

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITOS DO HORMÔNIO JUVENIL III NA EXPRESSÃO  
GÊNICA DE *Melipona scutellaris* (HYMENOPTERA, APIDAE,  
MELIPONINI)

Carlos Ueira Vieira

Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal  
de Uberlândia, para a obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG  
Fevereiro - 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITOS DO HORMÔNIO JUVENIL III NA EXPRESSÃO  
GÊNICA DE *Melipona scutellaris* (HYMENOPTERA, APIDAE,  
MELIPONINI)

Carlos Ueira Vieira

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Bonetti

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de  
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

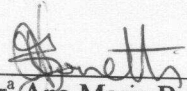
Uberlândia – MG  
Fevereiro - 2003

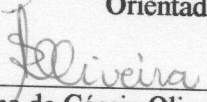
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

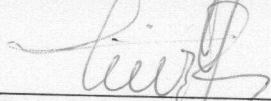
EFEITOS DO HORMÔNIO JUVENIL III NA EXPRESSÃO  
GÊNICA DE *Melipona scutellaris* (HYMENOPTERA, APIDAE,  
MELIPONINI)

Carlos Ueira Vieira

Aprovado Pela Banca examinadora em 03/02/2003  
Nota 100 (cem)

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Bonetti  
Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
MSc Rosana de Cássia Oliveira

  
\_\_\_\_\_  
Prof Dr Luiz Ricardo Goulart Filho

Uberlândia – MG  
Fevereiro - 2003

*“Nossa busca por descobertas alimenta nossa criatividade em todos os campos, não apenas na ciência. Se chegássemos ao fim da linha, o espírito humano definharia e morreria. Mas não creio que um dia sossegaremos: aumentaremos em complexidade, se não em profundidade, e seremos sempre o centro de um horizonte de possibilidades em expansão”.*

*STEPHEN HAWKING*

## *Dedicatória*

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Geraldo e Maria Aparecia, pelo exemplo de vida que sempre me deram, por todo o carinho e dedicação nesses anos.*

*Dedico ao Meu Irmão Leonardo pelo companheirismo e por toda ajuda que me prestou nos momentos mais difíceis da minha vida, pelo seu caráter, e pela pessoa maravilhosa que é.*

*Dedico à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Bonetti, por ter me mostrado o maravilhoso mundo da ciência, pela sua amizade, por todos os seus incentivos e pela confiança depositada em mim.*

## **Agradecimentos**

À Deus por toda as diversidades existentes na terra, e por ser meu maior mestre.

Aos meus pais, Geraldo de Fátima e Maria Aparecida, pela minha vida, pela paciência e dedicação à mim, principalmente, pelo estímulo à minha carreira acadêmica.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Bonetti pela confiança em mim depositada, incentivo em minha carreira e por sua orientação e pela sua amizade.

À Msc. Rosana de Cássia Oliveira pelos ensinamentos, pela co-orientação e por sua sincera amizade.

Ao Prof Dr Luiz Ricardo Goulart Filho pelos inúmeros esclarecimentos prestados nesse trabalho pela sua participação na banca examinadora.

Ao meu irmão pela amizade, companheirismo e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus Colegas dos Laboratórios de Genética e Genética Molecular, pela cooperação e convivência nesses anos.

Aos meus amigos pelos momentos de diversão, amizade e companheirismo.

As minhas tias Alzira e Andrezina por me incentivarem na carreira acadêmica.

À Gilda pelos seus sucos maravilhosos durante as visitas ao Meliponário.

Ao Dr Kerr pelo exemplo de vida, e pelos estudos e luta pela preservação dos meliponíneos.

Aos professores e funcionários da UFU pela boa vontade durante toda minha graduação.

Ao Francis, à Gislene e ao Maurício Machaim pela amizade, sugestões e contribuições nesse trabalho.

À Msc. Maria Alice pelos ensinamentos, confiança e incentivo nas minhas pesquisas.

Aos Colegas do Curso Técnico em Patologia Clínica pela amizade e companheirismo durante e após o curso.

Aos colegas do curso de Ciências Biológicas pela amizade e convivência.

Aos *Los Coleopteros* pela amizade e pelas festas proporcionadas pelo grupo.

À FAPEMIG pela bolsa de Iniciação Científica.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.



## Lista de Tabela e Figuras

Tabela 1: Seqüência dos *primers* utilizados na transcrição reversa e na amplificação por PCR.

\**Primers* para transcrição reversa

+*Primers* arbitrários, para reações de amplificação

Figura 1: Perfis do RNA de *Melipona scutellaris* obtido pelo método trizol, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, depois da remoção do DNA contaminante pela digestão com DNase I.

1- L3 após 1 h de tratamento com HJ III

2- Controle (após 1 hora do tratamento com HJ III)

3- L3 após 4 h de tratamento com HJ III

4- Controle (após 4 horas do tratamento com HJ III)

Figura 2: Produtos de DDRT-PCR (combinação HT11A-AP4) em gel de poliacrilamida 6% uréia 8M, corado com nitrato de prata. B: branco (sem RNA). B1, B2, B3 e B4: controles negativos (sem RT). T1: Reações em triplicata de Larva 3 após 1h de Tratamento com HJ III; C1: Controle /1h; T2: Larva 3 após 4 horas de Tratamento com HJ III; C2: Controle/4h. As setas (  $\longrightarrow$  ) indicam a expressão diferencial.

Figura 3: Produtos de DDRT-PCR (combinação HT11G-AP5) em gel de poliacrilamida 6% uréia 8M, corado com nitrato de prata. B: branco (sem RNA). B1, B2, B3 e B4: controles negativos (sem RT). T1: Reações em triplicata de Larva 3 após 1h de Tratamento com HJ ; C1: Controle /1h; T2: Larva 3 após 4 horas de Tratamento com HJ III; C2: Controle /4h. As setas (  $\longrightarrow$  ) indicam a posição do transcrito no indivíduo após 1h de tratamento com HJ III (T1) em comparação ao controle (C1).

Figura 4: Produtos de DDRT-PCR (combinação HT11G-AP4) em gel de poliacrilamida 6% uréia 8M, corado com nitrato de prata. B: branco (sem RNA). B1, B2, B3 e B4: controles negativos ( sem RT). T1: Larva 3 após 1h de Tratamento com HJ III; C1: Controle /1h; T 2: Larva 3 após 4 horas de Tratamento com HJ III; C 2: Controle /4h. As setas (  $\longrightarrow$  ) indicam o transcrito no controle e a posição correspondente nos indivíduos tratados. As setas (  $\rightarrow$  ) indicam expressão diferencial de intensidade durante o desenvolvimento larval, nos indivíduos tratados e controle.

## Lista de Abreviaturas

- $\mu\text{g}$  – Micrograma
- $\mu\text{l}$  – Microlitro
- CA - *Corpora allata*
- cDNA – DNA complementar
- DDRT-PCR - *Differential Display Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*
- DDT - Dithiothreitol
- DEPC – Diethyl Pyrocarbanate
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- dNTPs – Desoxirribonucleotídeo trifosfatados
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- h – Horas
- HJ - Hormônio Juvenil
- KCl – Cloreto de potássio
- L3 – Larva no estágio 3
- LPD – Larva Pré-defecante
- M - Molar
- MgCl – Cloreto de magnésio
- ml - Mililitros
- mM – Milimolar
- mRNA – RNA Mensageiro
- ng – Nanograma

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RNA – Ácido Ribonucléico

RNAsin – Inibidor de RNase

RT – Transcriptase Reversa

V – Volts

## Resumo

O objetivo desse trabalho foi detectar, pela técnica de *Differential Display Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* (DDRT-PCR), os efeitos do Hormônio Juvenil (HJ) III na expressão gênica, quando aplicado no estágio tardio de larva 3 (L3) de *Melipona scutellaris*. Nas fases que abrangem L3 e larva pré-defecante (LPD) há uma janela temporal de expressão dos genes feminizantes, durante a qual eles podem ser ligados ou desligados por ação do HJ, o qual é capaz de promover a diferenciação das larvas fêmeas, em rainhas. A combinação dos *primers* HT11A-AP4 revelou uma expressão diferencial no indivíduo tratado com HJ III, com fraca expressão do transcrito, após 1 hora de tratamento do indivíduo, enquanto que no Controle e indivíduos com 4 horas de tratamento, a expressão foi mais forte. As combinações dos *primers* HT11G-AP4 e HT11G-AP5 revelaram, em cada uma dessas combinações, a supressão de um produto gênico na larva após 1 hora de tratamento com HJ III em relação ao expresso nos indivíduos de mesma idade não tratados e no indivíduo com quatro horas após o tratamento. Foi observado, também, expressão diferencial de transcritos durante o desenvolvimento ontogenético. Esses resultados demonstram que o HJ III suprime ou altera o perfil de expressão gênica durante a fase de L3 de *Melipona scutellaris*.

Palavras-chave: Expressão Gênica, DDRT-PCR, Hormônio Juvenil, *Melipona*, Castas.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Abelhas sem ferrão

As abelhas sem ferrão pertencem à superfamília Apoidea que se subdivide em 8 famílias: Colletidae, Andrenidae, Oxaeidae, Halictidae, Melittidae, Megachilidae, Anthophoridae e Apidae (KERR *et al.*, 1996).

Os Apidae subdividem-se em quatro subfamílias: Apinae, Meliponinae, Bombinae e Euglossinae. Em Meliponinae estão descritos 52 gêneros com mais de 300 espécies, espalhadas em todo o mundo. Os povos pré-colombianos já conheciam as abelhas sem ferrão e as domesticaram, dando-lhes nomes que ainda hoje persistem na cultura popular brasileira como, jataí, uruçú, tiúba, mombuca, irapuá, tataíra, jandaíra, guarupu, manduri (KERR *et al.*, 1996).

As abelhas são parte integrante do ecossistema da região em que vivem. Sua principal função na natureza é a polinização das flores e, conseqüentemente, produção de sementes e frutos. As abelhas brasileiras sem ferrão são responsáveis por 40 a 90% da polinização das árvores nativas; as restantes são polinizadas por abelhas solitárias, borboletas, coleópteros,

morcego, aves, alguns mamíferos, água, vento e pelas abelhas africanizadas (KERR *et al.*, 1996).

Para a implantação de um Meliponário, local onde são mantidas as colméias de meliponídeos, devem ser considerados vários fatores importantes tais como: local onde haja florada, água, sol e sombreamento em proporção adequada e, principalmente, considerar o número de colméias ali colocadas o que é importante para que não se perca a variabilidade genética devido ao endocruzamento, com conseqüente, morte das colônias. Esse número corresponde ao mínimo de 44 colônias de uma mesma espécie, em um mesmo local. Esse número de colônias foi determinado em função do sistema de determinação do sexo e de acasalamento dos Meliponíneos (YOKOYAMA e NEI, 1979).

Considerando-se que os meliponíneos estão intrinsecamente ligadas à polinização de espécies vegetais que compõem a diversidade da flora brasileira, torna-se importante conhecer sua biologia e os mecanismos genéticos envolvidos no seu desenvolvimento para contribuir com a sua preservação e conseqüente preservação da biodiversidade.

A abelha sem ferrão, popularmente conhecida como Uruçu do Nordeste, que se constitui no objeto de estudo para as informações desse trabalho, pertence à espécie *Melipona scutellaris*, e tem se mostrado em excelente material biológico para análises genéticas devido ao mecanismo peculiar, do gênero *Melipona*, de determinação de castas por fatores genético-alimentares, o que difere do padrão apresentado por outros Apidae.

## 1.2 Hormônio Juvenil

Um dos hormônios envolvidos no processo de metamorfose de insetos é o Hormônio Juvenil (HJ) sintetizado pelas glândulas endócrinas *corpora allata* (CA) e secretado na hemolinfa, o qual promove, de alguma maneira, a interação dos CA com o genoma, provavelmente, via receptor nuclear da superfamília dos esteróides (DAVEY, 2000).

Em 1974, KERR propôs um modelo para explicar, em *Melipona*, a segregação de 75 operárias para 25 rainhas em cada 100 nascimentos. Dois genes principais  $X^a$  e  $X^b$ , com dois alelos cada um, seriam os responsáveis por produtos feminizantes, de modo que larvas duplo heterozigotas, quando bem alimentadas, desenvolvem-se em rainhas e larvas mal alimentadas ou homozigotas para esses genes, tornam-se operárias, em consequência de baixa produção de HJ.

A aplicação tópica de Hormônio Juvenil em larvas de *Melipona* que estão em fase de tecelagem de casulo (larvas pré-defecantes) e, mesmo, no estágio de L3 tardio, confirma a influência desse hormônio na produção de rainhas a partir de larvas de operárias, pelo desencadeamento de mecanismos genéticos que promovem a diferenciação dessas larvas em fêmeas completas, rainhas (BONETTI, 1982). A anatomia externa de ovários de rainha de *Melipona quadrifasciata* induzida por tratamento com HJ é idêntica à de rainha natural (BONETTI, 1984). Glândulas terçais de rainhas induzidas por tratamento com HJ mostram, também, padrão de distribuição idêntico ao de rainha natural (BONETTI *et al.*, 1994).



Os efeitos dos Hormônios Juvenil I, II e III foram estudados por BONETTI *et al.* (1995) que determinaram a dosagem mínima suficiente para a produção de rainhas a partir de larvas de operárias de *Melipona*. O HJ I demonstrou ser o mais eficiente na produção de rainhas em *Melipona*, seguido do HJ III.

Para SILVA (1999) o HJ III na dosagem de 0,5µg/µl foi capaz de induzir a produção de até 100% de rainhas em *Melipona scutellaris*, quando aplicado topicamente em larvas pré-defecantes (LPD).

### **1.3 Differential Display Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR)**

O material genético de um indivíduo é igual em todas as suas células, mas se expressa de forma diferente em cada tipo celular. A técnica de *Differential Display Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* (DDRT-PCR) desenvolvida por LIANG e PARDEE (1992) permite a detecção de genes diferencialmente expressos em células, tecidos e organismos, por meio de um perfil de mRNA.

A técnica consiste na transcrição reversa do RNA mensageiro (mRNA), em cDNA (DNA complementar obtido a partir do RNA) por meio de um *primer* oligo-dT que se liga à cauda poli-(A) do mRNA, selecionando um tipo específico de mRNA.

FRANZ *et al.* (1998) utilizaram a técnica de DDRT-PCR para analisar os genes diferencialmente expressos no sistema neural de gafanhoto *Schistocerca gregaria*. KEDAR *et al.* (1996) a utilizaram para identificar mRNAs

diferencialmente expressos em fígado hemocromático e fígado normal, em humanos.

Desde a sua publicação, inúmeros trabalhos têm apresentado propostas de otimização da técnica (MOU *et al.*, 1994; GUIMARÃES *et al.*, 1995; DOSS, 1996; BONNET *et al.*, 1998).

## 2. Objetivo

### 3.1 Material Biológico e Tratamento com HJ III

Este trabalho teve por objetivo investigar por meio da técnica de DDRT-PCR, o perfil de mRNA de *Melipona scutellaris* após aplicação tópica de HJ III em larva, buscando identificar genes cujo padrão de expressão mostram influência do Hormônio Juvenil.

Larvas de *Melipona scutellaris* do estágio III foram tratadas topicamente e isoladamente com 1 µl de HJ III, dissolvido em acetona P.A. (MERCK) na dosagem de 0.5 µg/µl. As larvas foram mantidas em estufa a 31°C, com umidade relativa de 80%, obtida por meio de solução saturada de KCl em dessecador (ASTM 1951). Larvas controle, sem tratamento e tratadas apenas com acetona P.A. (MERCK) foram identicamente recapituladas. Após uma e quatro horas do tratamento foram coletadas larvas Tratadas e Controle e congeladas em ultrabaixeira a -80°C até o momento da extração do RNA.

### 3.2 Extração de RNA

A extração de RNA total das larvas foi feita pelo método do TRIzol (GIBCO) segundo recomendações do fabricante. A larva foi macerada em 1 ml de trizol para cada 100mg do tecido, agitado em vórtex e incubado por 5 minutos a 30°C. Foram adicionados 0.2 ml de cloroformio para cada ml de trizol, agitando-se por 15 segundos e incubando-se a 30°C por 2 minutos, seguido de centrifugação a 12000 g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubo de eppendorf ao qual foram adicionados 500 µl de isopropanol para cada ml de trizol e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugando-se a 12000 g por 10 minutos, a 4°C. O pellet foi lavado

#### 4. Resultados e Discussão

O RNA extraído pelo método TRIzol foi tratado com DNase I para remoção de DNA genômico, que poderia contaminar a reação produzindo falsas bandas no gel e levando à interpretação inadequada dos dados. Sabe-se que a DNase I é uma endonuclease que hidrolisa, preferencialmente, cadeias simples ou duplas de DNA nos sítios adjacentes aos nucleotídeos pirimidínicos (SAMBROOK, 1989). Após o tratamento, a integridade do RNA foi analisada em gel de agarose 1%. Os RNAs mostraram-se íntegros para a transcrição reversa (Figura 1).

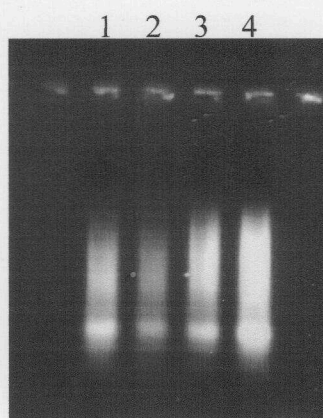


Figura 1: Perfis do RNA de *Melipona scutellaris* obtido pelo método trizol, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, depois da remoção do DNA contaminante pela digestão com DNase I.

- 1- L3 após 1 h de tratamento com HJ III
- 2- Controle (após 1 hora sem tratamento com HJ III)
- 3- L3 após 4 h de tratamento com HJ III
- 4- Controle (após 4 horas sem tratamento com HJ III)

A transcrição reversa do mRNA foi obtida com a enzima SUPERScript RT II (GIBCO) e um *primer* oligo-dT. Somente o mRNA sofre transcrição reversa porque possui uma cauda poli-A onde o *primer* oligo-dT se anela, selecionando-o. Foram feitas triplicatas das reações de transcrição e um branco para cada amostra, a reação com RNA sem a presença da SUPERScript. Bandas nas 2 últimas

situações, mostram que o RNA está contaminado com DNA. Foi feito, ainda, um branco geral que consiste em uma reação onde se colocam todos os reagentes com exceção do RNA. Com essa reação é verificado se os reagentes estão contaminados.

Os produtos das transcrições foram amplificados por reação de PCR, utilizando-se *primer* oligo-dT e um *primer* aleatório. A combinação dos *primers* HT11A-AP4 revelou expressão diferencial de intensidade, com fraca expressão do transcrito no indivíduo submetido à uma hora de tratamento com HJ III, enquanto que nos indivíduos Controle e tratados por 4 horas, a expressão foi mais intensa (Figura 2).

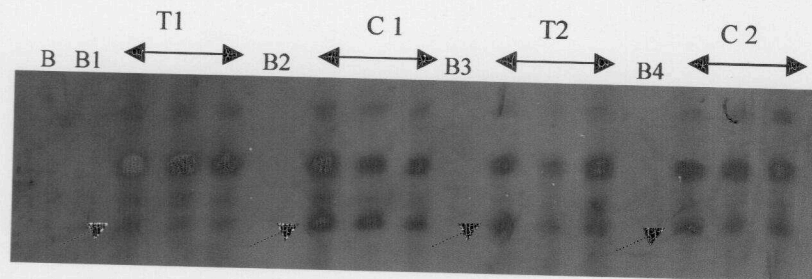


Figura 2: Produtos de DDRT-PCR (combinação HT11A-AP4) em gel de poliacrilamida 6% uréia 8M, corado com nitrato de prata. B: branco (sem RNA). B1, B2, B3 e B4: controles negativos (sem RT). T1: Reações em triplicata de Larva 3 após 1h de Tratamento com HJ III; C1: Controle /1h; T2: Larva 3 após 4 horas de Tratamento com HJ III; C2: Controle/4h. As setas (  $\longleftrightarrow$  ) indicam expressão diferencial.

A combinação HT11G-AP5 revelou a supressão de um produto gênico na larva após 1 hora de tratamento com HJ III, em relação ao seu Controle. Após 4 h de tratamento esse produto estava com mesma expressão do Controle de 1 h (Figuras 3).

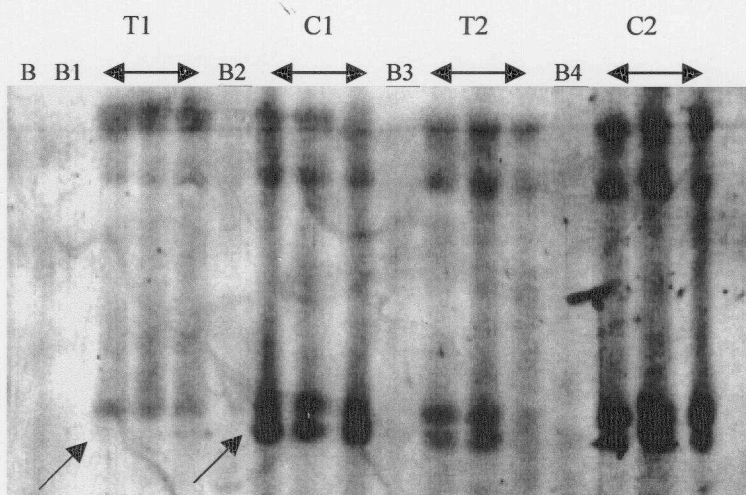


Figura 3: Produtos de DDRT-PCR (combinação HT11G-AP5) em gel de poliacrilamida 6% uréia 8M, corado com nitrato de prata. B: branco (sem RNA). B1, B2, B3 e B4: controles negativos (sem RT). T1: Reações em triplicatas de Larva 3 após 1h de Tratamento com HJ ; C1: Controle /1h; T 2: Larva 3 após 4 horas de Tratamento com HJ III; C2: Controle /4h. As setas ( —→ ) indicam a posição do transcrito no indivíduo após 1h de tratamento com HJ III (T1) em comparação ao controle (C1).

A combinação HT11G-AP4 revelou expressão gênica diferencial durante o desenvolvimento larval, com forte expressão das bandas 2 e 3 em larva Tratada (T1) e Controle (C 1) de 1 h comparado com Tratado (T 2) e Controle (C 2) de 4 h. Em adição, essa combinação, também, revelou a supressão de um produto gênico no indivíduo após 1 hora de tratamento com HJ III (Figura 4).

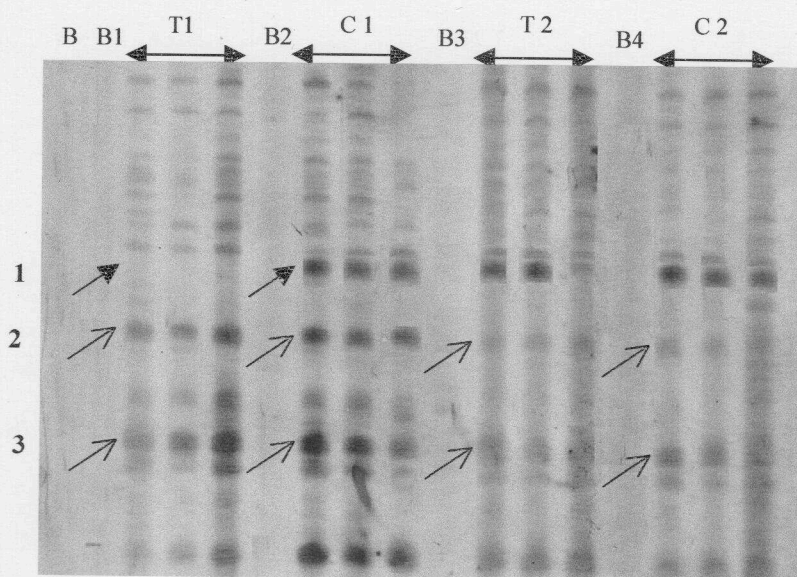


Figura 4: Produtos de DDRT-PCR (combinação HT11G-AP4) em gel de poli-acrilamida 6% uréia 8M, corado com nitrato de prata. B: branco (sem RNA). B1, B2, B3 e B4: controles negativos (sem RT). T1: Reações em triplicatas de Larva 3 após 1h de Tratamento com HJ III; C1: Controle /1h; T 2: Larva 3 após 4 horas de Tratamento com HJ III; C 2: Controle /4h. As setas (  $\longrightarrow$  ) indicam o transcrito no controle e a posição correspondente nos indivíduos tratados. As setas (  $\rightarrow$  ) indicam expressão diferencial de intensidade durante o desenvolvimento larval, nos indivíduos tratados e controle.

O Hormônio Juvenil (HJ) está relacionado ao desenvolvimento, morfologia e fisiologia de insetos e seus efeitos têm sido bastante investigados (BONETTI, 1982; 1984; BONETTI *et al.*, 1994; 1995; TOZETTO *et al.*, 2000; HEPERLE & HARTFELDER, 2001). O perfil da expressão gênica durante a diferenciação de castas em *Apis*, em condições naturais, vem sendo estudada por diversos autores (EVANS & WHEELER, 1999; CORONA *et al.*, 1999; EVANS & WHEELER, 2000; TAKEUCHI *et al.*, 2001).

Em nossa análise verificamos que, a aplicação tópica de HJ III em larvas de *Melipona scutellaris*, no estágio de L3 tardio, provocou alterações no perfil de mRNA, com supressão de transcritos gênicos após 1 hora de tratamento da larva.

Onze bandas diferencialmente expressas foram bem marcantes e reprodutíveis, sendo que duas delas foram totalmente suprimidas após 1 h de tratamento com HJ III em L3. Verificou-se, ainda, que o HJ foi capaz de atuar, suprimindo a expressão gênica em larvas com 1 hora de desenvolvimento enquanto que em larvas de 4 horas, esse hormônio não mostrou qualquer influência (Figuras 3 e 4, banda 1). Similarmente, BONETTI (1990) verificou supressão de Esterases específicas de adulto, em indivíduos de *Melipona quadrifasciata* com 8 dias de idade, tratados com HJ I no estágio de larva. Seus resultados mostram, ainda, algumas regiões de atividade esterásicas com menor intensidade de expressão em indivíduo submetido a tratamento com HJ I.

JONES *et al.* (1996) também observaram a supressão de proteínas de armazenamento, durante o desenvolvimento larval de *Trichoplusia ni*, após a aplicação tópica de análogo do HJ. COMAS *et al.* (1999) mostraram que em *Blatella germanica* cardioalatectomizada e tratada com HJ III, os níveis de mRNA de vitelogenina se elevam após 2 horas do tratamento, demonstrando o efeito gonadotrópico desse hormônio. VERMUNT *et al.* (1999) verificaram aumento da expressão do gene de Hormônio Juvenil Esterase (HJE) em larvas do besouro *Leptinotarsa decemlineata* e supressão de sua expressão em adultos, após a aplicação de análogo do HJ. KRÄMER *et al.* (2002), verificaram a inibição da expressão de alguns genes, em análise por DDRT-PCR em pupa de *Galleria*, em indivíduos tratados com HJ, durante metamorfose.



Alterações desse tipo, provocadas pelo HJ ou seus análogos, têm sido verificadas, ainda, por De KORT *et al.* (1997) em *Leptinotarsa decemlineata* e por HEPERLE & HARTFELDER (2001) em *Apis mellifera*.

Expressão gênica diferencial, também, foi observada em indivíduos com 1 e 4h de desenvolvimento (Figura 4, bandas 2 e 3). Esses genes provavelmente são ligados ou desligados em resposta à manipulação devido ao estresse ambiental.

A identificação e sequenciamento de genes que são ativados ou desligados durante o desenvolvimento ontogenético são metas a serem atingidas para esclarecimento dos mecanismos moleculares que regem o desenvolvimento em direção à diferenciação.

## 5. Conclusões

1 - As combinações dos *primers* HT11-AP4, HT11G-AP5 e HT11G-AP4, foram adequadas para detecção da expressão gênica diferencial durante o desenvolvimento e em indivíduos não tratados e tratados com HJ III. Onze bandas diferencialmente expressas foram bem marcantes e reprodutíveis, sendo que duas delas foram totalmente suprimidas após 1 h de tratamento com HJ III em L3.

2 - Durante o desenvolvimento ontogenético, somente indivíduos com 1 h de tratamento sofreram influência do HJ III. Indivíduos tratados com HJ III, após 1 hora de tratamento, mostraram expressão diferencial de intensidade do transcrito e/ou supressão da expressão de alguns genes.

3 - Os genes que sofreram influência do HJ III, com supressão ou intensidade de expressão, tiveram retorno aos níveis normais de expressão nos indivíduos com 4 h de tratamento.

## 6. Referências Bibliográficas \*

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS 1916 RACE ST., PHILADELPHIA 3, PA., 1951, *Recommended Practice for maintaining constant relative humidity by means of aqueous solutions*. P.706-710.
- BASAN, B. J.; CAETANO-ANOLES, G. & GRESSHOFF, P. M., 1991, Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytic Biochemical* 196: 80-83.
- BLUM, H.; BEIR, H.; GROSS, H. J. , 1987, Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gel. *Electrophoresis*: 93-99.
- BONETTI, A. M., 1982, *Ação do Hormônio Juvenil sobre a Expressão Gênica em Melipona scutellaris (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Brasil. 141p.
- BONETTI, A. M. , 1984, Efeitos do Hormônio Juvenil no desenvolvimento ovariano de *Melipona quadrifasciata*. *Revista Brasileira de Biologia* 44(4): 509-516.
- BONETTI, A. M. *Genética da Determinação de Casta em Melipona. Ação do Hormônio Juvenil sobre Esterases e corpora allata Durante Desenvolvimento Pós-Embrionário*, 1990, Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Brasil. 165p.

- BONETTI, A. M.; CRUZ-ALANDIM, C & KERR, W. E., 1994, Sex determination in bees XXX. Effects of Juvenile Hormone on the development of tergal glands in *Melipona*. *Journal of Apicultural Research*. 33 (1): 11-14.
- BONETTI, A. M.; KERR, W. E. & MATUSITA, S. H. , 1995, Effects of Juvenile Hormones I, II and III, in sigle and fractionated dosagem in *Melipona* bees. *Revista Brasileira de Biologia* 55: 113-120.
- BONNET, S.; PRÉVOT, G. & BOURGOUIN, C., 1998, Efficient reamplification of differential display products by transient ligation and thermal asymmetric PCR. *Nucleic Acids Research* 26(4): 1130-1131.
- COMAS, D.; PIULACHS, M. D.; BELLÉS, X., 1999, Fast induction of vitellogenin gene expression by juvenile hormone III in the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattelidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 821-827.
- CORONA, M.; ESTRADA, E. & ZURITA M., 1999, Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honey bee *Apis mellifera*. *The Journal of Experimental Biology* 202: 929-938.

- DAVEY, K. G., 2000, The model of action of juvenile hormones: some questions we ought to ask. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 663-669. *23(10): 1832-1833.*
- DE KORT, C. A. ; KOOPMANSCHAP, A. B.; VERMUNT, A. M. W., 1997, Influence of pyriproxyfen on the expression of haemolymph protein genes in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Jornal Insect Physiology* 43 (4): 363-37.
- DOSS, R. P., 1996, Differential display without radioactivity – A modified procedure. *Biotechniques* 21(3): 408-412.
- EVANS, J. D.; WHEELER, D. E., 1999, Differential gene expression between developing queens and worker in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 96: 5575-5580.
- EVANS, J. D.; WHEELER, D. E., 2000, Expression profiles during honey bee caste determination. *Genome Biol.* 2 (1): 1-6. *1(4): 357-368.*
- FRANZ, O.; RÖDER, T. & GEWECKE, M., 1998, Analysis of differential gene expression in the central nervous system of *Schistocerca gregaria* by differential display PCR. *J. Comp. Physiol. A* 182: 431-442.
- GRAND, S.; KÖRNER, U.; WOLFRUM, P. (2002) THE EXPRESSION OF THE PPT-1 GENE IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF THE HONEY BEE (*Apis mellifera*) DURING CASTE DETERMINATION. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 133-140.


MOU, L.; MILTER, H.; LI, J.; WANG, E. & CHALIFOUR, L., 1994, Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199(2): 564-569.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F.& MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 5.83 p.

SILVA, C. G. N., 1999, *Efeitos do Hormônio Juvenil III na determinação de Casta em Melipona scutellaris*. Monografia apresentada ao Curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil. 25p.

TAKEUCHI, H.; FUJIYUKI, T., SHIRAI, K.; MATSUO, Y.; KAMIKOUCHI, A.; FUJINAWA, Y.; KATO, A.; TSUJIMOTO, A.; KUBO, T., 2001, Identification of genes expressed preferentially in the honeybee mushroom bodies by combination of differential display and cDNA microarray. *FEBS Lett* Feb 27;513(2-3):230-4.

TOZETTO, S. deO.; PUCCIA, A.R.; SIMÕES, Z. L. P., 2000, Efeitos de análogo de Hormônio Juvenil (JH) sobre o perfil de proteínas dos testículo, glândulas de muco e vesícula seminal de *A. mellifera*. *Anais do IV Encontro Sobre Abelhas*: 311.



of the juvenile hormone esterase gene in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: photoperiodic and juvenile hormone analog response. *Journal of Insect Physiology* 45: 135-142.

YOKOYAMA, S. & NEI, M., 1979, Population dynamics of sex determining alleles in honey bees and self-incompatibility alleles in plants. *Genetics* 91: 609-626.