A. & Roe, R.M. (2000) The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem Mol Biol*, 30, 617-644.
- Hammock, B.D. (1985) Regulation of juvenile hormone titer: degradation. In: Kerkut, G.A. Gilbert L.I. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 7, Pergamon, Oxford, 431-472.
- Hartfelder, K. & Engels, W. (1998) Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr Topics Dev Biol*, 40, 45-77.
- Hartfelder, K. (2000) Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. *Braz J Med Biol Res*, 33, 157-177.
- Hepperle, C. & Hartfelder, K. (2001) Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development. *Naturwissenschaften*, 88, 113-116.
- Jarau, S., Veen, J. W. V., Twele, R., Reichle, C., Gonzales, E. H., Aguilar, W. F., Ayasse, M. (2010) Workers make the queens in Melipona bees: Identification of Geraniol as a Caste Determining Compound from Labial Glands of Nurse Bees. *J Chem Ecol*, 36, 565-569.
- Jaycox, E. R., Skawronek, W. & Guynn, G. (1974) Behavioral changes in worker honey bee (*Apis mellifera* L.) induction by injection of a juvenile hormone mimic. *Annals of the Entomological Society of America*, 67(4), 529-534.
- Kerr, W.E. & Nielsen, R.A. (1966) Evidences that genetically determined melipona queens can become workers. *Genetics*, 54, 859-866.

- Kerr, W.E. (1948) Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, Usp 5, 181-276.
- Kerr, W.E. (1950) Genetic Determination of Castes in the Genus *Melipona*. *Genetics*, 35, 143-152.
- Kerr, W.E. (1974) Sex determination in bees. III. Caste determination and genetics control in *Melipona*. *Ins. Soc.*, 21(4), 357-368.
- Kerr, W.E., Carvalho G.A., & Nascimento, V.A. (1996) *Abelha Urucu: Biologia, Manejo e Conservação*. Belo Horizonte – MG, Ed. Acangau, 143 p.
- Kinjoh, T., Kaneko, Y., Itoyama, K., Mita, K., Hiruma, K. & Shinoda, T. (2007) Control of juvenile hormone biosynthesis in *Bombyx mori*: cloning of the enzymes in the mevalonate pathway and assessment of their developmental expression in the corpora allata. *Insect Biochem Mol Biol*, 37, 808-818.
- Michener, D.C. (2000) The bee of the world. Baltimore and London, *The Johns Hopkins University Press*, 913.
- Nijhout, H.F. (1994) *Insect hormones*. Princeton University Press.
- Robinson, G.E. & Vargo, E.L. (1997) Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Arch Insect Biochem Physiol*, 35, 559-583.
- Robinson, G.E. (1992) Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Entomol*, 37, 637-665.
- Robinson, G.E., Page, R.E., Strambi, C. & Strambi, A. (1989) Hormonal and genetic control of behavioral integration in honey bee colonies. *Science*, 246, 109-112.
- Roe, R.M. & Venkatesh, K. (1990) Metabolism of juvenile hormones: degradation and titer regulation. In: Rutgers, G.A. *Morphogenetic Hormones of Arthropods*, 1, University Press, New Brunswick, 126-179.

- Roller, H., Dahm K.H., Sweely, C.C. & Trost, B.M. (1967) The structure of juvenile hormone (giant silkworm moth *Hyalophora cecropia*). *Angew. Chem. Int. Edn*, 6, 179-180.
- Rutz, W., Gerig, L., Wille, H. & Lucher, M. (1974). A bioassay for juvenile hormone (JH) effects of insects growth regulators (IGR) on adult worker honeybees. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, 47, 307-313.
- Sakagawa, H., Sasaki, M. & Okada, I. (1986) Experimental induction of the division of labour in worker *Apis mellifera* L. by juvenile hormone (JH) and its analog. In: *30th International Congress of Apiculture*, Nagoya, Japan Apimondia Publishing House, Bucharest, Romania, 140-143.
- Santos, A.M. (2008) *Biologia Molecular dos genes envolvidos no metabolismo do hormônio juvenil em Apis mellifera*. Tese Doutorado. FMRP/ USP -. Ribeirão Preto.
- Taylor, P.A., Bhatt, T.R. & Horodyski, F.M. (1996) Molecular characterization and expression analysis of *Manduca sexta* allatotropin. *Eur J Biochem*, 239, 588-596.
- Terada, Y. (1974) *Contribuição ao estudo da regulação social em Leurotrigona muelleri e Friesomelitta varia (Hymenoptera, Apidae)*. Mestrado, FMRP/USP, 96 p.
- Velthuis, H.H.W., Roeling, A. & Imperatriz-Fonseca, V.L. (2001) Repartition of reproduction among queens in the polygynous stingless bee *Melipona bicolor*. *Proceedings of the Experimental and Applied Entomology*, 12, 45-49.
- Zucchi, R., Silva-Matos, E.V., Nogueira-Ferreira, F.H. & Azevedo, G.G. (1999) On the cell provisioning process (POP) of the stingless bees – Nomenclature reappraisal and evolutionary considerations (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Sociobiology*, 34, 65-85.

Capítulo 2

**Expressão de genes da via de biossíntese do
Hormônio Juvenil em *Melipona scutellaris*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**

1. Resumo

Em abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*, nas quais a diferenciação de castas não depende somente da quantidade e/ou qualidade do alimento larval, o Hormônio Juvenil (HJ) tem sido apresentado como agente responsável, juntamente com fatores ambientais, por mecanismos genéticos que promovem as diferenças casta – específicas. Na via de biossíntese do HJ as enzimas 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGR), O-metil transferase do ácido farnesóico (FAMeT) e metil-farnesoate epoxidase do hormônio juvenil (MFE) catalisam reações que culminam na produção do HJ-III. Nesse trabalho, foi analisada a expressão dos transcritos dos genes *hmgr* e *mfe* em diferentes tecidos, fases de desenvolvimento e castas de *M. scutellaris*, além da expressão dos transcritos do gene *famet* em larvas e adultos da mesma espécie. Nossos resultados indicam que as enzimas HMGR e MFE, em *Melipona scutellaris* estão envolvidas na síntese de HJ, sendo a MFE candidata à enzima limitante dessa via. A enzima FAMeT parece não ser enzima chave na via de síntese do HJ, pela análise dos transcritos gênicos aqui realizada.

Palavras-chave: abelha sem ferrão, Hormônio Juvenil, expressão gênica, *Melipona*, FAMeT, MFE, HMGR.

2. Abstract

In bees, juvenile hormone (JH) is a important factor in determining castes and also has a role in age polyethism. The first steps in the synthesis of JH are known as mevalonate pathway. In this pathway are present, among others, the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) and farnesoic acid O-methyltransferase (FAMeT) enzymes. Thereafter, in insects occur successive reactions that culminate in JH-III production, in which the last reaction is catalyzed by the methyl-farnesoate epoxidase (MFE). There is evidence that JH production is related both to the expression profile of these enzymes - in terms of mRNA production - and enzymatic activities. In this study, we analyzed the *hmgr* and *mfe* genes in different tissues, stages and castes of *Melipona scutellaris*. We also analyzed *famet* gene in larvae and adults of this species. Our results indicate that HMGR and MFE enzymes, in *M. scutellaris*, are probably involved in the synthesis of JH. Moreover, the MFE is a candidate for the rate limiting enzyme of this pathway. The FAMeT enzyme shows no evidence of relation to the synthesis of JH. Our results also suggest an inter-regulation between JH and ecdysteroids in *M. scutellaris*.

Keywords: stingless bee, juvenile hormone, gene expression, *Melipona*, FAMeT, MFE, HMGR.

3. Introdução

O Hormônio Juvenil (HJ) é fator regulador da embriogênese, do desenvolvimento larval e pupal, da determinação de castas em insetos sociais, da metamorfose e do metabolismo em todos os insetos (Bonetti, 1983; Hammock, 1985; Roe & Venkatesh, 1990; Nijhout, 1994; Hartfelder & Engels, 1998; Barchuk *et al.*, 2007). Os níveis de HJ são controlados por processos de síntese, degradação e ligação a proteínas específicas na hemolinfa (Taylor *et al.*, 1996).

A síntese do HJ é regulada por neuropeptídeos (alotropinas e alatostatinas) e neurotransmissores (octopamina, glutamato e dopamina) (Gilbert, 2005). Na primeira etapa de síntese do HJ, conhecida como via do mevalonato, ocorre a transformação de acetil-CoA em farnesil-pirofosfato (Bellés *et al.*, 2005), seguida por reação de hidrólise e sucessivas oxidações até a formação do ácido farnesóico. Os passos finais na produção de HJ-III envolvem a metilação do ácido farnesóico com produção de metil farnesoato e uma epoxidação do metil farnesoato para HJ-III (Tobe & Stay, 1985; Belles *et al.*, 2005).

A via do mevalonato também está presente nos vertebrados, nos quais é responsável pela síntese do colesterol. Uma das enzimas dessa via, a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGR) catalisa a transformação do HMG-CoA em mevalonato (Brown & Goldstein, 1980; Goldstein & Brown, 1990). Nos vertebrados, a HMGR é uma enzima regulatória chave no processo de síntese de colesterol (Brown & Goldstein, 1980) e em insetos tem sido sugerido que a HMGR seja uma enzima limitante no processo de síntese do HJ (Feyereisen, 1985).

Já foi demonstrado que, em insetos, a síntese de HJ nos *corpora allata* pode ser bloqueada por inibidores da HMGR (Feyereisen, 1985). Em *Blatella germanica*, a síntese de HJ foi bloqueada nos *corpora allata* incubados *in vitro* com inibidor da HMGR. Estudos moleculares da HMGR têm sido realizados em *Drosophila melanogaster* (Gertler *et al.*, 1988), *B. germanica* (Martínez-González *et al.*, 1993; Casals *et al.*, 1996), *Ips paraconfusus* (Tittiger *et al.*, 1999) e *Agrotis ipsilon* (Duportets *et al.*, 2000).

Em um dos passos finais de síntese do HJ, a enzima O-metil transferase do ácido farnesóico (FAMeT) converte o ácido farnesóico em metil farnesoato. Em crustáceos, a expressão de mRNA da FAMeT é, algumas vezes, constitutiva, e

pode ser diferencial ao longo do desenvolvimento de machos e fêmeas jovens e adultos (Silva Gunawardene *et al.*, 2001, 2003; Ruddell *et al.*, 2003; Holford *et al.*, 2004).

Desde que a reação catalisada pela FAMeT foi estabelecida como passo limitante na síntese de HJ em *Diploptera punctata* essa enzima tem sido alvo de estudos, já que pode ser um importante regulador da produção de metil farnesoato em outros insetos (Yagi *et al.*, 1991). O metil farnesoato é precursor e análogo do HJ e está envolvido em processos de crescimento, muda e reprodução.

A última reação da via de síntese do HJ, em insetos, é catalisada pela metil-farnesoate HJ epoxidase (MFE). Pouco se conhece sobre essa enzima, que é codificada por uma família de genes que pode variar consideravelmente em relação à sequência, permitindo que participe de inúmeras vias metabólicas, como a síntese de hormônios esteróides em vertebrados e insetos (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000)

O primeiro estudo da MFE em insetos foi realizado em glândulas endócrinas de *Blaberus giganteus* (Hammock, 1975). O gene codificador da MFE foi inicialmente clonado e sequenciado por Helvig *et al.*, (2004) em *D. punctata*. Em seguida, as MFEs de *Anopheles gambiae*, *D. melanogaster* e várias outras espécies foram preditas com base na sequência de *D. punctata*.

Nesse estudo, analisamos nas fases de desenvolvimento e em tecidos específicos de *Melipona scutellaris*, a expressão dos transcritos dos genes codificadores das enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGR), metil-farnesoato epoxidase do Hormônio Juvenil (MFE) e O-metil transferase do ácido farnesóico (FAMeT).

4. Objetivos

- Analisar a expressão dos transcritos dos genes *hmgr* e *mfe* em diferentes tecidos, fases do desenvolvimento e castas de *Melipona scutellaris*.
- Analisar a expressão dos transcritos do gene *famet* em larvas e adultos de *M. scutellaris*.

5. Material e Métodos

5.1. Material Biológico

Nos experimentos foram utilizadas abelhas sem ferrão, *Melipona scutellaris*, mantidas no Meliponário UFU da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG (S 18° 55' / W 45° 17'). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Para as análises, os tecidos foram dissecados em Ringer para insetos (0,1% - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 mM, KCl 182 mM, NaCl 46 mM, Tris base 10 mM, HCl 1N), sendo 25 pares de *corpora allata* e *pool* de 10 abelhas forrageiras para os demais tecidos.

As fases de desenvolvimento das abelhas *M. scutellaris* são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Fases de desenvolvimento de *Melipona scutellaris*.

Fases do desenvolvimento	Caracterização
L1	Larva 1
L2	Larva 2
L3	Larva 3
Pw	Pupa de corpo branco, olho branco
Pp	Pupa de corpo branco, olho rosa
Pb	Pupa de corpo branco, olho marrom
Pbl	Pupa com pigmentação leve (alaranjada), olho marrom
Pbd	Pupa com pigmentação forte, olho marrom escuro
NE	Adulto recém emergido (0 a 10 horas)
N	<i>Nurse</i> (Abelha Nutridora)
F	Forrageira (Abelha Campeira)

Os estágios larvais, referidos na Tabela 1, foram identificados segundo Rossini (1989) e Dias *et al.* (2001) e os de pupa, segundo Dallacqua (2007) de acordo com a cor do corpo e pigmentação do olho. Em *M. scutellaris*, o 3º instar larval é subdividido nos estágios: L3-1: alimento líquido na célula de cria, as larvas estão sobre o alimento e tem cor perolada; L3-2: alimento com consistência pastosa, as larvas continuam curvadas e sua cor é perolada; L3-3: alimento seco, consistência sólida, as larvas começam a mudar de posição e tem cor perolado brilhante; LPD (Larva Pré – Defecante): célula de cria sem alimento e, ainda, não teve início o processo de defecação, as larvas estão em forma de vírgula, dentro do alvéolo, tem cor perolada e continuam brilhantes; LD (Larva Defecante): célula de cria sem alimento e teve início o processo de defecação, as larvas são esbranquiçadas e opacas, estão eretas e com a cabeça voltada para cima (Figura 4).

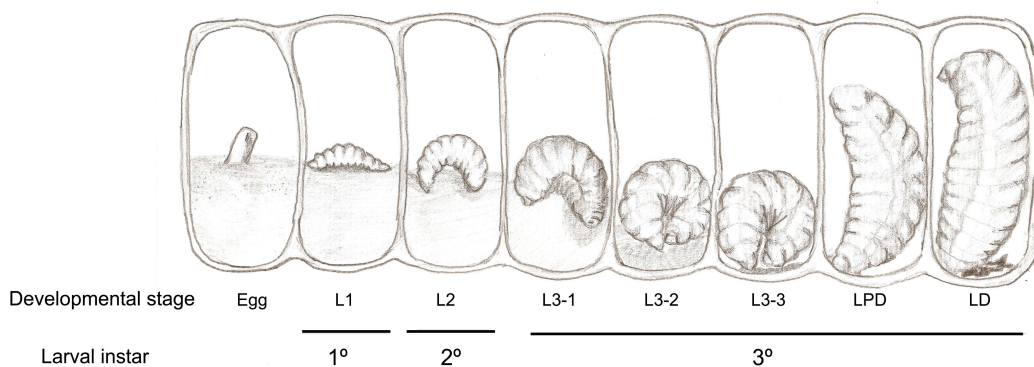


Figura 4: Esquema representando o desenvolvimento larval e os cinco estágios do 3º instar larval de *Melipona scutellaris*. Fonte: Amaral *et al.* (2010)

5.2. Extração de RNA Total e síntese da 1ª fita de cDNA

A extração de RNA total foi feita pelo método do TRIZOL (SIGMA-ALDRICH) segundo recomendações do fabricante. A abelha, após retirada do intestino, foi macerada em 1 ml de Trizol para cada 100 mg de tecido, agitado em vórtex e incubado por 5 min a 30°C. Foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio para cada ml de Trizol, agitando-se por 15 s e incubando-se a 30°C por 2 min, seguido de centrifugação a 12000 g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para

microtubo de 1,5 ml ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol para cada mL. A amostra foi centrifugada a 12000 g por 30 min a 4 °C. O sedimento foi lavado com etanol 75% e centrifugado a 7500 g por 5 min a 4°C. Depois da secagem a 55°C, em TermoBloco (Nova Etica), o material foi ressuscendido em água DEPC (0,1%) e quantificado em NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer). Valores entre 1,8 – 2,0 para a relação 260/280 foram considerados adequados.

O DNA genômico contaminante foi removido utilizando-se 10 U de DNase I RNase Free (Sigma) para cada 10 µg de RNA. A reação foi incubada a 37 °C por 40 min, seguida de 70°C por 10 min para inativação da enzima.

Para a síntese da 1ª fita de cDNA (RT) foram utilizados 1µg de RNA total, 500 µM de dNTP, 10 pmol de Oligo dT (INVITROGEN), 10 µM de DTT, 1U de RNase out (INVITROGEN) e 200 U da enzima M-MLV Transcriptase Reversa (PROMEGA) e tampão 1X, 5mM de MgCl₂, completando-se o volume para 20 µL com H₂O DEPC (0,1%). O cDNA foi testado, quanto a qualidade, com o gene codificador da proteína ribossomal 49, RP49 (GenBank number AF441189) que além de um fragmento de 150 bp, amplifica um de 240 bp no caso de contaminação genômica (Lourenço *et al.*, 2008).

5.3. RT-PCR Semiquantitativo

Um microlitro da reação de RT (cDNA) foi utilizado para amplificar os fragmentos gênicos utilizando 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, Tampão 1X, 6 pmol de cada *primer* específico, 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Real-Biotech) em volume final de 20 µl, completado com água ultrapura. No controle negativo não foi adicionado cDNA.

A amplificação foi realizada em um ciclo inicial de 95°C por 5 min, seguido de **n** ciclos de 95 °C por 30s, **T** °C por 40s, 72 °C por 30s e extensão final a 72°C por 5 min, onde **n** e **T** variaram de acordo com o primer utilizado. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (TRIS base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) corado com Brometo de Etídeo (0,5 µg/ml). A migração dos fragmentos no gel foi acompanhada por marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen) como referência para determinação do tamanho dos fragmentos.

Os *primers* utilizados (Tabela 2) foram desenhados com base nas seqüências dos genes preditos de *A. mellifera*. Os *primers* para os genes *hmgr* e *mfe* foram desenhados pela Dra. Aline Mackert dos Santos, da Universidade Federal do Mato Grosso, utilizando o programa *Primer3*. O gene codificador da proteína ribossomal 49 (RP49) foi utilizado como gene de controle endógeno para normalização da reação. O fragmento produzido por esse *primer*, em *M. scutellaris*, foi seqüenciado por Amaral (2009) e os fragmentos produzidos pelo *primer* do gene *famet*, por Vieira *et al.* (2008).

Tabela 2: Sequências dos *primers* dos genes codificadores das enzimas da via de biossíntese do Hormônio Juvenil. **Id:** Abreviação arbitrária dos nomes dos genes. **Genbank:** Número de acesso dos genes no *Genbank* **Tamanho (bp):** Tamanho dos fragmentos produzidos pelos *primers*, em pares de base (bp). **Tm utilizada (°C):** Temperatura de anelamento utilizada, em graus Celsius.

Gene/ Enzima	Id	Genbank	Primers	Tamanho (bp)	Tm (°C)
Hidroximetilglutaril-CoA redutase	<i>hmgr</i>	GB18242	F: CCTGCACAGAATGTTGGAAG R: GTGCAGGAAGAATAGTTCCG	178	58
Metil-farnesoato epoxidase	<i>mfe</i>	GB15634	F: GGAATCATTTCTTGCGGAGA R: GTTATGCGCGCTATGGAAAT	145	58
O-Metil transferase do ácido farnesóico	<i>famet</i>	GB20002	F: ATGCGTGGATTTTGGATAAGAT R: CCACCCCAAGCTACATAACAAA	400	55
Proteína ribossomal 49	<i>rp49</i>	AF441189	F: GCTGGAGAATGGATACCAACACA R: CGTCCCCAAACACTTTCCAA	150	58

Foi analisada a cinética da reação (curva de saturação) para verificar o número de ciclos ideais para cada gene. A densitometria óptica (OD) foi analisada em programa IMVDS (*Image MasterTM VDS Software*, versão 2.0-Pharmacia Bioscience). Os valores obtidos foram submetidos à razão mRNA gene analisado/mRNA *rp49*, para obtenção da expressão relativa de cada gene nos indivíduos analisados.

5.4. Análise por RT-PCR em Tempo Real

A quantificação relativa do mRNA dos genes de interesse foi realizado por RT-PCR Tempo Real (qRT-PCR).

As reações de qRT-PCR foram realizadas simultaneamente para os genes alvo e gene normalizador (*rp49*) em placas de leitura óptica de 96-well, em triplicata. Cada reação continha 1X SYBR Green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystem), 5.0 pmol de cada *primer* específico, 1 µL cDNA em um volume final de 10 µL (completado com água MiliQ).

As reações de PCR foram realizadas em 40 ciclos em ABI 7700 Sequencer Detector (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 50°C por 1 min, 95°C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min.

O C_T foi definido como o primeiro ciclo no qual ocorre um aumento significativo na magnitude do sinal gerado, detectado na reação de qRT-PCR. Os valores do C_T foram calculados pelo *Real-time sequencer detection software* (Applied Biosystems) e foram usados para calcular a expressão do gene de interesse relativo ao mRNA do gene normalizador (*rp49*). Os níveis de expressão foram calculados usando a equação $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Para padronização e análise de eficiência dos *primers* foram feitas reações com diluições seriadas de cDNA: sem diluição; 1:10; 1:100; 1:1000 e construção de curvas de regressão linear para cada par de *primers*. A eficiência da reação foi avaliada pelo valor *slope*, dado pela curva, aplicado à fórmula $E=10^{-1/slope}$ (o valor “E” deve ser próximo a 2).

O *threshold* (limiar) e a *base line* (nível basal) foram ajustados automaticamente pelo sistema. Os valores de C_T foram transformados em valores de quantificação de acordo com *User Bulletin n°. 2 Applied Biosystems*.

A especificidade dos produtos de PCR foi verificada por meio da análise da curva de dissociação de todos os genes, inclusive do gene de controle endógeno *rp49*, garantindo que a amostra não estava contaminada com DNA, pois os *primers* do *rp49* flanqueiam um Intron (Lourenço *et al.*, 2008).

5.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo programa estatístico *GraphPad Prism (Version 5.00)* utilizando análise de variância (ANOVA). Para verificação de possíveis diferenças entre as médias de cada fator a ser estudado, foi utilizado o Teste *t-Student*.

6. Resultados

6.1. Cinética de Reação RT-PCR semiquantitativo para transcritos do gene *hmgr*

As reações de RT-PCR foram feitas em tubos separados, mantendo a mesma proporção de todos os reagentes. Para os genes *rp49* e *hmgr*, o número ideal de ciclos da PCR, para que não houvesse saturação, foi de 27 e 35, respectivamente (Figura 1). Para o gene *famet*, 35 foi o número ideal de reações, de acordo com Vieira *et al.* (2008). Para o *mfe* não foi feita a cinética de reação, já que a quantificação da expressão desse gene foi obtida apenas por qRT-PCR.

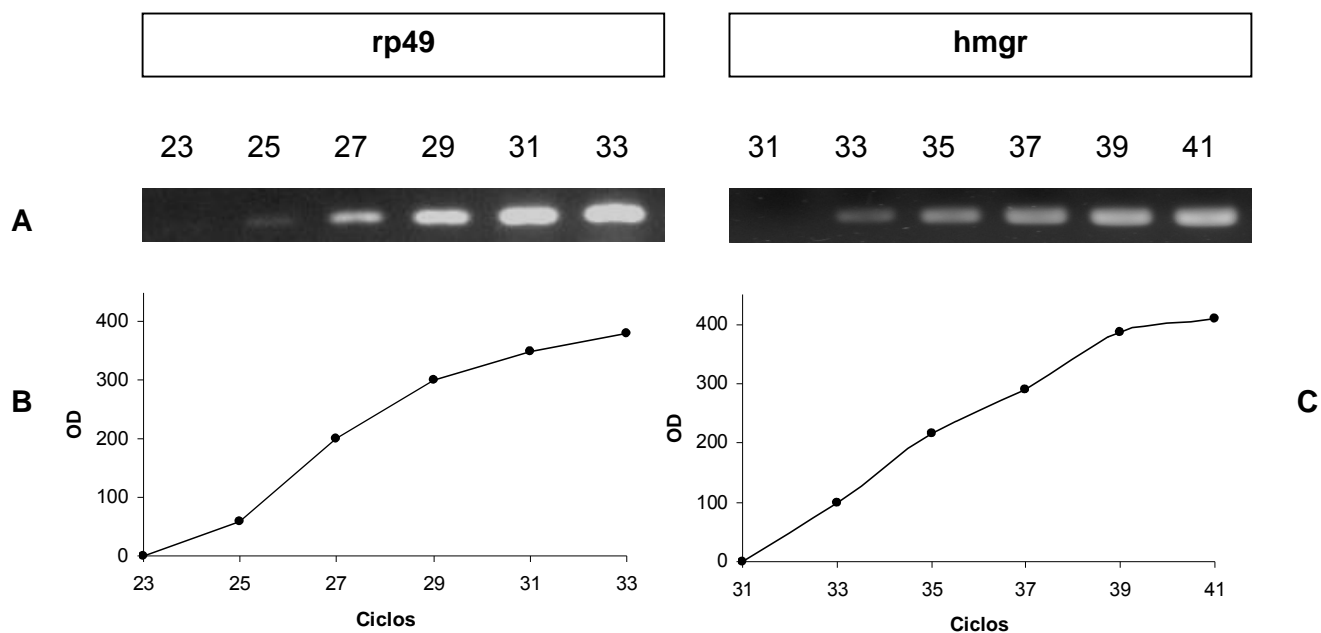


Figura 5: Cinética da amplificação dos genes *rp49* e *hmgr*. **(A)** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. **(B)** Representação gráfica da cinética da reação para *rp49*. **(C)** Representação gráfica da cinética da reação para *hmgr*. OD: Densidade óptica.

6.2. Níveis de transcritos do gene *hmgr* durante o desenvolvimento de *Melipona scutellaris*

Para o cálculo dos níveis relativos de mRNA de *hmgr* foram feitos cinco experimentos independentes de RT-PCR semiquantitativo. O *rp49* foi utilizado como gene de controle endógeno. As mesmas amostras foram submetidas a análises por qRT-PCR.

Verificou-se a expressão de transcritos de *hmgr* em vários estágios analisados ao longo do desenvolvimento de *M. scutellaris*, com flutuações entre as fases e castas, segundo análises por qRT-PCR.

Em larvas (Figura 6) houve diferença estatística significativa da média da expressão de *hmgr* entre as larvas L2 e larvas dos estágios L3-3, LPD e LD, mostrando diminuição da expressão desse gene no último instar larval.

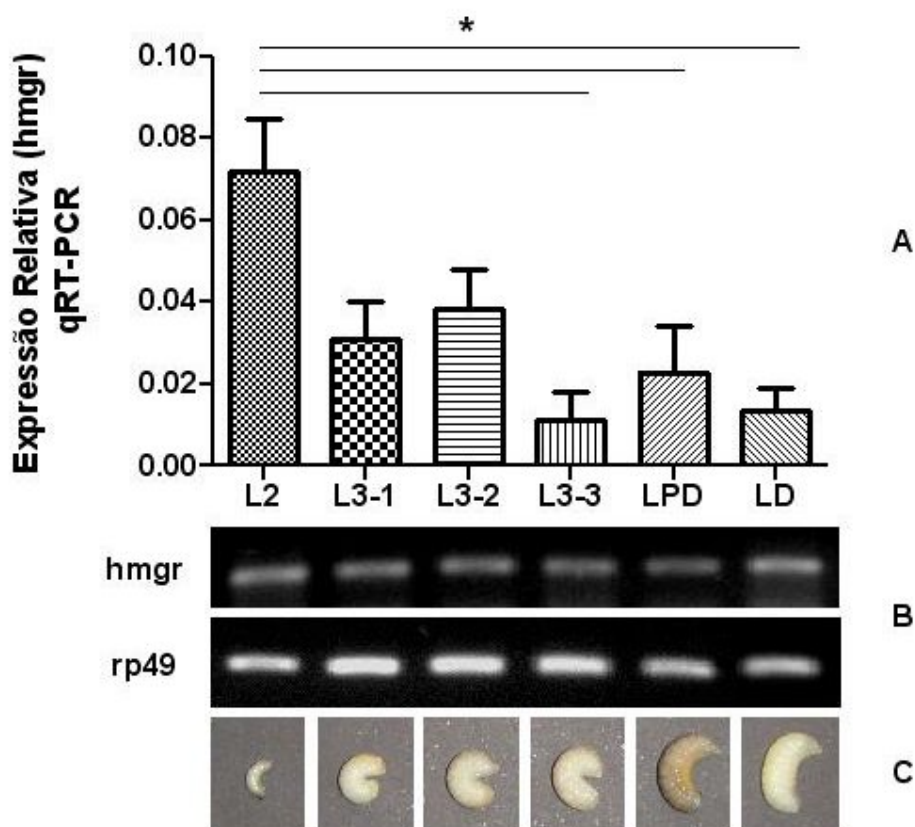


Figura 6: Quantificação dos níveis de transcritos do gene *hmgr* em larvas de *M. scutellaris*. **(A)** Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa do gene obtida por qRT-PCR. **(B)** RT-PCR semiquantitativo do transcrito do gene *hmgr* e do gene de controle endógeno *rp49*. **(C)** Fases do desenvolvimento analisadas: L2 (Larva 2), L3-1 (Larva 3 estágio 1), L3-2 (Larva 3 estágio 2), L3-3 (Larva 3 estágio 3), LPD (Larva Pré-Defecante) e LD (Larva Defecante). Asterisco (*) indica diferença estatística significativa (t-Student; $p < 0,05$).

Pupas de rainhas (Figura 7) também mostraram transcritos do gene *hmgr*. Por meio de análises de RT-PCR semiquantitativo e qRT-PCR, verificamos que a expressão desse gene diminui ao longo do desenvolvimento de pupa de rainhas. Em pupas de operárias não se verificou a presença de transcritos de *hmgr*.

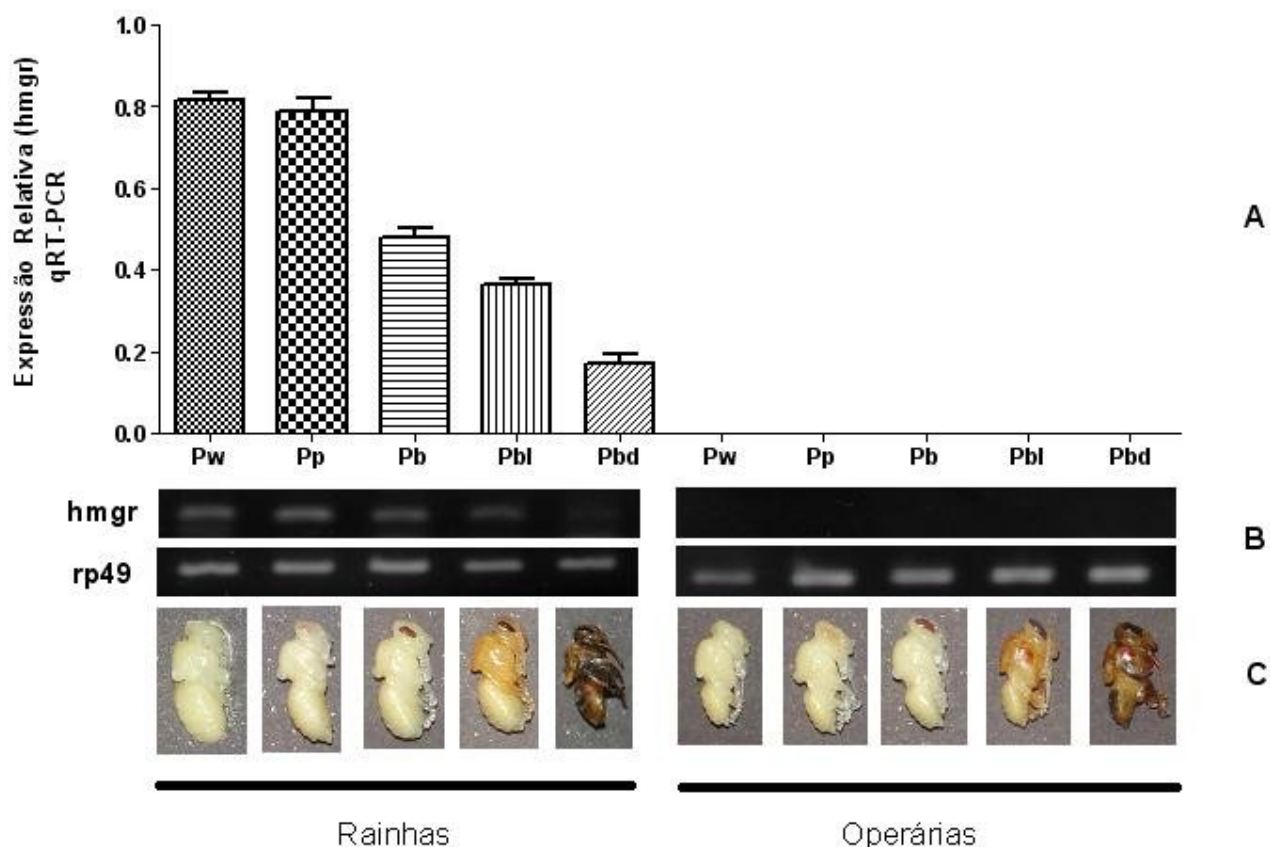


Figura 7: Quantificação dos níveis de transcritos do gene *hmgr* durante o estágio de pupa de rainhas e operárias de *M. scutellaris*. **(A)** Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa do gene obtida qRT-PCR. **(B)** RT-PCR semiquantitativo do transcrito do gene *hmgr* e do gene de controle endógeno *rp49*. **(C)** Fases do desenvolvimento analisadas: Pw (Pupa de olho branco), Pp (Pupa de olho rosa), Pb (Pupa de olho marrom), Pbl (Pupa de olho marrom pigmentação leve), Ppd (Pupa de olho marrom pigmentação forte). As médias encontradas para as pupas de rainha apresentaram diferença estatística significativa, exceto entre Pw e Pp (t-Student; $p < 0,05$).

Em adultos (Figura 8) houve aumento da expressão de transcritos de *hmgr* ao longo da vida de operárias. A comparação de operárias recém-emergidas, nutridoras e forrageiras mostra aumento progressivo da expressão dos transcritos desse gene. Não houve diferença significativa na expressão de *hmgr* entre operárias recém-emergidas e rainhas recém-emergidas (Figura 9).

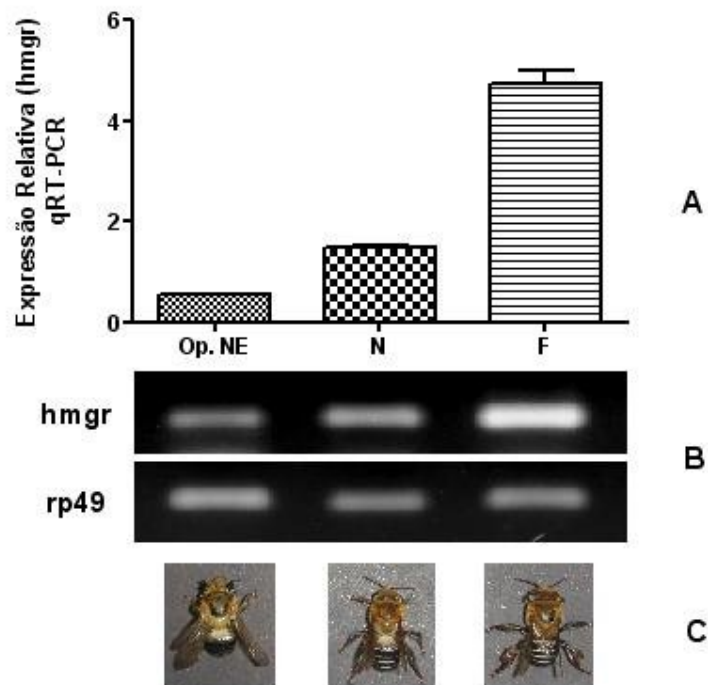


Figura 8: Quantificação dos níveis de transcritos do gene *hmgr* em operárias adultas de *M. scutellaris*. **(A)** Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa do gene obtida por qRT-PCR. **(B)** RT-PCR semiquantitativo do transcrito do gene *hmgr* e do gene de controle endógeno *rp49*. **(C)** Fases do desenvolvimento analisadas: Op. NE (Operária recém-emergida), N (Nurse) e F (Forrageira). Houve diferença estatística significativa entre todas as fases analisadas (t-Student; $p < 0,05$).

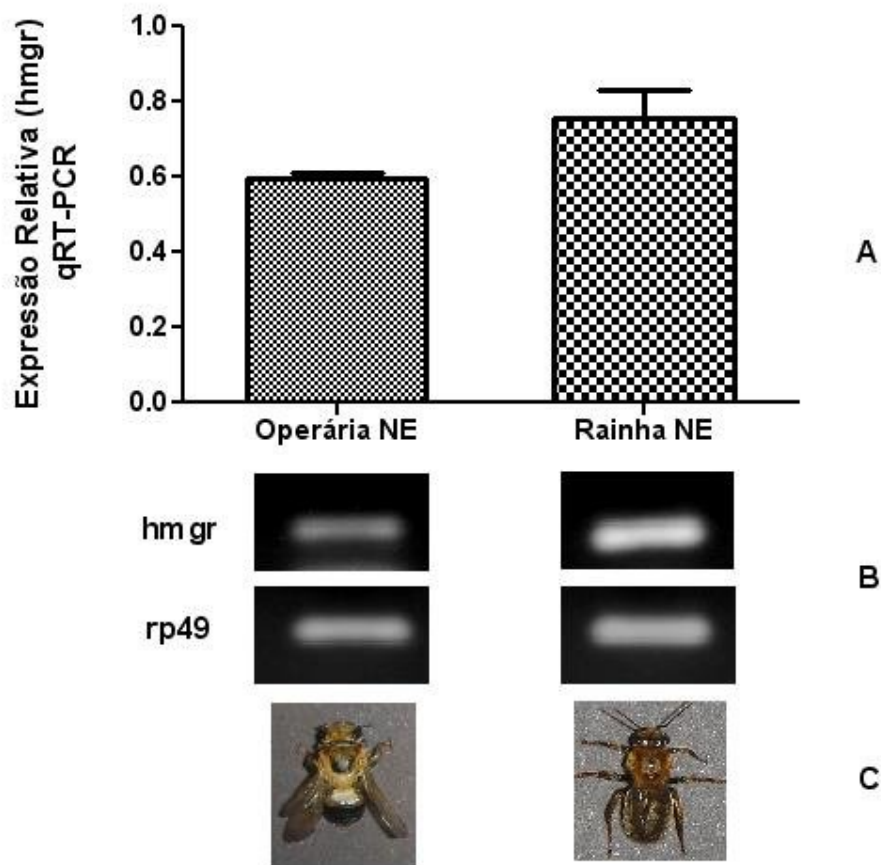


Figura 9: Quantificação dos níveis de transcritos do gene *hmgr* em rainha e operária recém-emergidas de *M. scutellaris*. **(A)** Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa do gene obtida por qRT-PCR. **(B)** RT-PCR semiquantitativo do transcrito do gene *hmgr* e do gene de controle endógeno *rp49*. **(C)** Castas de *Melipona*: Operária NE (Operária recém-emergida), Rainha NE (Rainha recém-emergida).

6.3. Níveis de transcritos do gene *mfe* em abelhas adultas de *Melipona scutellaris*

Para o gene *mfe* foram feitas análises por qRT-PCR em indivíduos adultos. Em operárias adultas (Figura 10A), houve aumento da expressão do gene *mfe* durante o desenvolvimento dos indivíduos. A comparação de operárias recém-emergidas e rainhas recém-emergidas mostrou maior expressão do gene *mfe* em

rainhas recém-emergidas (Figura 10B), diferente do que foi observado para transcritos do gene *hmgr*, onde não se detectou diferença significativa entre as castas.

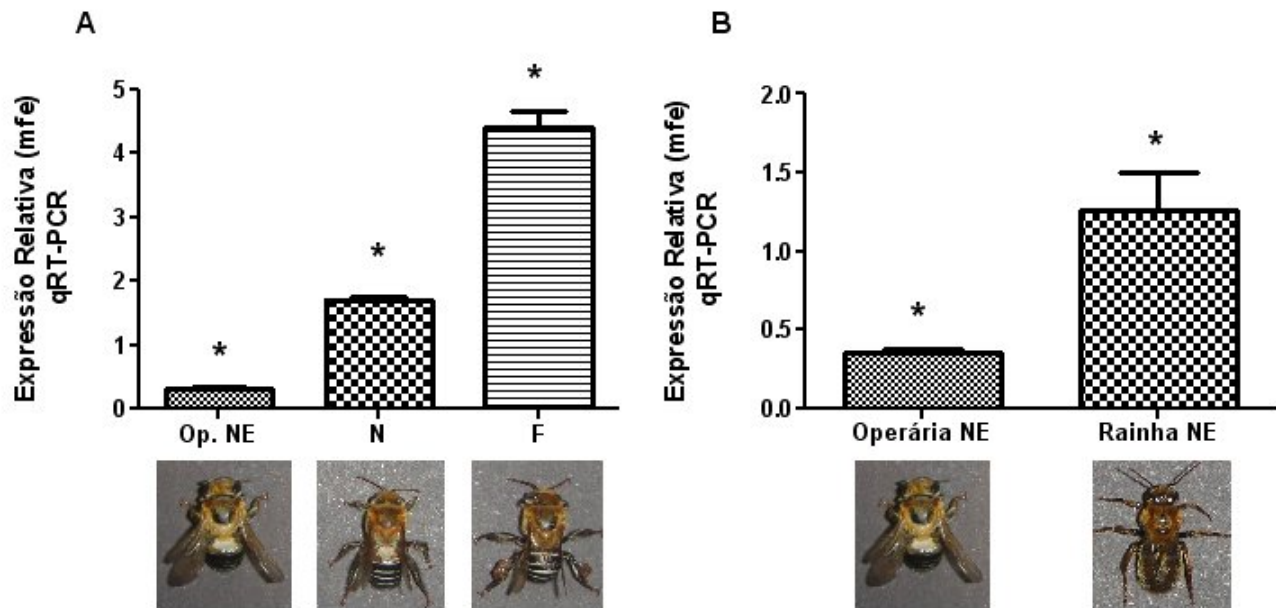


Figura 10: Quantificação dos níveis de transcritos do gene *mfe* em abelhas adultas de *M. scutellaris*. **(A)** Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa do gene obtida por qRT-PCR para Op. NE (operária recém-emergida), N. (Nurse) e F (Forrageira). **(B)** Representação gráfica da quantificação relativa do gene obtida por qRT-PCR para Operária NE (operária recém-emergida) e Rainha NE (rainha recém-emergida). Asteriscos (*) indicam diferença estatística significativa (t-Student; $p < 0,05$).

6.4. Expressão tecido - específica dos genes *hmgr* e *mfe*

A análise da expressão tecido-específica de transcritos de *hmgr* e *mfe* foi realizada em amostras de *corpora allata*, corpo gorduroso, ovário, cérebro e intestino. Todos os tecidos foram coletados de operárias forrageiras, fase em que se verificou mais alta expressão de ambos os genes, na análise anterior. O

objetivo da análise tecido-específica foi comparar a expressão desses genes nos *corpora allata* e outros tecidos, o que poderia indicar que realmente esses genes estão relacionados à síntese de hormônio juvenil nos *corpora allata*.

O gene *hmgr* apresentou transcritos em três tecidos, com expressão significativamente maior em *corpora allata* (Figura 11A). Os transcritos do gene *mfe* (Figura 11B) apresentaram expressão apenas nos *corpora allata*.

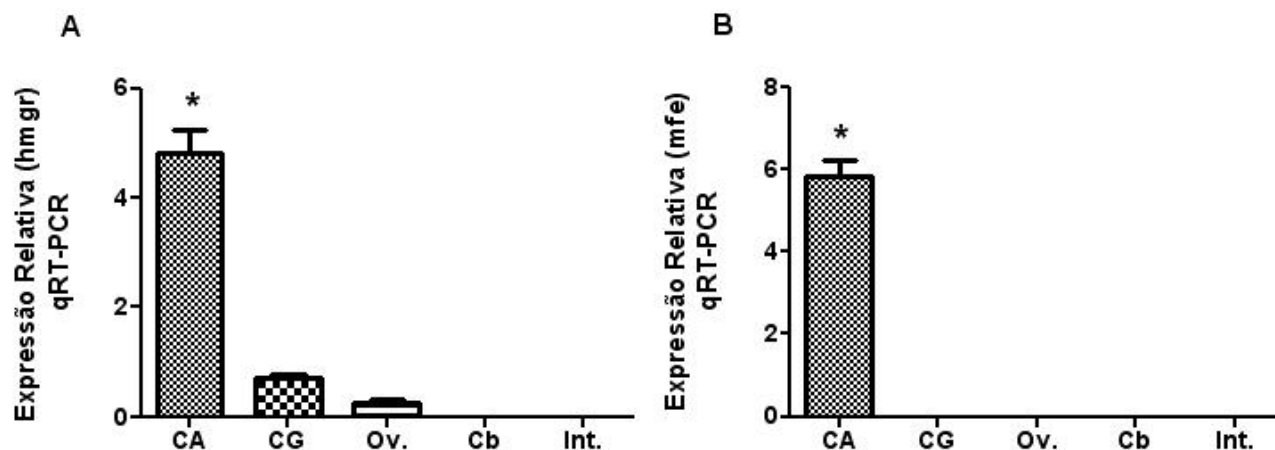


Figura 11: Quantificação dos níveis de transcritos tecido - específicos dos genes *hmgr* e *mfe* em operárias forrageiras de *M. scutellaris*. **(A)** Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa do gene *hmgr* obtida por qRT-PCR. **(B)** Representação gráfica da quantificação relativa do gene *mfe* obtida por qRT-PCR. Tecidos analisados: CA (*corpora allata*), CG (corpo gorduroso), Ov (Ovário), Cb (Cérebro) e Int (Intestino) de forrageiras. Asteriscos (*) indicam diferença estatística significativa (t-Student; $p < 0,05$).

6.5. Níveis de transcritos do gene *famet* em larvas e adultos de *Melipona scutellaris*

A análise da expressão relativa do gene *famet* foi realizada em larvas e operárias adultas de *M. scutellaris*, visto que nosso grupo de pesquisa já possui dados publicados para pupas de operárias e rainhas (Vieira *et al.*, 2008).

No período larval (Figura 12), por meio de RT-PCR semiquantitativo, observamos expressão constitutiva das duas isoformas da FAMEt - FAMEt 1

FAMeT 2 - em todos os estágios larvais, exceto em L2. Em operárias adultas (Figura 13), não houve variação detectável na expressão de ambas isoformas.

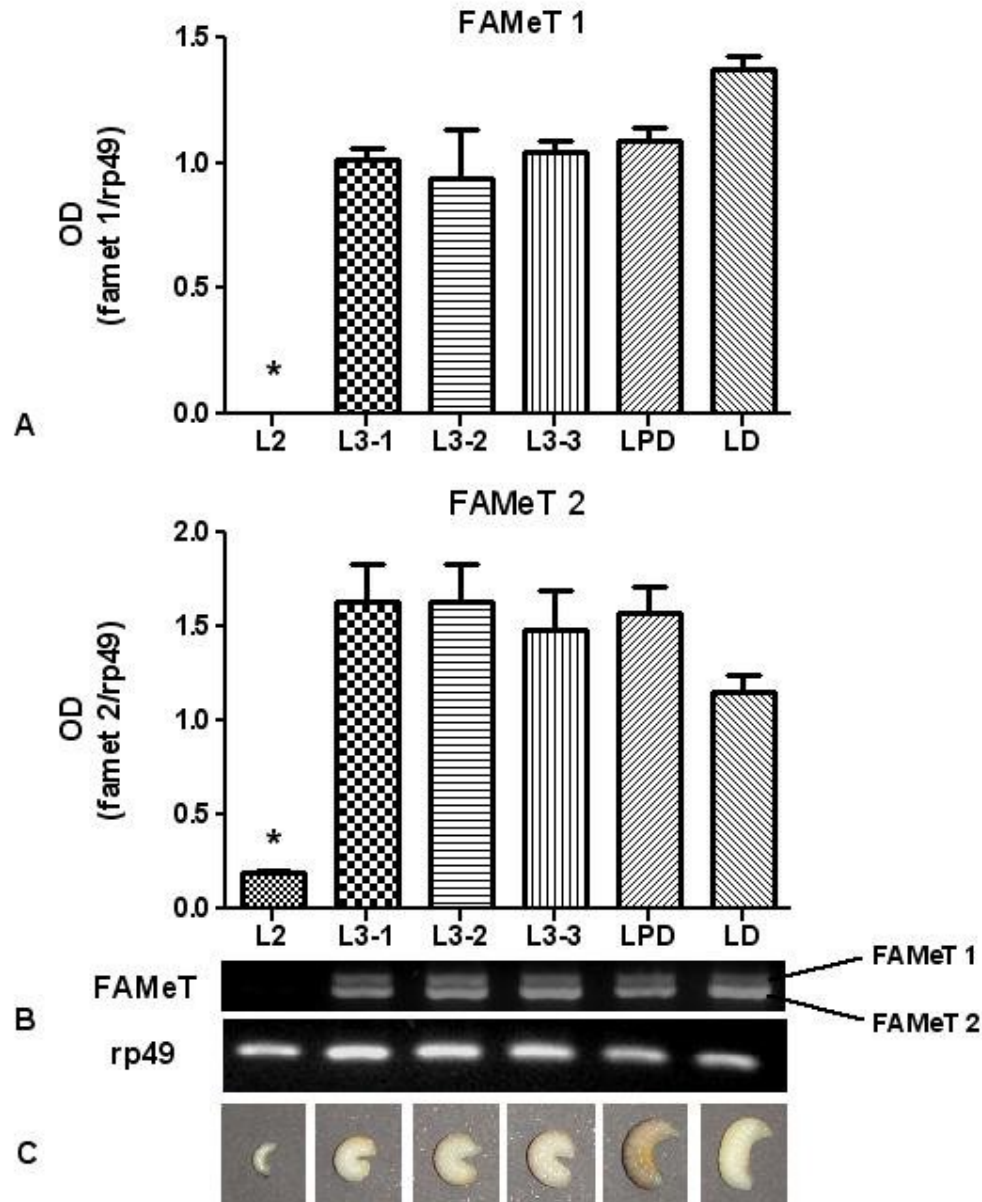


Figura 12: Quantificação dos níveis de transcritos das isoformas 1 (FAMeT 1) e 2 (FAMeT 2) do gene *fam et* durante o estágio larval de *M. scutellaris* por RT-PCR semiquantitativo. **(A)** Representação gráfica (média e desvio padrão) da densidade óptica (OD) das isoformas 1 e 2 do FAMeT. **(B)** RT-PCR semiquantitativo dos transcritos do gene *fam et* e do gene de controle endógeno *rp49*. **(C)** Fases do desenvolvimento analisadas: L2 (Larva 2), L3-1 (Larva 3 estágio 1), L3-2 (Larva 3 estágio 2), L3-3 (Larva 3 estágio 3), LPD (Larva pré-defecante) e LD (Larva defecante). Asteriscos (*) indicam diferença estatística. (t-Student; $p < 0,05$).

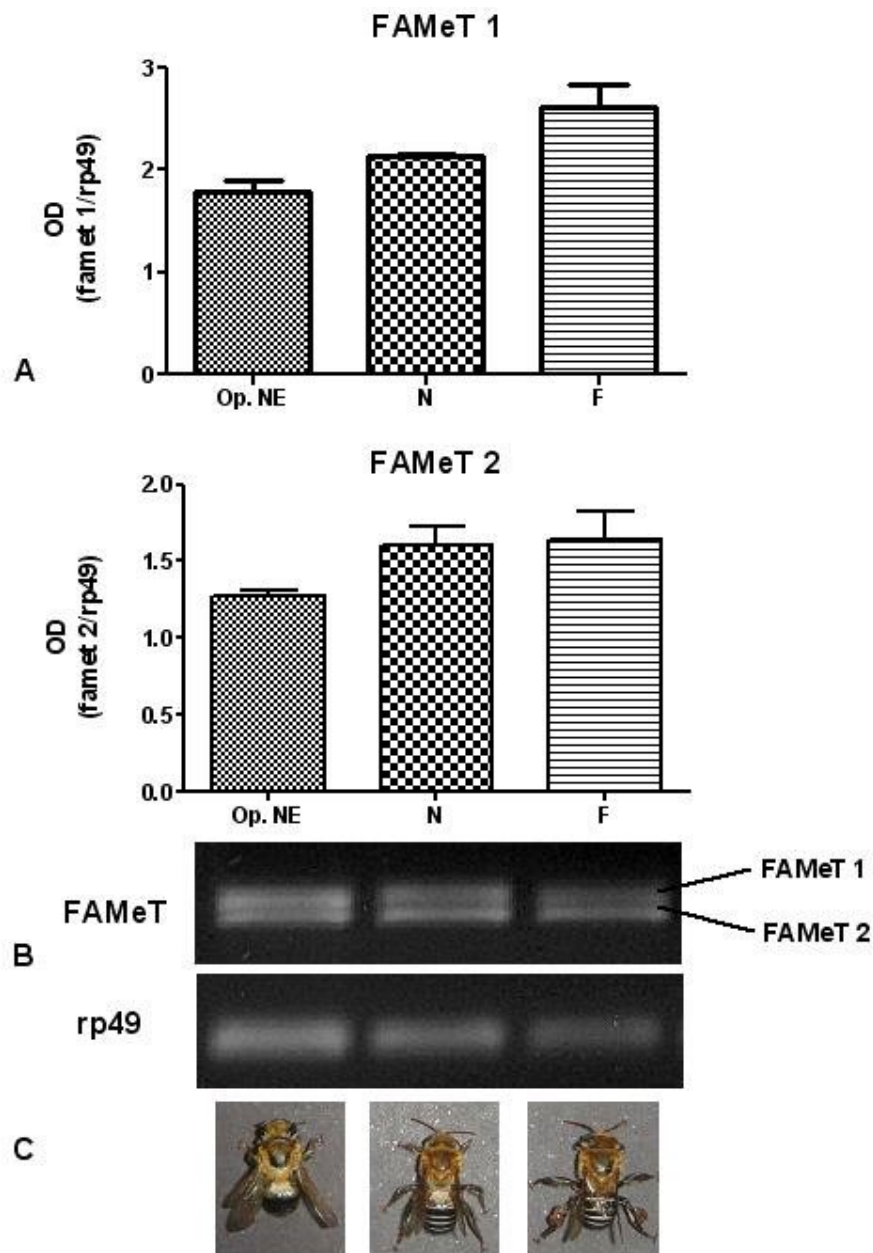


Figura 13: Quantificação dos níveis de transcritos das isoformas 1 (FAMeT 1) e 2 (FAMeT 2) do gene *fam et* em operárias adultas de *M. scutellaris* por RT-PCR semiquantitativo. **(A)** Representação gráfica (média e desvio padrão) da densidade óptica (OD) das isoformas 1 e 2 do FAMeT. **(B)** RT-PCR semiquantitativo dos transcritos do gene *fam et* e do gene de controle endógeno *rp49*. **(C)** Fases do desenvolvimento analisadas: Op. NE (Operária recém-emergida), N (Nutridora) e F (Forrageira).

7. Discussão

A divergência entre as castas, rainhas e operárias de *Melipona* pode ser resultado de modulação casta – específica dos títulos de hormônio juvenil (HJ) e ecdisteróides durante o desenvolvimento larval (Hepperle & Hartfelder, 2001).

A importância do HJ na morfogênese, síntese protéica, reprodução, polietismo etário, diferenciação de castas em insetos tem sido demonstrada em muitas investigações (Beetsma, 1979; Campos, 1979; Nijhout & Wheeler, 1982; Bonetti, 1984; Bonetti *et al.*, 1994, 1995, 2006; Hartfelder & Engels, 1998; Barchuk *et al.*, 2007)

Na via do mevalonato a biossíntese do HJ apresenta similaridade para insetos e vertebrados (Bellés *et al.*, 2005) nos passos que vão de acetil-CoA até a formação de farnesil difosfato, diferindo após isso, na produção de colesterol nos vertebrados e HJ nos insetos.

Fazem parte dessa via as enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGR), metil-farnesoato epoxidase do Hormônio Juvenil (MFE) e O-metil transferase do ácido farnesóico (FAMeT), que analisamos em *Melipona scutellaris*, onde o HJ parece ser o principal agente desencadeador da expressão de genes casta – específicos.

Pesquisas têm mostrado que a HMGR pode não ser enzima chave para regulação da produção de HJ (Bellés *et al.*, 2005). Entretanto, um estudo mostrou que a HMGR pode ser alvo da via da insulina nos *corpora allata* em *D. melanogaster* (Belgacem & Martim, 2007), abrindo novas possibilidades dessa enzima ser um fator regulatório na via de síntese do HJ.

Nossos resultados não mostraram diferença significativa nos níveis dos transcritos do gene codificador da enzima HMGR em rainhas e operárias recém-emergidas, mas aponta um papel dessa enzima no polietismo etário com aumento da expressão dos transcritos de operárias recém-emergidas até forrageiras. Nos *corpora allata* de *M. scutellaris*, os transcritos do gene codificador da HMGR foram significativamente expressos, seguido do corpo gorduroso, que mostrou baixa expressão. A expressão de altos níveis de transcritos da HMGR nos *corpora allata* pode indicar papel dessa enzima na biossíntese do HJ em *M. scutellaris*.

Em *B. germanica*, a atividade das enzimas HMG-CoA sintase (HMGS) e HMGR variaram mais do que 10 vezes nos *corpora allata* e no corpo gorduroso, sendo que o pico de atividade dessas enzimas foi correlacionado com níveis máximos de HJ nos *corpora allata* e vitelogenina no corpo gorduroso (Casals *et al.*, 1996).

Em *A. mellifera*, Robinson (1992) mostrou que os títulos de HJ e polietismo etário estão intimamente ligados. Para *A. mellifera*, o aumento dos níveis de HJ está relacionado ao desenvolvimento das funções das operárias na colméia e o título de HJ aumenta significativamente com a mudança de função de nutridora (atividade interna) para a função de forrageira (atividade externa). Altos níveis de HJ na hemolinfa estão associados a períodos de atividade de vôo em rainhas, operárias e zangões, com a diferença de que em rainhas e zangões esse período ocorre mais cedo e está relacionado ao acasalamento, enquanto que em operárias o vôo se inicia mais tarde e está relacionado às atividades de forrageamento (Tozetto *et al.*, 1997).

Para *M. quadrifasciata*, também, há aumento nos níveis de HJ com a mudança de função das operárias. Diferenças estatísticas de títulos de HJ são observadas quando comparadas operárias recém-emergidas com nutridoras e recém-emergidas com forrageiras. Esse aumento, entretanto, não é estatisticamente significativo quando comparadas nutridoras e forrageiras (Santana, 2002).

Santana (2007) sugere que os títulos de HJ não estejam inteiramente envolvidos na divisão do trabalho em *M. quadrifasciata*, como em operárias de *A. mellifera*, sugerindo que o modulador do comportamento em *M. quadrifasciata* seja o título de vitelogenina na hemolinfa, já que títulos maiores dessa proteína na hemolinfa estão relacionados a ovários ativos e tarefas de nutridoras, enquanto títulos menores estão relacionados a ovários inativos (forrageiras) ou em início de ativação (recém-emergidas).

Em *A. mellifera*, os níveis de HJ na hemolinfa aumentam concomitantemente com o desenvolvimento das operárias adultas (Robinson & Vargo, 1997). Em *M. scutellaris*, apesar de termos detectado aumento de expressão dos transcritos do gene *hmgr* à medida que a idade das operárias aumenta, de recém-emergidas a

forrageiras, não podemos concluir sobre sua correlação com títulos de HJ, pois, ainda não há quantificação dos títulos de HJ em *M. scutellaris*.

Em pupas de operárias de *M. scutellaris* não se detectou transcritos de *hmgr*, o que corrobora com os níveis basais de HJ na hemolinfa de *Apis mellifera* (10 ng/ml, Elekonich *et al.*, 2003) e de *Scaptotrigona postica* (Hartfelder & Rembold, 1991) nesse estágio de desenvolvimento. Em pupas de rainhas de *M. scutellaris* foram observados níveis decrescentes da enzima HMGR desde pupa de corpo branco, olho branco até pupa de corpo fortemente pigmentado. Segundo Bellés *et al.*, (2005) o declínio nos níveis de HJ antecede o declínio enzimático da HMGR e, se considerarmos isso, é possível fazer a hipótese de atividade de síntese de HJ em pupas de rainhas, onde se detecta, ainda, transcritos de *hmgr*.

Bonetti *et al.* (2006) encontraram sinais que podem indicar atividade sintética de HJ nos *corpora allata* de pupas de ambas as castas de *Melipona quadrifasciata*.

Outra enzima que analisamos, em abelhas adultas e tecidos diferentes, foi a metil farnesoato epoxidase do hormônio juvenil (MFE) que catalisa o último passo da via mevalonato, na reação de metil farnesoato a HJ. Os resultados mostraram expressão significativamente maior da MFE em rainhas recém-emergidas do que em operárias recém-nascidas. Nessas últimas, ainda, os níveis dos transcritos do *mfe* foram significativamente menores do que em operárias nutridoras e forrageiras.

Transcritos do gene *mfe* foram encontrados apenas nos *corpora allata* de *M. scutellaris*, não havendo expressão detectável desse gene nos demais tecidos analisados (corpo gorduroso, ovário, cérebro e intestino), fortalecendo a hipótese de ser a MFE candidata à enzima limitante na via de síntese de HJ. Santos (2008) também encontrou transcrição exclusiva do gene da MFE nos *corpora allata* de *A. mellifera*. Helvig *et al.* (2004) sugerem, também, a expressão seletiva do gene *mfe* nos *corpora allata* de *D. punctata*.

O fato do gene codificador da MFE ser significativamente mais expresso em rainhas recém-emergidas do que em operárias recém-emergidas de *M. scutellaris* reforça os resultados da análise tecido-específica.

Esses resultados obtidos em *M. scutellaris*, para os transcritos do gene codificador da MFE, permitem sugerir a hipótese de que essa enzima esteja

relacionada à via de síntese do HJ nos *corpora allata*, podendo apresentar um papel regulatório nessa via.

Não podemos descartar, contudo, que os genes da via de síntese de HJ sejam ligados ou desligados em momentos específicos, devido à resposta dos *corpora allata* aos controles inibitórios e estimulatórios dos neuropeptídeos alarstatinas e alarotropinas, respectivamente. Não são os passos enzimáticos limitantes que regulam, por si só, a produção de HJ; esse controle vem sendo estudado em insetos (Gilbert *et al.*, 2000; Kelling *et al.*, 2004). Em *A. mellifera*, Rachinsky e Feldauer (2000) mostraram que o peptídeo sintético Manse-AT estimula os *corpora allata*, *in vitro*.

Bonetti *et al.* (1995) verificaram a produção de rainhas a partir de larvas de operárias de *Melipona* por meio da aplicação tópica de HJ, sugerindo que o título de HJ ativa uma cascata gênica que regula processos de determinação e diferenciação de castas, nos quais as enzimas HMGR e MFE parecem estar envolvidas.

A expressão dos transcritos do gene *hmgr* para pupas de rainhas de *M. scutellaris* mostra diminuição gradativa ao longo do estágio pupal. Nos insetos em geral os títulos de HJ em pupas são, frequentemente, basais.

Comparando-se a expressão da HMGR em pupas de rainhas de *M. scutellaris* com os títulos de ecdisteróides na hemolinfa de pupas de rainhas de *M. quadrifasciata* (Pinto *et al.*, 2002) verifica-se que há correlação, ocorrendo simultaneamente aumento nos títulos de ecdisteróides e diminuição da expressão de *hmgr* no início do desenvolvimento (Figura 14). Nossos resultados para os níveis dos transcritos de *hmgr* em *M. scutellaris* corroboram com dados encontrados em *S. postica*, na qual os títulos de ecdisteróides começam aumentar após os títulos de HJ terem declinado a níveis mínimos (Hartfelder & Rembold, 1991) e isso pode apoiar a hipótese de que a expressão desse gene esteja relacionada à produção de HJ em *M. scutellaris*.

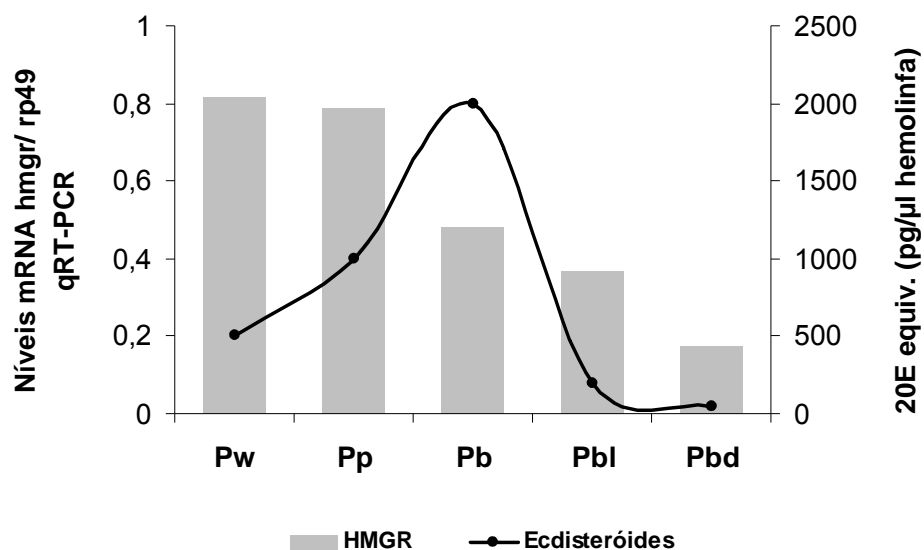


Figura 14: Comparação dos títulos de ecdisteróides de pupas de rainhas de *Melipona quadrifasciata* com a expressão do gene *hmgr* de pupas de rainhas de *Melipona scutellaris* por qRT-PCR. A titulação de ecdisteróides em *Melipona quadrifasciata* foi feita por Pinto *et al.* (2002). Pw (Pupa de olho branco), Pp (Pupa de olho rosa), Pb (Pupa de olho marrom), Pbl (Pupa de olho marrom pigmentação leve), Ppd (Pupa de olho marrom pigmentação forte).

Analisando-se a expressão dos genes *hmgr* e *mfe* em operárias adultas de *M. scutellaris*, observamos aumento na expressão de ambos acompanhando o aumento da idade das operárias e, provavelmente, isso esteja relacionado ao aumento nos níveis de HJ. Se compararmos os níveis dos transcritos dos genes *hmgr* e *mfe* em *M. scutellaris* (presente trabalho) com os títulos de ecdisteróides de *M. quadrifasciata* (Hartfelder *et al.*, 2002) e considerarmos que os títulos de HJ estejam inversamente correlacionados com os de ecdisteróides, então, podemos deduzir que em indivíduos adultos de *Melipona*, os níveis de HJ aumentam à medida que os títulos de ecdisteróides diminuem (Figura 15).

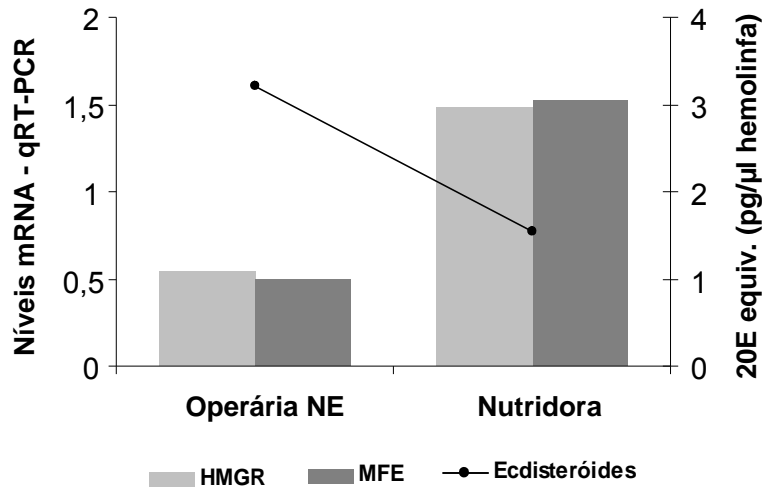


Figura 15: Comparação dos títulos de ecdisteróides de operárias de *Melipona quadrifasciata* com a expressão dos genes *hmgr* e *mfe* de operárias de *Melipona scutellaris* por qRT-PCR. A titulação de ecdisteróides em *Melipona quadrifasciata* foi feita por Hartfelder *et al.* (2002). Operária NE (operária recém-emergida – 1 dia de vida) e Nutridora (10 a 14 dias de vida).

Santana (2002) observou, para *M. quadrifasciata*, aumento nos títulos de HJ em operárias com idades entre 5 e 9 dias acompanhado de um decréscimo nos valores de ecdisteróides. Com base nisso, o autor propõe uma inter-regulação entre estes dois hormônios na fase adulta de *M. quadrifasciata*.

Outra enzima alvo de estudo desse trabalho foi a O-metil transferase do ácido farnesóico (FAMeT), que catalisa a metilação do ácido farnesóico, produzindo metil farnesoato, o precursor do HJ. Evidências em outros insetos sugerem que a FAMeT é uma enzima limitante no processo de síntese do HJ e é regulada por neuropeptídeos da família alatostatina (Yagi *et al.*, 1991). Essa enzima parece participar não só da metilação do ácido farnesóico, mas de inúmeros outros substratos (Burtenshaw *et al.*, 2008).

Vieira *et al.* (2008) encontraram, em *M. scutellaris*, um *splicing* alternativo para a FAMeT, no qual um micro-exon de 27 nucleotídeos foi responsável pela formação de duas isoformas de FAMeT, a MsFAMeT 1 e a MsFAMeT 2. Os autores sugerem que apenas a isoforma MsFAMeT 2 esteja associada à via de

síntese do HJ, baseado no fato de que o tratamento tópico de larvas dessa abelha com HJ III, inibe a expressão dessa isoforma. Em pupas, Vieira *et al.* (2008) detectaram a presença de ambas as isoformas ao longo do desenvolvimento de pupas de rainhas e operárias, com flutuações significativas de expressão, entre as castas.

Em larvas dessa espécie, também observamos presença da MsFAMeT 1 e da MsFAMeT 2 em todos os estágios, com exceção da isoforma 1 no estágio L2. Não observamos variação na expressão das isoformas nos outros estágios larvais. Em adultos, a expressão das duas isoformas da FAMeT parece, também, ser constitutiva, não variando significativamente entre operárias adultas de diferentes idades.

Esses resultados encontrados para a FAMeT não nos permitem associar essa enzima com a via de síntese de HJ em *M. scutellaris*. Isso corrobora com Gunawardene *et al.* (2002) e Burtenshaw *et al.* (2008) que especulam a possibilidade da FAMeT metilar vários outros substratos além do ácido farnesóico da via de síntese do HJ.

Em *D. melanogaster*, Burtenshaw *et al.* (2008) sugeriram que a FAMeT tem pouco ou nenhum papel na biossíntese de sesquiterpenóides. Em experimentos envolvendo a mosca-das-frutas, os autores compararam cepas com deficiência ou diminuição na produção da enzima FAMeT com cepas normais para produção dessa enzima e não observaram diminuições significativas na síntese de metil farnesoato e de HJ em cepas deficientes para a produção da FAMeT. Com isso, os autores levantaram a hipótese dessa enzima não apresentar função direta na via de síntese do HJ.

Diferente do que encontramos para a FAMeT, as enzimas HMGR e MFE em *M. scutellaris* parecem estar, de fato, envolvidas com a via de síntese de HJ, sendo a MFE a candidata à enzima limitante dessa via.

8. Conclusões

A análise da expressão dos transcritos dos genes codificadores das enzimas 3- hidroxil-3-metilglutaril CoA reductase (HMGR), metil-farnesoato epoxidase do Hormônio Juvenil (MFE) e O-metil transferase do ácido farnesóico (FAMeT) em *Melipona scutellaris* mostrou que:

1. Em larvas

- ocorre expressão de transcritos do gene codificador da enzima HMGR em todos os estágios de Larva (L2, L3, L3-1, L3-2, L3-3, LPD e LD), com expressão significativamente maior em L2; não foi analisado o estágio L1;
- são detectados transcritos do gene codificador da FAMeT (isoformas FAMeT 1 e FAMeT 2) em todos os estágios analisados, com exceção da isoforma FAMeT 2 em L2.

2. Em pupas

- observou-se transcritos de *hmgr* em todos os estágios de pupas (Pw, Pp, Pb, Pbl e Pbd) de rainhas e não detecção em pupas de operárias.

3. Em adultos

- ocorre expressão de transcritos do gene codificador de HMGR em operárias recém-emergidas, nutridoras (*Nurse*) e forrageiras, com níveis diferentes entre elas e maior expressão em forrageiras. Entre rainhas e operárias recém-emergidas não há diferença para os transcritos da HMGR;
- os níveis dos transcritos do gene codificador de metil-farnesoato epoxidase do hormônio juvenil (MFE) são significativamente mais altos em rainhas do que em operárias recém-emergidas;

- os níveis de transcritos relativos à enzima FAMeT não mostraram diferenças entre operárias recém-emergidas, nutridoras e forrageiras, para ambas isoformas da enzima (FAMeT 1 e FAMeT 2).

4. Em tecidos específicos

- a análise da expressão tecido-específica dos genes codificadores de HMGR e MFE em *M. scutellaris* mostrou que o gene codificador de HMGR é expresso em *corpora allata*, corpo gorduroso e ovários, apresentando níveis de transcritos significativamente maiores nos *corpora allata* e o gene *mfe* apresenta expressão exclusiva nos *corpora allata*.

9. Conclusões gerais

- As características de expressão encontradas para o gene codificador da MFE indicam que o passo metabólico catalisado por essa enzima na via de síntese do HJ pode exercer modulação dos níveis de HJ em *M. scutellaris*;

- O padrão de expressão dos transcritos dos genes *mfe* e *hmgr* mostra que esses genes estão relacionados ao polietismo etário em operárias adultas de *M. scutellaris*.

10. Referências Bibliográficas

- Amaral, I.M., Moreira Neto, J.F., Pereira, G.B., Franco, M.B., Beletti, M.E., Kerr, W.E., Bonetti, A.M. & Ueira-Vieira, C. (2010) Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): cell types and their role in phagocytosis. *Micron*, 41, 123-129.
- Amaral, I.M. (2009) *Sistema imune inato em Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Mestrado. INGEB/ UFU – Uberlândia.
- Barchuk, A.R., Cristiano, A.S., Kucharski, R., Costa, L.F., Simões, Z.L.P. & Maleska, R. (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev. Biol*, 7:70.
- Belgacem, Y.H. & Martin, J.R. (2007) Hmger in the corpus allatum controls sexual dimorphism of locomotor activity and body size via the insulin pathway in *Drosophila*. *PLoS One*, 2, e187.
- Bellés, X., Martín, D. & Piulachs, M.D. (2005) The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu Rev Entomol*, 50, 181-199.
- Beetsma, J. (1979) The process of queen-worker differentiation in the honeybee. *Bee World*, 60 (1), 24-39.
- Bonetti, A.M. (1983) Action of Juvenile Hormone on gene expression in *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponidae). *Rev. Bras.de Genética*, 4, 583.
- Bonetti, A.M. (1984) Efeitos do Hormônio Juvenil no desenvolvimento ovariano de *Melipona quadrifasciata*. *Rev. Bras. de Biol*, 4(44), 509-518.
- Bonetti, A.M., Cruz-Landim, C. & Kerr W.E. (1994) Sex determination in bees. XXX. Effects of Juvenile Hormone in development of tergal glands in *Melipona*. *J. Apic. Res.*, 1 (33), 11-14.
- Bonetti, A.M., Kerr W.E. & Matusita, S.H. (1995) Effects of Juvenile Hormone I, II, III in single and fractionated dosage in *Melipona* bees. *Revista Brasileira de Biologia*, 1 (55), 113-120.

- Bonetti, A.M., Siquieroli, A.C.S., Santana, F.A., Vieira, C.U., Bezerra, M., Pereira, G.B., Simões, Z.L.P. & Cruz-Landim, C. da (2006) Effect of Juvenile Hormone III on the ultrastructure of the corpora allata in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sc.: Functional Anatomy and Cell Biol*, 23, 393-400.
- Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1980) Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res*, 21, 505-517.
- Burtenshaw, S.M., Su, P.P., Zhang, J.R., Tobe, S.S., Dayton, L. & Bendena, W.G. (2008) A putative farnesoic acid O-methyltransferase (FAMeT) orthologue in *Drosophila melanogaster* (CG10527): relationship to juvenile hormone biosynthesis? *Peptides*, 29, 242-251.
- Campos, L.A.O. (1979) Determinação do sexo nas abelhas XIII. Determinação das castas em *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae). Papel do Hormônio Juvenil. *Ciência e Cultura*, 31 (1), 65-70.
- Casals, N., Buesa, C., Piulachs, M.D., Cabañó, J., Marrero, P.F., Bellés, X. & Hegardt, F.G. (1996) Coordinated expression and activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and reductase in the fat body of *Blattella germanica* (L.) during vitellogenesis. *Ins. Biochem Mol Biol*, 26, 837-843.
- Dallacqua, R.P., Simões, Z.L.P. & Bitondi, M.M.G. (2007) Vitellogenin gene expression in stingless bee workers differing in egg-laying behavior. *Ins. Soc.*, 54, 70-76.
- Dias, J. das D., Bonetti, A.M. & Kerr, W.E. (2001) Determinação do número de instars larvais em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae). *Naturalia*, 26, 257-263.
- Duportets, L., Belles, X., Rossignol, F. & Couillaud, F. (2000) Molecular cloning and structural analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of the moth *Agrotis ipsilon*. *Insect Mol Biol*, 9, 385-392.
- Elekonich, M.M., Jez, K., Ross, A.J. & Robinson, G.E. (2003) Larval juvenile hormone treatment affects pre-adult development, but not adult age at onset of foraging in worker honey bees (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol*, 49, 359-366.

- Feyereisen, R. (1985) Regulation of juvenile hormone titer: synthesis. In: Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Kerkut, G.A. & Gilbert, L. I., Pergamon Press, Oxford, 8, 391-429.
- Gertler, F.B., Chiu, C.Y., Richter-Mann, L. & Chin, D.J. (1988) Developmental and metabolic regulation of the *Drosophila melanogaster* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol Cell Biol*, 8, 2713-2721.
- Gilbert, L.I. (2005). *Comprehensive Molecular Insect Science*, 7, Volume Set, USA, Elsevier Pergamon. Available online Science Direct (www.info.sciencedirect.com)
- Gilbert, L.I., Granger, N.A. & Roe, R.M. (2000) The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem Mol Biol*, 30, 617-644.
- Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343, 425-430.
- Gunawardene, Y.I., Tobe, S.S., Bendena, W.G., Chow, B.K., Yagi, K.J. & Chan, S.M. (2002) Function and cellular localization of farnesoic acid O-methyltransferase (FAMeT) in the shrimp, *Metapenaeus ensis*. *Eur J Biochem*, 269, 3587-3595.
- Hammock, B.D. (1975) NADPH dependent epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone in the cockroach *Blaberus giganteus* L. *Life Sci*, 17, 323-328.
- Hammock, B.D. (1985) Regulation of juvenile hormone titer: degradation. In: Kerkut, G.A. Gilbert L.I. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 7, Pergamon, Oxford, 431-472.
- Hartfelder, K. & Engels, W. (1998) Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr Top Dev Biol*, 40, 45-77.
- Hartfelder, K. & Rembold, H. (1991) Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of stingless

- bee, *Scaptotrigona postica depilis*. *Journal of Comparative Physiology Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 160, 617-620.
- Hartfelder, K., Bitondi, M.M., Santana, W.C. & Simões, Z.L. (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.
- Helvig, C., Koener, J.F., Unnithan, G.C. & Feyereisen, R. (2004) CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach corpora allata. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4024-4029.
- Hepperle, C. & Hartfelder, K. (2001) Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development. *Naturwissenschaften*, 88, 113-116.
- Holford, K.C., Edwards, K.A., Bendena, W.G., Tobe, S.S., Wang, Z. & Borst, D.W. (2004) Purification and characterization of a mandibular organ protein from the American lobster, *Homarus americanus*: a putative farnesoic acid O-methyltransferase. *Insect Biochem Mol Biol*, 34, 785-798.
- Keeling, C.I., Blomquist, G.J. & Tittiger, C. (2004) Coordinated gene expression for pheromone biosynthesis in the pine engraver beetle, *Ips pini* (Coleoptera: Scolytidae). *Naturwissenschaften*, 91, 324-328.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Lourenço, A.P., Mackert, A., Cristino, A.S. & Simões, Z.L.P. (2008) Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real time RT-PCR. *Apidologie*, 39, 372-385.
- Martinez-Gonzalez, J., Buesa, C., Piulachs, M.D., Belles, X. & Hegardt, F.G. (1993) Molecular cloning, developmental pattern and tissue expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of the cockroach *Blattella germanica*. *Eur J Biochem*, 213, 233-241.
- Nijhout, H.F. (1994) *Insect hormones*. Princeton University Press.

- Nijhout, H.F. & Wheeler, D.E. (1982). Juvenile Hormone and the physiological basis of insect polymorphism. *The Quart Rev of Biol*, 57 (2), 109-133.
- Pinto, L.Z., Hartfelder, K., Bitondi, M.M. & 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.
- Rachinsky, A. & Feldlaufer, M.F. (2000) Responsiveness of honey bee (*Apis mellifera* L.) corpora allata to allatoregulatory peptides from four insect species. *J Insect Physiol*, 46, 41-46.
- Robinson, G.E. & Vargo, E.L. (1997) Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Arch Insect Biochem Physiol*, 35, 559-583.
- Robinson, G.E. (1992) Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Entomol*, 37, 637-665.
- Roe, R.M. & Venkatesh, K. (1990) Metabolism of juvenile hormones: degradation and titer regulation. In: Rutgers, G.A. *Morphogenetic Hormones of Arthropods*, 1, University Press, New Brunswick, 126-179.
- Rossini, S.A. (1989) *Caracterização das mudas ontogenéticas e biometria dos corpora allata de Melipona quadrifasciata anthidioides LEP (Hymenoptera, Apidae)*. Mestrado. Unesp/ Rio Claro-SP, 120 p.
- Ruddell, C.J., Wainwright, G., Geffen, A., White, M.R., Webster, S.G. & Rees, H.H. (2003) Cloning, characterization, and developmental expression of a putative farnesoic acid O-methyl transferase in the female edible crab *Cancer pagurus*. *Biol Bull*, 205, 308-318.
- Santana, W. C. (2002) *Hormônio juvenil e ecdisteróides na vida adulta de machos, rainhas e operárias de Melipona quadrifasciata Lep. (Apidae, Meliponinae): Relação com reprodução e divisão de trabalho*. Mestrado. FMRP/ USP – Ribeirão Preto.
- Santana, W. C. (2007) *Papel do sistema endócrino na reprodução e divisão de trabalho em operárias de Melipona quadrifasciata (Apidae: Meliponinae)*. Tese de Doutorado. FMRP/ USP – Ribeirão Preto.

- Santos, A.M. (2008) *Biologia Molecular dos genes envolvidos no metabolismo do hormônio juvenil em Apis mellifera*. Tese Doutorado. FMRP/ USP -. Ribeirão Preto.
- Silva Gunawardene, Y.I., Bendena, W.G., Tobe, S.S. & Chan, S.M. (2003) Comparative immunohistochemistry and cellular distribution of farnesoic acid O-methyltransferase in the shrimp and the crayfish. *Peptides*, 24, 1591-1597.
- Silva Gunawardene, Y.I., Chow, B.K., He, J.G. & Chan, S.M. (2001) The shrimp FAMeT cDNA is encoded for a putative enzyme involved in the methylfarnesoate (MF) biosynthetic pathway and is temporally expressed in the eyestalk of different sexes. *Insect Biochem Mol Biol*, 31, 1115-1124.
- Taylor, P.A., Bhatt, T.R. & Horodyski, F.M. (1996) Molecular characterization and expression analysis of *Manduca sexta* allatotropin. *Eur J Biochem*, 239, 588-596.
- Tittiger, C., Blomquist, G.J., Ivarsson, P., Borgeson, C.E. & Seybold, S.J. (1999) Juvenile hormone regulation of HMG-R gene expression in the bark beetle *Ips paraconfusus* (Coleoptera: Scolytidae): implications for male aggregation pheromone biosynthesis. *Cell Mol Life Sci*, 55, 121-127.
- Tobe, S.S., Stay, B. (1985) Structure and regulation of the corpus allatum. *Adv. Insect Physiol.*, 18, 305-432.
- Tozetto, S.O., Rashinsky, A. & Engels, W. (1997) Juvenile hormone promotes flight activity in drones *Apis mellifera carnica*. *Apidologie*, 28, 77-84.
- Vieira, C.U., Bonetti, A.M., Simões, Z.L., Maranhão, A.Q., Costa, C.S., Costa, M.C., Siquieroli, A.C. & Nunes, F.M. (2008) Farnesoic acid O-methyl transferase (FAMeT) isoforms: conserved traits and gene expression patterns related to caste differentiation in the stingless bee, *Melipona scutellaris*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 67, 97-106.
- Werck-Reichhart, D. & Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol*, 1, REVIEWS3003.

Yagi, K.J., Konz, K.G., Stay, B. & Tobe, S.S. (1991) Production and utilization of farnesoic acid in the juvenile hormone biosynthetic pathway by corpora allata of larval *Diploptera punctata*. *Gen Comp Endocrinol*, 81, 284-294.