

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

MON
51.724-115
R467 P
TES/MEM

**PADRÃO DE ESTERASES DURANTE O
DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *Melipona
scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**

Aluna: *Syomara Hakiko Matusita Soares de Rezende*

Orientador: Prof^ª Dr^ª *Ana Maria Bonetti*

DIRBI/UFU



1000183778

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica.

UBERLÂNDIA-MINAS GERAIS

JUNHO DE 1997



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Campus Umarama Bloco 2E Sala 37

38.400-902, UBERLÂNDIA - MG

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

1 - TÍTULO DA TESE: Padrão de Esterases durante o desenvolvimento pós-embrionário de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)

2 - ALUNO: Syomara Hakiko Matusita Rezende

3 - PROFESSOR ORIENTADOR: Ana Maria Bonetti

4 - DATA: 01/ 06/ 97

5 - BANCA EXAMINADORA:
Titular Ana Maria Bonetti
Titular Marcia Maria Gentile Bitondi
Titular Luiz Ricardo Goulart Filho
Suplente Warwick Estevam Kerr
Suplente Zilá Luz Paulino Simões

6 - APRESENTAÇÃO: Início - 14:15 Término - 15:10

7 - TEMPO DE ARGUIÇÃO: Início - 15:10 Término - 17:00

8 - CONCEITO ATRIBUÍDO POR EXAMINADOR:
1º Membro da Banca A
2º Membro da Banca A
3º Membro da Banca A
Conceito Final: A

9 - OBSERVAÇÕES: _____

10 - ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA:

11 - RESERVADO AO COLEGIADO

[Handwritten signatures]

[Empty box for Colegiado]

0043-11560

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
DIRETORIA DO SISTEMA DE BIBLIOTECAS
Procedência: _____
Valor R \$: 1923
Recebido em: 1997 N.F. _____
O.P.D. _____
N.F. / Fatura: _____ de _____
Revisão: 00633/99 Data: 23/09/99
Volume: _____ Exemplar: 1

FU000095048

R 467p

Rezende, Syomara Hakiko Matusita S. de.
Padrão de Esterases Durante o Desenvolvimento Pós-Embrionário de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)./ Syomara Hakiko Matusita Soares de Rezende. 51 f. il.

Orientador: Ana Maria Bonetti
Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia. Centro de Ciências Biomédicas. Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

1. Abelha-Genética. 2. *Melipona*-Genética. 3. Isoenzimas. 4. Esterases. I. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

CDU: 595.799.115

À minha avó Isaura (*in memoriam*),

Aos meus pais,
Siguetoci e Stelita,
com gratidão

DEDICO.

Ao Eduardo
e aos nossos filhos:
Giovana e Leonardo,
com amor

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ana Maria Bonetti, orientadora deste trabalho, pela orientação segura e, principalmente pela confiança, compreensão e amizade durante a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevan Kerr, pelos ensinamentos, incentivo na carreira científica e sobretudo pelo exemplo de conduta pessoal e social.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, pela atenção, sugestões e incentivos, bem como por ter permitido a realização dos experimentos no Laboratório de Genética Molecular.

À Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi, pela disponibilidade em compor a banca examinadora, e sobretudo pelas críticas e sugestões apresentadas.

À Profa. Dra. Maria Inês Brandeburgo pela cooperação no início deste trabalho e por suas sugestões no decorrer deste.

À todos os professores do Departamento de Genética e Bioquímica.

À todos os colegas dos laboratórios de Genética, Genética Molecular e Bioquímica, pela cooperação e convivência harmoniosa.

Especialmente à Adelmo, Alcione, Ana Maria, Ana Paula, Célia, Cícero, Christiane, Cristiano, Gláucia, Gerson, Gislene, Gismar, Gustavo, Maurício, Matsucuma, Paula, Robson, Rosana, Roselis, Soraya, Vanessa, Vânia e Veridiana, pela amizade e, sobretudo pela troca de experiências durante nossa convivência.

Aos meus pais Siguetoci e Stelita, pela família estruturada em amor, respeito e união e, principalmente pelo orgulho que sinto em tê-los como pais.

Aos meus irmãos: Siguetoci, Silvane, Silvio, Stelita, Sérgio e João Henrique, pelo apoio constante, amizade e companheirismo.

Ao meu esposo Eduardo, pelo incentivo, pelas críticas, pela superação dos momentos difíceis, por seu amor.

Aos meus filhos Giovana e Leonardo, pelas minhas ausências, pela oportunidade de aprender como é tão simples ser feliz.

Aos meus sogros Élvio e Sálua, pelo convívio saudável e, principalmente pelo apoio em todos os momentos difíceis.

À CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e auxílio financeiro.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	01
I.1. Considerações sobre abelhas sem ferrão <i>Melipona</i>	01
I.2. Considerações sobre Esterases	04
I.3. Considerações sobre efeitos do Hormônio Juvenil (HJ)	09
II. OBJETIVOS	14
III. MATERIAL E MÉTODOS	15
III.1. MATERIAL BIOLÓGICO	15
III.1.1. Procedência e manutenção da espécie	15
III.1.2. Estágios analisados	16
III.2. MÉTODOS	18
III.2.1. Preparo das amostras	18
III.2.2. Tratamento com HJ	19
III.2.3. Preparação dos géis	19
III.2.4. Condições da eletroforese	21
III.2.5. Revelação das regiões de atividade esterásica	21
III.2.6. Secagem dos géis	22
III.2.7. Dosagem de proteínas	22

IV. RESULTADOS	23
IV.1. Padrão de esterases durante o desenvolvimento ontogenético	24
IV.2. Esterases em rainhas, operárias e machos	31
IV.3. Esterases em amostras tratadas ou não com HJ	32
V. DISCUSSÃO	34
VI. RESUMO	40
VIII. BIBLIOGRAFIA	42

I. INTRODUÇÃO

I.1. Considerações sobre abelhas sem ferrão *Melipona*

As abelhas sem ferrão, objeto do presente trabalho, pertencem à família Apidae e subfamília Meliponinae, a qual se divide em duas tribos: Meliponini que inclui um único gênero, *Melipona*, compreendendo 40 espécies e Trigonini, compreendendo 54 gêneros e mais de 300 espécies (CAMARGO & PEDRO, 1992). Estão distribuídas na Zona Tropical e Subtropical, nas Américas do Sul e Central, Malásia, Índia, Indonésia, África e Austrália.

Os Meliponíneos formam um grupo de abelhas que são distinguíveis das outras pela redução e fragilidade da venação das asas, atrofia do ferrão e pela presença de penicilo na tíbia posterior (tufo de cerdas muito duras e desenvolvidas, no canto anterior do ápice da tíbia) (SAKAGAMI, 1982; MICHENER, 1990). As colônias apresentam divisão de castas, onde a rainha e as operárias diferem quanto à morfologia, fisiologia e comportamento. Os machos são de vida curta, e, ao contrário do que se pensava, têm papel importante na regulação social e deixam cedo a colônia. (KERR, 1997). Os machos originam-se por partenogênese arrenótoca sendo, portanto, haplóides, enquanto as fêmeas são diplóides, originadas de ovos fecundados.

As abelhas eusociais apresentam a seguinte divisão de castas:

- rainhas: são as fêmeas férteis, responsáveis pela postura da maioria dos ovos, não apresentam comportamento de coleta de alimento.
- operárias: são as fêmeas estéreis ou semi-estéreis, responsáveis pela alimentação da cria e da rainha, coleta de alimento, limpeza, construção de alvéolos e demais partes do ninho, defesa e, em alguns casos, pela postura

de ovos que darão origem a machos ou ovos que servirão de alimento à rainha (ovo trófico).

Os machos, haplóides, permanecem na colméia no primeiro terço das suas vidas e já foram vistos realizando trabalhos como: aquecimento da cria, produção e manipulação de cera, desidratação e coleta de néctar e pólen nas flores, quando são expulsos da colméia. (VEEN *et al.*, 1994; KERR, 1997).

Em uma colônia de abelhas, a casta pode ser induzida por mecanismos:

- comportamental: quando não há diferenças morfológicas ou genéticas entre as fêmeas e uma delas torna-se dominante sobre as demais, como ocorre em algumas vespas (ROSELER *et al.*, 1980);
- trofogenico: há diferenças morfológicas entre as fêmeas, mas tanto rainhas como operárias originam-se de ovos com a mesma constituição genética. É a alimentação diferencial que determina a casta, como em *Apis mellifera* e alguns Trigonini;
- genético-alimentar: ovos com diferença na constituição genética associado à quantidade suficiente de alimento dão origem a um polimorfismo morfo-fisiológico entre as fêmeas. É o que ocorre em abelhas *Melipona* (KERR, 1946).

BEZERRA (1995) observou que rainhas de *Melipona quadrifasciata*, nascem com maior frequência na periferia (coroa) dos favos e os machos, por sua vez, emergem preferencialmente da região central. Isto se deve ao fato de que as células da periferia são provisionadas com uma maior quantidade de alimento larval do que as células do centro do favo.

KERR (1946, 1948, 1950); KERR & NIELSEN (1966, 1967) propõem que existe uma interação entre alimento e genética na

determinação de castas dessas abelhas, sendo que rainhas são produzidas pela dupla heterozigose de dois genes x^a e x^b , associada à alimentação suficiente da larva enquanto que operárias são determinadas pela homozigose de qualquer desses dois genes ou ambos, independente da quantidade de alimento que a larva receba. Os genes x^a e x^b seriam responsáveis por algum passo na cadeia de reações bioquímicas de síntese de Hormônio Juvenil (HJ) (CAMPOS, 1978). Pesquisas no sentido de elucidar os passos no metabolismo do HJ em *Melipona* estão sendo desenvolvidas por NUNES-SILVA & KERR (c.p.).

Em *Melipona* os genes que conferem características feminizantes estão presentes tanto em machos como em fêmeas, sendo que em zangões se encontram bloqueados; em operárias estão parcialmente ativos e em rainhas estão totalmente ativos (BONETTI, 1982).

Em abelhas *Melipona*, a aplicação de HJ ou seus análogos, na fase em que a larva está tecendo o casulo ou um pouco antes, faz com que esta se diferencie em pupa de rainha (CAMPOS, 1975 ; CAMPOS *et al.*, 1975; BONETTI, 1982 ; BONETTI *et al.*, 1995).

BONETTI (1984) tratou larvas de operárias de *Melipona quadrifasciata* com HJ e obteve rainhas com ovários idênticos ao de rainha natural e sugeriu que o aumento deste hormônio na fase de transição larva-pupa possui papel na regulação da expressão de genes feminizantes, levando à diferenciação da larva em fêmea completa, quanto aos ovários.

BONETTI & KERR (1985) demonstraram que nessas abelhas os genes feminizantes responsáveis pela determinação de casta fazem parte de uma bateria de genes, que pode ser ativada pelo HJ.

A ausência de HJ pode ser devido a um decréscimo de produção pelos *corpora allata* e/ou degradação do hormônio (DOWNER *et al.*, 1975; HAMMOCK & ROE, 1985). Supõe-se que esterases HJ sejam as enzimas

que hidrolizam o HJ, como parte desse mecanismo regulador. Um aspecto importante no estudo das esterases nos insetos é a relação entre a atividade de algumas dessas enzimas e a degradação do HJ.

I.2. Considerações sobre Esterases

Em 1959, MARKERT & MOLLER constataram a existência de enzimas que catalizavam reações idênticas em diferentes organismos e em diferentes tecidos de um mesmo organismo. Conceituaram isozima (ou isoenzima) como as formas moleculares múltiplas nas quais uma enzima pode existir em um mesmo organismo.

As isoenzimas podem ser controladas geneticamente por um ou vários genes situados em um mesmo *locus* ou em diferentes *loci*, respectivamente (SCANDALIOS, 1969; MARKERT, 1975) e quando representam a expressão fenotípica de alelos situados em um mesmo *locus* são denominadas alozimas (CONKLE *et al.*, 1982) ou aloenzimas.

Isoenzimas/Aloenzimas constituem uma importante fonte de marcadores genéticos que podem ser empregados em vários programas experimentais teóricos e práticos.

A premissa básica adotada ao se utilizar dados isoenzimáticos é que diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças ao nível de sequências de DNA, que codificam tais enzimas. Assim, se os padrões de bandas de dois indivíduos diferem, assume-se que essas diferenças tenham base genética e sejam herdáveis (MURPHY *et al.*, 1990). Entretanto, isoenzimas também podem ter causa epigenética.

Dentre os sistemas enzimáticos, as esterases constituem o grupo de enzimas mais intensamente estudado em virtude de algumas características

peculiares que apresentam. Elas são amplamente distribuídas nos diferentes grupos de animais e plantas, ocorrem em um grande número de formas determinadas por *loci* gênicos distintos, apresentam ampla variabilidade genética, devem apresentar papel funcional bem diversificado e, além disso, apresentam, comumente, distribuição tecidual e temporal específicas.

As esterases compreendem um grupo heterogêneo de enzimas hidrolíticas, que catalizam a hidrólise dos ésteres, além de peptídeos, amidos e haletos (WALKER & MACKNESS, 1983).

A atividade dessas enzimas é geralmente demonstrada utilizando-se métodos histoquímicos de coloração com substratos sintéticos que não apresentam relação com os substratos biológicos como, por exemplo, os ésteres do naftol (SHAW, 1965; BREWER, 1970) e da 4-metilumbeliferona (HOPKINSON *et al.*, 1973). As esterases assim identificadas são classificadas como enzimas inespecíficas (SHAW, 1965).

A diversidade de substratos e atividades sobrepostas tem dificultado uma classificação precisa das esterases. Tentativas de classificação foram baseadas no comportamento das enzimas frente a inibidores.

ALDRIDGE (1953) classificou as esterases com base na sua interação com organofosforados (como o dietil p-nitrofenilfosfato). Nessa classificação, as esterases A (aromáticas ou arilesterases) hidrolizam os organofosforados e apresentam atividade preferencial frente aos ésteres aromáticos. As esterases B (alifáticas ou aliesterases) são inibidas pelos organofosforados. As esterases B podem ainda ser subdivididas em carboxilesterases e colinesterases, com base na inibição dessas últimas pelo sulfato de eserina. As esterases C não são inibidas pelos compostos organofosforados.

HOLMES *et al.* (1968) classificaram as esterases em 4 grupos: a) carboxilesterases, sensíveis ao organofosforado 0,0 diisopropilfluorofosfato

(DFP); b) arilesterases, sensíveis apenas ao p-hidroxiomercuribenzoato (PHMB) e/ou p-cloromercuribenzoato (PCMB); c) colinesterases, sensíveis ao sulfato de eserina e DFP, incluindo as acetilcolinesterases e pseudocolinesterases; d) acetilesterases, insensíveis a todos os inibidores mencionados e que hidrolisam, preferencialmente, os ésteres do ácido acético.

A variabilidade dos padrões isoenzimáticos de uma população é, geralmente, atribuída à segregação genética e é denominada polimorfismo. Esterases são as enzimas mais polimórficas em insetos e outros organismos vertebrados.

Nos insetos há evidências de que elas participam dos processos digestivos (KAPIN & AHMAD, 1980) da regulação dos níveis de HJ (DE KORT & GRANGER, 1981) e da degradação de inseticidas (MOTOYAMA & DAUTERMAN, 1974). Portanto, as diferentes formas moleculares das esterases têm sido estudadas nos diferentes tecidos e fases do desenvolvimento com objetivos distintos tais como: determinação da existência de variantes genéticas e sua utilização para diferenciar populações, raças ou subespécies; análise da expressão diferencial no desenvolvimento ontogenético e nas diferentes castas e a relação de esterases com seus inibidores e com inseticidas.

CARRASCO *et al.* (1984) encontraram seis zonas de atividade esterásica em *Drosophila dunnii*, sendo que um dos sistemas enzimáticos estava restrito ao sistema reprodutivo de machos.

JONES & BANCROFT (1986) determinaram a distribuição e provável papel fisiológico de esterases em tecidos reprodutivos, digestivos e corpo gorduroso de *Anthonomus grandis* e encontraram 5 esterases. A EST-1 ocorreu mais frequentemente em ovariolos e corpos gordurosos de fêmeas. A EST-2 foi mais encontrada em corpos gordurosos. EST-3^S foi

encontrada em corpos gordurosos e tecidos reprodutivos, enquanto a EST-3^F, sempre esteve associada à tecidos digestivos. EST-4 foi a esterase mais abundante, detectada em tecido do intestino e, provavelmente, envolvida na digestão. EST-5 apareceu, mais frequentemente em testículos e pode ser importante durante a reprodução.

Em *Drosophila melanogaster*, a EST-6 está relacionada com o comportamento de acasalamento, influenciando em macho, sua velocidade e também catalisando a formação de um ferormônio anti-afrodisíaco na fêmea, a partir do fluido seminal do macho (RICHMOND et al., 1986).

LIMA & CONTEL (1990) analisaram o perfil eletroforético de doze proteínas em populações naturais de *Spodoptera frugiperda* e determinaram que a carboxilesterase consistia de três zonas ativas, presentes durante todas as fases do desenvolvimento ontogenético. Em duas populações, as EST-1 e EST-3 apresentaram variantes fenotípicas, sugerindo que o locus EST-1 pode ter 2 alelos codominantes e o locus EST-3 pode ter, pelo menos, 6 alelos codominantes.

SCARPASSA et al. (1996) estudaram 4 enzimas em 6 populações de *Anopheles nuneztovari* (4 do Brasil e 2 da Colômbia). Um dos sistemas estudado foi o de esterase, que apresentou, no locus EST-5, regiões de atividade com alta variabilidade alélica para as populações brasileiras e baixa variabilidade para as populações da Colômbia.

Em abelhas, as isozimas esterases têm sido estudadas para os mais diversos fins. BITONDI & MESTRINER (1983) analisaram esterases de *Apis mellifera* utilizando ésteres de 4-metil-umbeliferona e inibidores. Detectaram seis sistemas isoenzimáticos para esterases, que foram caracterizados quanto à especificidade de substrato e propriedades inibitórias sendo que, dentre esses, três não apresentaram mudanças durante o desenvolvimento e três, variaram. Utilizando reagentes tíois, BITONDI

& MESTRINER (1985) demonstraram que pelo menos três dessas enzimas apresentavam grupamentos sulfidríla.

SHEPPARD & BERLOCHER (1985) utilizaram condições eletroforéticas variáveis para detectar novas variabilidades de alozimas em *Apis mellifera ligustica* e encontraram três sistemas polimórficos, sendo dois de enzima málica e um de esterase. Foram determinadas duas alozimas esterásicas, EST¹⁰⁰ e EST¹³⁰. Mais tarde, SHEPPARD & BERLOCHER (1989) utilizaram sistemas enzimáticos para analisar a variação inter e intra-específica de quatro espécies de *Apis* (*A. cerana*, *A. dorsata*, *A. florea* e *A. mellifera*) e determinaram a existência de uma considerável diferença genética entre as espécies, permitindo a discriminação das espécies, mesmo a partir de uma única colônia.

FALCÃO & CONTEL (1990) ao determinarem o padrão isoenzimático de carboxilesterases e de proteínas totais em dez espécies de abelhas sem ferrão (*Melipona compressipes*, *M. marginata*, *M. quadrifasciata*, *Plebéia droryana*, *Friesella schrottkyi*, *Partamona helleri*, *Scaptotrigona bipunctata*, *S. postica*, *Tetragonista angustula* e *Nannotrigona testaceicornis*) detectaram seis esterases polimórficas, sendo cinco monoméricas e uma dimérica. O controle genético de cada uma dessas esterases foi dependente da atividade de dois alelos.

Estudos isoenzimáticos foram usados para estimar diferenças genéticas em populações de abelhas africanizadas do Brasil e América Central. Foram examinados sete loci enzimáticos, em operárias adultas de *Apis mellifera*. Desses, cinco exibiam polimorfismos (DEL LAMA *et al.*, 1990).

FROHLICH *et al.* (1990) classificaram as esterases de *Megachile rotundata* com base em estudos de inibição. Foram encontradas 7 bandas esterásicas. As bandas 2 a 6 e a zona 7 exibiram inibição por compostos

organofosforados e foram designadas de esterases B. A banda 1 foi completamente insensível a qualquer inibidor usado e pode ser do tipo A (hidroliza organofosfato) ou do tipo C (insensível).

ALMEIDA (1992) estudou o perfil protéico e esterásico de zangões de *Apis mellifera* tratados ou não com HJ III e não detectou nenhuma alteração no padrão esterásico entre os zangões haplóides, independentemente da fase analisada.

I.3. Considerações sobre efeitos do Hormônio Juvenil (HJ)

ENGELMANN (1970) descreveu o HJ como sendo sintetizado e secretado pelos *corpora allata* (CA), glândulas que se originam de invaginações ectodermais entre os segmentos da mandíbula e a primeira maxila, geralmente, localizadas dentro da cápsula da cabeça, posteriormente ao cérebro e *corpora cardíaca* (CC).

Até o momento são conhecidos 5 tipos de HJ, denominados:

- HJ I e II, detectados em machos de *Hyalophora cecropia* (ROLLER *et al.*, 1967),
- HJ III, que foi isolado a partir de culturas de CA de fêmeas de *Manduca sexta* (Lepdoptera) (JUDY *et al.*, 1973),
- HJ O e iso-O, isolados de embriões de *Manduca sexta* (BERGOT *et al.*, 1980).

DE KORT & GRANGER (1981) sugeriram que os compostos designados por HJ I, HJ II e HJ III diferem na atividade fisiológica e nas concentrações na hemolinfa durante o ciclo de vida do inseto. Os HJ I e HJ II, por atuarem nas fases larvais e na metamorfose, seriam hormônios morfogenéticos. O HJ III, predominante na maioria dos insetos adultos, seria gonadotrófico.

O HJ desempenha um papel essencial na regulação do desenvolvimento e comportamento de insetos nos estágios juvenil e adulto.

A função melhor caracterizada do HJ está na transição larva-pupa pela sua interação com a ecdisona. Ele também atua em vários outros processos incluindo a regulação da produção de ovos (SHAPIRO *et al.*, 1986; BOWNES, 1989), morfogênese e reprodução de insetos (DE KORT *et al.*, 1979), desenvolvimento de órgãos gonadotróficos de macho e fêmea (YAMAMOTO *et al.*, 1988; BONETTI, 1984), determinação de casta (RACHINSKY & HARTFELDER, 1990; BONETTI, 1982; BONETTI *et al.*, 1995) e diapausa (DENLINGER & TANAKA, 1989; ZERA & TEIBEL, 1989). Sua concentração na hemolinfa depende de vários fatores tais como, síntese e liberação pelos CA, degradação por esterases, ligação a proteínas transportadoras, captação pelos tecidos e excreção.

Alterações no título de HJ foram consideradas fundamentais para a regulação dos processos controlados pelo próprio HJ. Essas alterações regulariam a biossíntese de HJ pelos CA, que por sua vez atuariam sobre os órgãos alvo, ocasionando um controle do tipo "feedback" sobre os CA (TOBE & STAY, 1985).

NIJHOUT & WHEELER (1982) propuseram que a metamorfose estaria diretamente ligada ao desaparecimento do HJ da hemolinfa, na fase larval do inseto.

A metamorfose é controlada pela interação de três hormônios: (1) Hormônio Protoracicotrófico (PTTH) (2) Ecdisona, que é convertido em 20-hidroxiecdisona (3) e HJ (GILBERT *et al.*, 1980; RIDDIFORD, 1980; RICHARDS, 1981).

A 20-hidroxiecdisona reprograma o genoma larval para passagem ao estágio pupal mas, essa indução só ocorre após um considerável decréscimo do título de HJ (RIDDIFORD, 1980, 1981). A inativação do HJ

é necessária para completar a metamorfose. Esta inativação é feita por uma enzima específica, a HJ-Esterase, capaz de hidrolizar o HJ ligado ou não a proteínas transportadoras (SANBURG *et al.*, 1975).

Em *Apis mellifera*, o HJ foi considerado um fator importante na diferenciação de castas, embora na maioria dos insetos esse hormônio seja apontado como responsável pela inibição da metamorfose.

Em *Apis mellifera* constatou-se que a aplicação de HJ ou bioanálogos em larvas de operárias, leva à diferenciação em rainha (BEETSMA, 1979; CAMPOS, 1977). RACHINSKY & ENGELS (1995) concluem, em seus estudos com *Apis mellifera*, que os ecdisteróides são os determinantes da síntese protéica em ovários, mais do que o próprio HJ.

BONETTI (1982) trabalhando com larvas de *Melipona*, verificou que HJ aplicado imediatamente antes à fase de pupação podia ativar os genes responsáveis pelas características de castas, o que levava à produção de até 100% de rainhas. Segundo BONETTI (1990) o alto título de HJ, em fase determinada do desenvolvimento, seria um fator essencial na determinação de castas, desencadeando a expressão dos genes feminizantes.

WHITMORE *et al.* (1972) propuseram um mecanismo para a regulação do título de HJ, no qual o próprio hormônio induziria o aparecimento de formas moleculares específicas de carboxilesterases na hemolinfa, capazes de degradar o HJ circulante, permitindo ao inseto o desenvolvimento normal dos processos morfogênicos.

ADJAMI & RIDDIFORD (1973) por meio de estudos "in vivo" e "in vitro" com espécies de oito ordens de insetos observaram que o HJ era rapidamente metabolizado e de sua degradação resultavam dois metabólitos: HJ ácido e HJ diol. Assim, a hidrólise pelas esterases, segundo os autores, seria o caminho primário para a degradação do HJ circulante.

Esterases são enzimas capazes de hidrolizar o HJ e, por isso, participam do mecanismo regulador do título deste hormônio em insetos. As Esterases Hormônio Juvenil Específicas (HJE) capazes de hidrolisar o grupamento metil ester do HJ, foram identificadas na hemolinfa de muitas espécies.

As HJE de *Manduca sexta* foram classificadas em dois grupos, utilizando inibidores (SANBURG *et al.*, 1975). As esterases da classe I são inativadas pelo diisopropilfluorofosfato, estão presentes durante todo o desenvolvimento do inseto e são capazes de hidrolizar apenas o HJ livre. As esterases da classe II são fracamente inativadas pelo diisopropilfluorofosfato, são detectadas na hemolinfa somente durante o último instar larval e são capazes de hidrolizar o HJ na forma livre ou associado com proteínas transportadoras.

RENUCCI *et al.* (1984) determinaram a atividade da HJE na hemolinfa do grilo doméstico *Acheta domesticus* durante seu primeiro ciclo reprodutivo e constataram uma correlação entre flutuações de título de HJ na hemolinfa e atividade desta enzima. As quedas dos picos de HJ eram acompanhadas por aumento da atividade HJE.

Indução de esterases específicas para o HJ também foi observada em fêmeas adultas de *Leucophaea maderae* (GUNAWAN & ENGELMANN, 1984).

RAUSCHENBACH *et al.* (1987) observaram que em *Drosophila virilis* o aumento da atividade da p-esterase está relacionado a um decréscimo no título de HJ em diferentes estágios de desenvolvimento, concluindo que, nessa espécie, a p-esterase é a HJE. CAMPBELL *et al.* (1992) demonstraram que a EST-20 de *Drosophila melanogaster* é homóloga à p-esterase de *Drosophila virilis*. No entanto, os autores verificaram que a atividade hidrolítica do HJ não está associada com a

EST-20 ou com a p-esterase e que, portanto, essas esterases não devem corresponder à HJE.

ZERA *et al.* (1992) constataram que a baixa atividade da HJE, durante o fim do estágio pupal, está fortemente correlacionada com a formação de asas curtas em adultos do grilo *Gryllus rubens*.

A ação das HJE na regulação do título de HJ pode diferir entre espécies e, provavelmente, entre os estágios de desenvolvimento dos insetos. A correlação entre as flutuações da atividade dessas esterases na hemolinfa e as alterações dos títulos de HJ revelaram o importante papel que essas enzimas apresentam na regulação.

Em *Manduca sexta*, a HJE parece ser induzida pela presença de juvenóides, de forma dose-dependente, indicando que HJ estimula a velocidade de sua própria degradação (SPARKS *et al.*, 1983). Assim, as HJE foram consideradas as responsáveis diretas pela remoção de todo traço de HJ da hemolinfa e de outros tecidos, em períodos críticos, regulando fases importantes do desenvolvimento (DE KORT & GRANGER, 1981).

A ação combinada desses fatores faz com que a concentração de HJ na hemolinfa seja regulada com precisão e obedeça a um padrão na maioria dos insetos: é alta no início das fases larvais e baixa no final das mesmas. No último estágio larval ocorre um desaparecimento abrupto deste hormônio na hemolinfa, seguido da metamorfose. Na fase adulta, sua concentração aumenta novamente de acordo com o estado fisiológico e estado reprodutivo dos insetos (DE KORT & GRANGER, 1981). Esse é o modelo para a maioria dos insetos, embora pareça ser diferente para abelhas sem ferrão classificadas como *Melipona*.

II. OBJETIVOS

A análise da atividade das esterases, realizada no presente trabalho teve como objetivos:

-Caracterizar as esterases que ocorrem em *Melipona scutellaris* durante o desenvolvimento ontogenético pós-embrionário, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE não desnaturante).

-Verificar se ocorrem esterases sexo e casta específicas, ou seja, verificar as modificações de expressão gênica, que ocorrem no fenótipo esterásico de Rainha, Operária e Macho de *Melipona*.

-Investigar o perfil eletroforético das esterases presentes na hemolinfa em amostras que receberam ou não tratamento com HJ.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. MATERIAL BIOLÓGICO:

III.1.1. Procedência e manutenção do material biológico

As abelhas utilizadas neste trabalho são *Melipona scutellaris* Latreille, 1811.

Os Meliponídeos são, essencialmente, um grupo de distribuição tropical, ocorrendo ocasionalmente nas regiões subtropicais (SCHWARZ, 1948). São de distribuição pantropical com a maior diversidade de formas encontradas nos trópicos das regiões Neotropicais e Indo-Malaia, porém com certos "taxa" restritos às zonas subtropicais do Hemisfério Sul (CAMARGO, 1989). Muito encontradas no Nordeste brasileiro, essas abelhas são conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão e a *Melipona scutellaris* é conhecida, nessa região, pelo nome popular de urucu.

O material a ser analisado, foi coletado de colméias mantidas no Meliponário Uberlândia, localizado no Condomínio Mansões Aeroporto (residência do Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr), em Uberlândia- MG. A população atual deste Meliponário foi formada a partir de 22 colônias originais trazidas de Lençóis - BA, que foi multiplicada por divisão das colônias fortes e introdução de novas rainhas e colônias.

Foram utilizados exemplares referentes aos estágios de larva, pupa e imago (foram coletadas aproximadamente 20 amostras de cada estágio). O material necessário ao estudo era coletado e, após seleção, utilizado para a análise de esterase. As amostras, não imediatamente utilizadas, foram mantidas em estufa com temperatura média de 32-33 °C e umidade relativa de aproximadamente 85%, obtida por meio de solução saturada de KCl

(ASTM, 1951) em dessecador até atingir a fase de desenvolvimento desejada, e então, congeladas à -80°C até o momento de análise.

III.1.2. Estágios analisados

Foram selecionadas abelhas *Melipona* nos estágios de desenvolvimento:

Larva 1 (L1), Larva 2 (L2), Larva 3 (L3), Larva Pré-Defecante (LPD), Larva Defecante (LD), Pupa de Olho Branco (POB), Pupa de Olho Rosa (POR), Pupa de Olho Marrom (POM), Pupa de Olho Preto (POP), Pupa Pigmentada Creme (PPC), Pupa Pigmentada Preta (PPP), Abelha Nascente (AN) e Adulto (A= adulto com cerca de 20 dias) (Figuras 1, 2 e 3).

Critérios para o reconhecimento das fases larvais foram baseados em ROSSINI (1989).

Universidade Federal de Uberlândia
BIBLIOTECA



Figura 1- L1, L2, L3, LPD e LD de *Melipona scutellaris*.



Figura 2- POB, POR, POM e POPde *Melipona scutellaris*.



Figura 3-POP, PPC, PPP e AN de *Melipona scutellaris*

III.2. MÉTODOS:

III.2.1. Preparo das amostras

A caracterização precisa das fases do desenvolvimento e sexo das amostras (nas fases em que é possível identificar) foi realizada com o auxílio de lupa ZEISS (Stemi SV6).

As larvas foram lavadas em H₂O destilada e secas em papel de filtro e seu conteúdo intestinal foi retirado com leve pressão, para evitar contaminação pelo alimento o que poderia mascarar os resultados.

As pupas e imagos foram inicialmente separadas quanto ao sexo e casta (Figura 4). Não foi necessário fazer a limpeza desses indivíduos, já que nessas fases, a célula de cria se encontra sem alimento.



Figura 4- Pupas de Rainha, Operária e Macho de *Melipona scutellaris*.

Todas as amostras a serem analisadas foram, individualmente, colocadas em tubos "ependorf" de 1,5 ml, maceradas para homogeneização, com bastão de vidro de ponta arredondada no formato do tubo, a 0°C com 100 a 450 µl do tampão da amostra (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,8, contendo glicerol a 10%) e centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos, em câmara fria. A porção de 10 µl do sobrenadante foi, então, utilizada para aplicação nos pocinhos formados no gel, para 10 amostras.

III.2.2. Tratamento com HJ

Para o tratamento de larvas pré-defecantes foi utilizado o HJ I da Sigma por este ter sido o mais eficiente na transformação de rainhas, em *M. scutellaris* (BONETTI *et al.*, 1995).

As larvas foram separadas em dois grupos. Um dos grupos recebeu tratamento com HJ e o outro foi mantido como controle.

O tratamento constou da aplicação tópica de 1µl do HJ I dissolvido em acetona, na concentração de 0,05µg de HJ/ µl de acetona. As larvas tratadas ou não foram colocadas em placas de Petri forradas com papel de filtro e mantidas em estufa com temperatura média de 32-33 °C e umidade relativa de aproximadamente 85%, obtida por meio de solução saturada de KCl (ASTM, 1951) até atingirem o momento desejado para análise.

As amostras que receberam tratamento com HJ foram coletadas, assim como as não tratadas (controle) após os seguintes períodos de tempo: 12 horas após o tratamento, 36 horas após o tratamento, 60 horas após o tratamento, 6 dias após o tratamento e 10 dias após o tratamento.

As amostras ao atingirem o momento desejado eram separadas e congeladas a -80 °C para posterior análise.

III.2.3. Preparação dos géis

Foram preparados mini-géis de poliacrilamida (PAGE-não desnaturante) em placa, com o gel de separação nas concentrações de 8 e 10%, utilizando o Tampão do Gel (2M Tris-HCl, pH 8,8). Foi utilizado o gel de empilhamento preparado com o tampão 2M Tris-glicina pH 6,8.

Nas Tabelas 1 e 2 estão sumarizados os volumes de água e soluções estoque necessários para o preparo dos géis:

Tabela 1. Gel de Separação-Minigel

componentes	volumes	
	8%	10%
concentração do gel	8%	10%
Tris-HCl 2M pH 8,8	1,17ml	1,17ml
Acrilamida-Bis	1,67ml	2,07ml
Água Desionizada	3,33ml	2,93ml
Persulfato de Amônia 10%	37,5 μ l	37,5 μ l
TEMED	7,5 μ l	7,5 μ l

Tabela 2. Gel de Empilhamento-Minigel

componentes	volumes
Tris-HCl 2M pH 6,8	250 μ l
Acrilamida-Bis	650 μ l
Água Desionizada	3,04ml
Persulfato de Amônia 10%	35 μ l
TEMED	5 μ l

III.2.4. Condições da eletroforese

Os géis foram submetidos à eletroforese por 4 horas, em fonte Power PAC 3000 BIO RAD, a uma voltagem constante de 200V, em câmara fria à 4°C. Foi utilizado o tampão Tris-Glicina pH 8,3 (Tris 0,0125 M, Glicina 0,096 M) para preenchimento dos compartimentos superior e inferior da cuba.

III.2.5. Revelação das regiões de atividade esterásica

Anteriormente à coloração, os géis foram pré-incubados em cubas de plástico por 30 minutos, à temperatura ambiente, em 30 ml do tampão fosfato 0,1 M, pH 6,2. Após este período, o tampão era retirado e os géis submetidos à coloração.

Foram testados os seguintes ésteres de naftil:

α -naftil acetato e β -naftil acetato; α -naftil propionato e β -naftil propionato.

Para cada gel foi preparada a seguinte solução de coloração:

10 mg de α -naftil (acetato ou propionato) e 10 mg de β -naftil (acetato ou propionato) foram dissolvidos em 1 ml de acetona e misturados com uma solução recém-preparada e filtrada, contendo 30 ml de tampão fosfato, 3 ml de álcool metílico e 36 mg de Fast Blue RR Salt. A solução resultante era acondicionada em cuba plástica com o gel, o qual foi submetido à coloração por 45 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após a coloração os géis foram tratados com 30 ml de uma solução de descoloração contendo álcool etílico comercial/ ácido acético/ água, na proporção de 5:1:5, por 24 a 48 horas (STEINER & JOHNSON, 1973) e, posteriormente, secos entre papéis celofane e fotografados. As esterases eram visualizadas nos géis como bandas de coloração preta ou vermelha.

III.2.6. Secagem dos géis

Os géis, após retirados da solução de descoloração, foram prensados entre duas folhas de papel celofane, em bastidores fixados por garras (com cuidado para não haver formação de bolhas) e deixados à temperatura ambiente por 3 a 4 dias para a secagem. Com este procedimento os géis desidratam, transformando-se em uma fina película entre as folhas de celofane, que pode ser recortada e guardada para análise posterior.

III.2.7. Dosagem de proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas segundo o método de BRADFORD (1976) utilizando-se a soro albumina bovina como padrão. A dosagem de proteínas é importante para que sejam utilizadas somente amostras com quantidades equivalentes de proteínas, já que as abelhas estudadas se encontram em diferentes fases de desenvolvimento e com diferentes concentrações de proteínas. As amostras de proteína eram homogeneizadas em solução de Tampão da Amostra que é composto por Tris, que nesse método de dosagem de proteínas não interfere nos resultados. As medidas de absorbância foram realizadas a 595 nm, num espectrofotômetro GBC UV/VIS 911A da CG Analytical.

IV. RESULTADOS

Com o objetivo de realizar um estudo comparativo das esterases presentes nas diferentes fases do desenvolvimento de *M. scutellaris* foram preparados géis com amostras desde larvas de 1º estágio até adultos.

Precedendo aos experimentos de análise eletroforética, foram realizadas dosagens de proteínas das amostras analisadas (Tabela 3). Essa dosagem foi importante para que fossem feitas análises eletroforéticas de amostras das várias fases do desenvolvimento, com concentrações equivalentes de proteínas. Os dados de dosagem mostraram em média (3 repetições por estágio) os seguintes valores para cada estágio:

Tabela 3. Dosagem de proteínas para cada estágio de desenvolvimento de *M. scutellaris*.

Estágio de Desenvolvimento	Quantidade de Proteína (mg/ml)
Larva L1	2,0
Larva L2	3,5
Larva L3	5,0
Larva Pré-Defecante (LPD)	8,0
Larva Defecante (LD)	10,0
Pupa (POB)	12,0
Pupa (POR)	12,0
Pupa (POM)	11,0
Pupa (POP)	11,0
Pupa (PPC)	13,0
Pupa (PPP)	13,0
Abelha Nascente (AN)	6,0
Adulto (A)	9,0

Os padrões de atividade esterásica obtidos nos géis foram identificados e numerados de acordo com a mobilidade eletroforética, a partir da banda mais anódica, esterase 1 (EST-1) e assim sucessivamente até a mais catódica, esterase 10 (EST-10).

IV.1. Padrão de esterases durante o desenvolvimento ontogenético

Considerando-se os diferentes estágios, desde L1 até Adultos, detectou-se um total de 10 regiões com atividade esterásica em *M. scutellaris*.

Os resultados das análises eletroforéticas das esterases revelaram mudanças nas atividades dessas enzimas durante o desenvolvimento pós-embrionário de *M. scutellaris*.

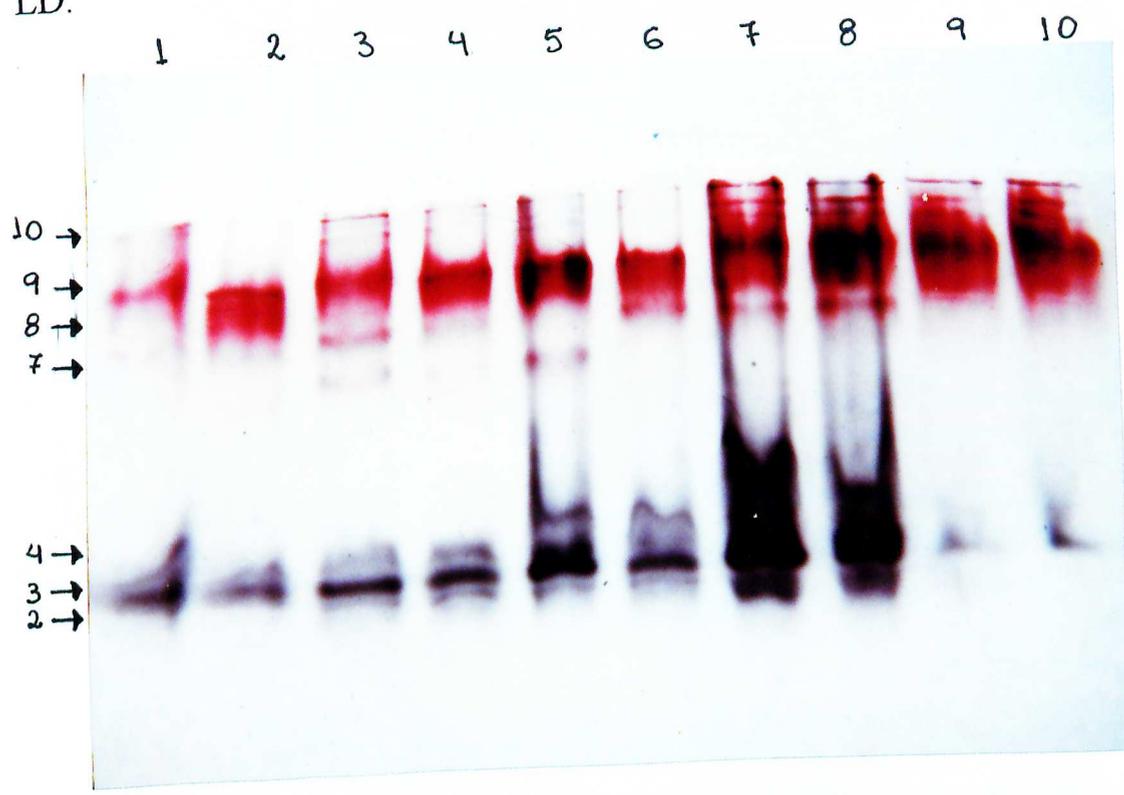
Nas Figuras 5 e 6 estão representados os padrões de bandas com atividade eletroforética dos estágios larvais.

Em larvas de 1º e 2º estágios (L1 e L2) foi possível detectar até 6 bandas com atividade esterásica, denominadas, respectivamente, EST-2, EST-3, EST-4, EST-7, EST-8 e EST-9. Para L1 e L2 o perfil esterásico apresentado foi o mesmo.

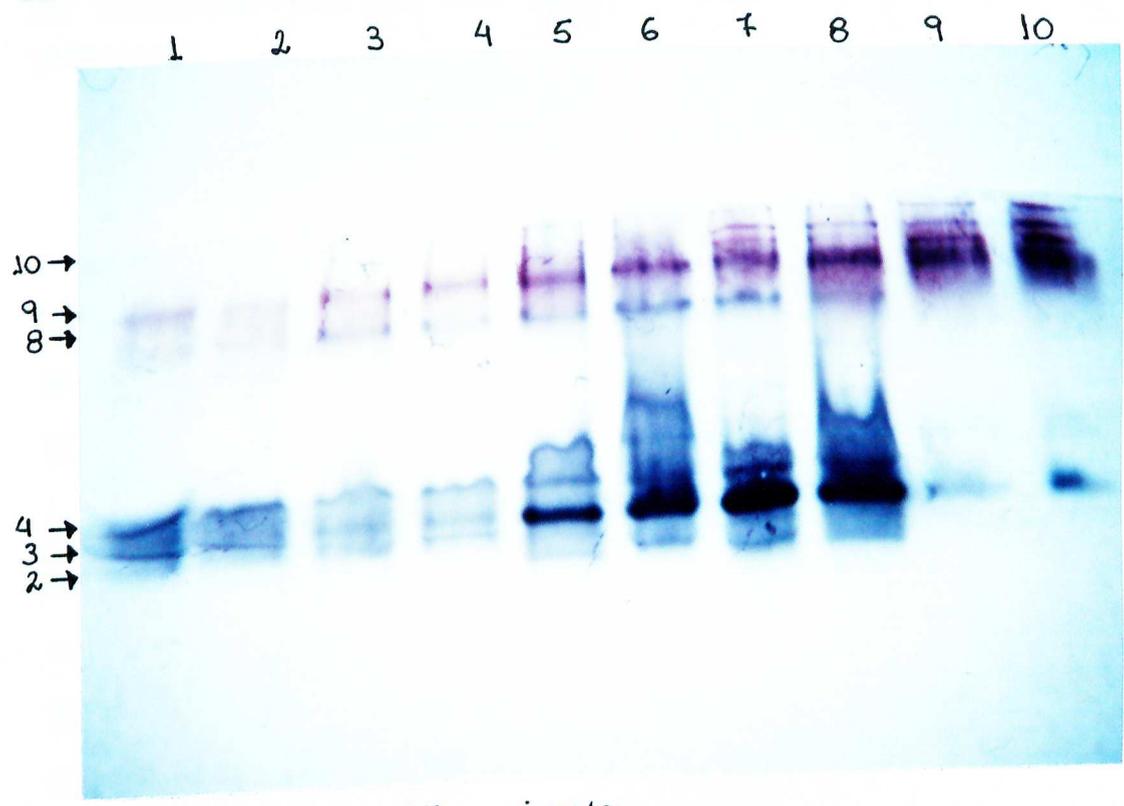
Em larvas de 3º estágio (L3) verificou-se até 7 bandas com atividade esterásica, sendo que, além das bandas presentes nas fases anteriores (EST-2, EST-3, EST-4, EST-7, EST-8 e EST-9) ocorreu uma outra banda com atividade esterásica, denominada EST-1.

Na fase de larva pré-defecante (LPD) o número de bandas com atividade esterásica aumentou para 8, incluindo a banda EST-10, além das anteriores (EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-7, EST-8 e EST-9). Nessa fase ocorreu o maior número de bandas com atividade esterásica, verificado durante todo o desenvolvimento ontogenético pós-embrionário.

Figura 5 (A e B)- Esterases no desenvolvimento ontogenético pós-embriônico de *M. scutellaris*: 1-2, L1; 3-4, L2; 5-6, L3; 7-8, LPD; 9-10, LD.



5.A-substrato α e β -naftil acetato.



5.B- substrato α e β -naftil propionato.

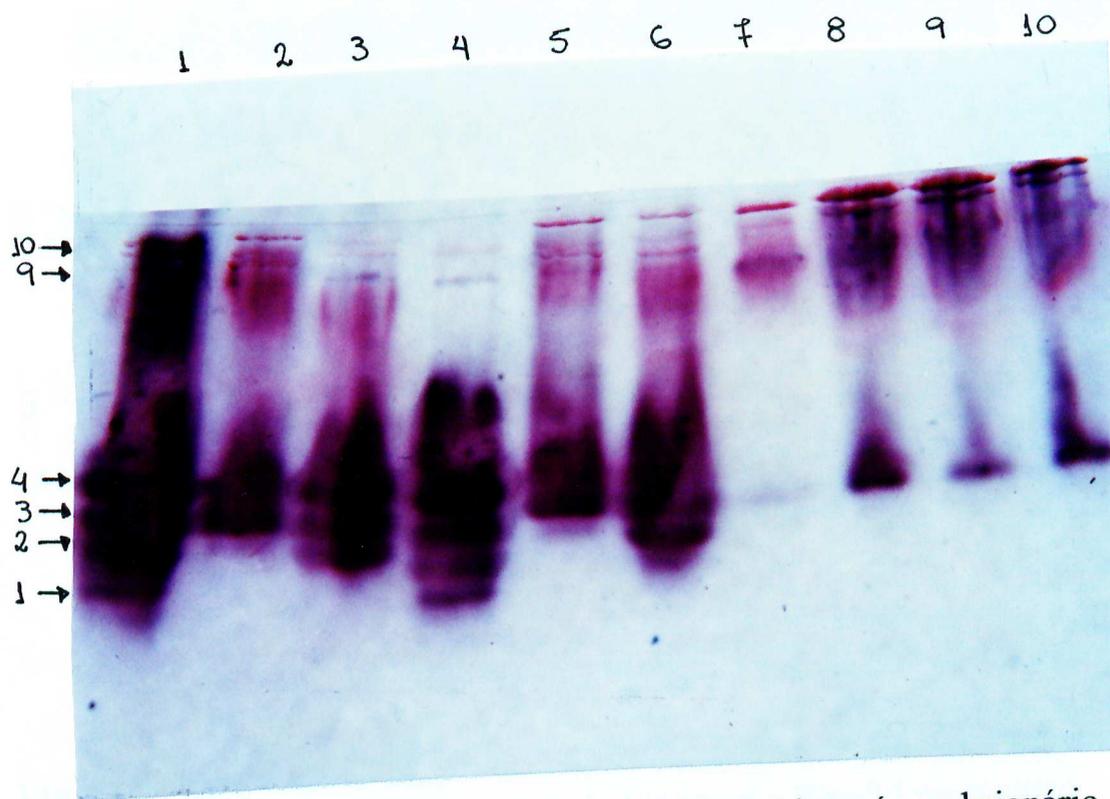


Figura 6- Esterases no desenvolvimento ontogenético pós-embriônico de *M. scutellaris*: 1-3, L3; 4-6, LPD; 7-10, LD. Substrato α e β -naftil propionato.

Em larvas defecantes (LD) última fase do desenvolvimento larval, o número de bandas com atividade esterásica caiu abruptamente para 4. Nesta fase estão presentes somente as bandas esterásicas EST-3, EST-4, EST-9 e EST-10.

O perfil eletroforético das pupas foi praticamente o mesmo durante os estágios de pupa. Nessa fase aparecem duas novas bandas de atividade esterásica que são específicas da fase de pupa, denominadas de EST-5 e EST-6, além das bandas verificadas na fase de LD (EST-3, EST-4, EST-9 e EST-10). Ao todo, na fase de pupa ocorrem até 6 bandas de atividade esterásica (Figuras 7, 8 e 9).

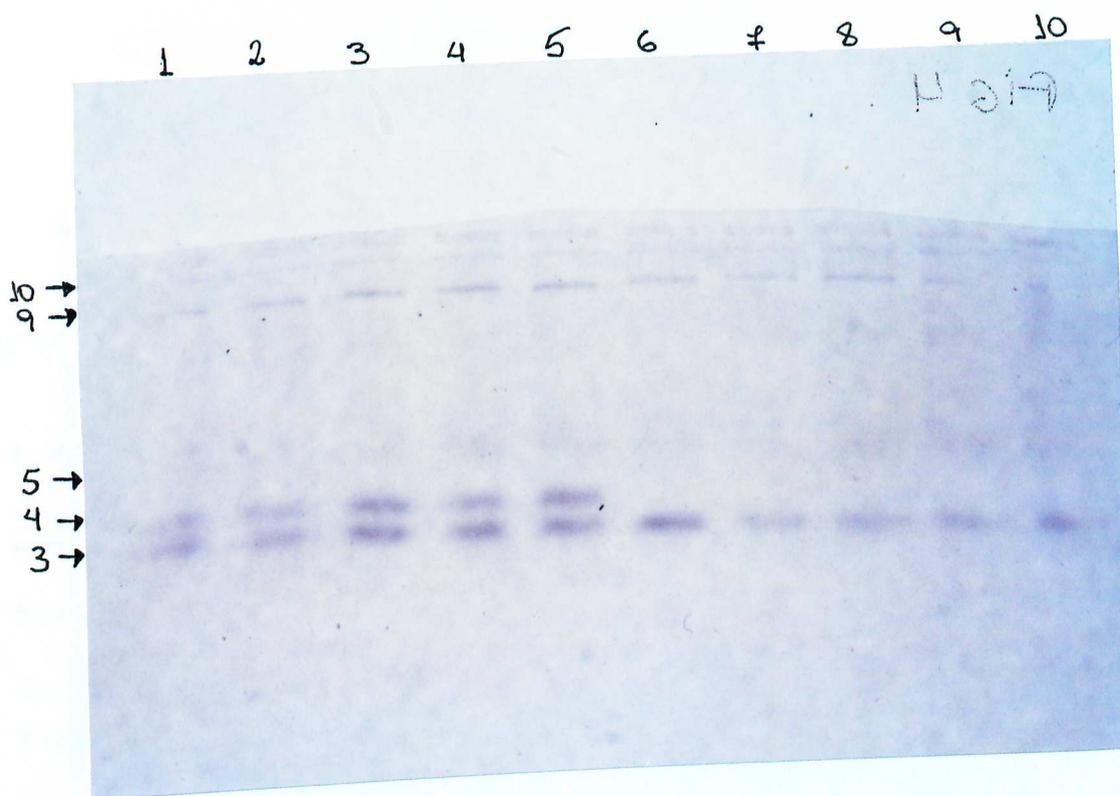


Figura 7- Esterases no desenvolvimento ontogenético pós-embriônico de *M. scutellaris*: 1-5, POB; 6-10, POR. Substrato α e β -naftil propionato.

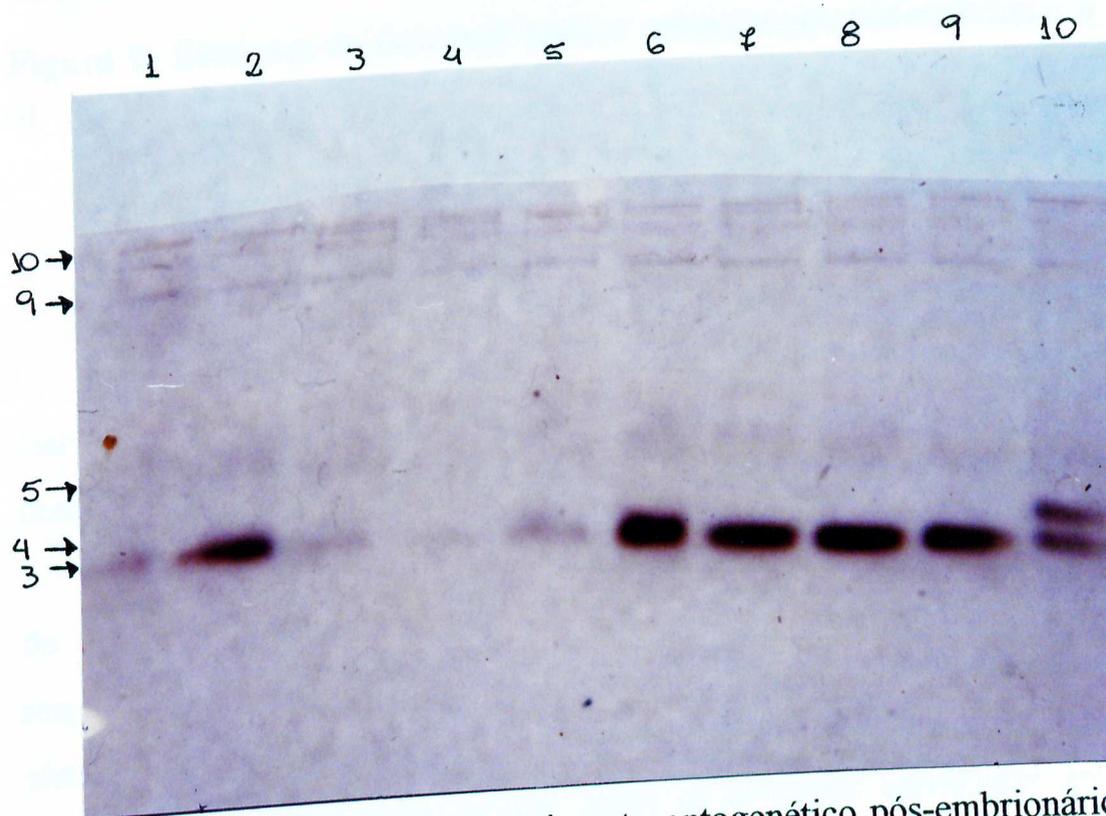


Figura 8- Esterases no desenvolvimento ontogenético pós-embriônico de *M. scutellaris*: 1-5, POM; 6-10, POP. Substrato α e β -naftil propionato.

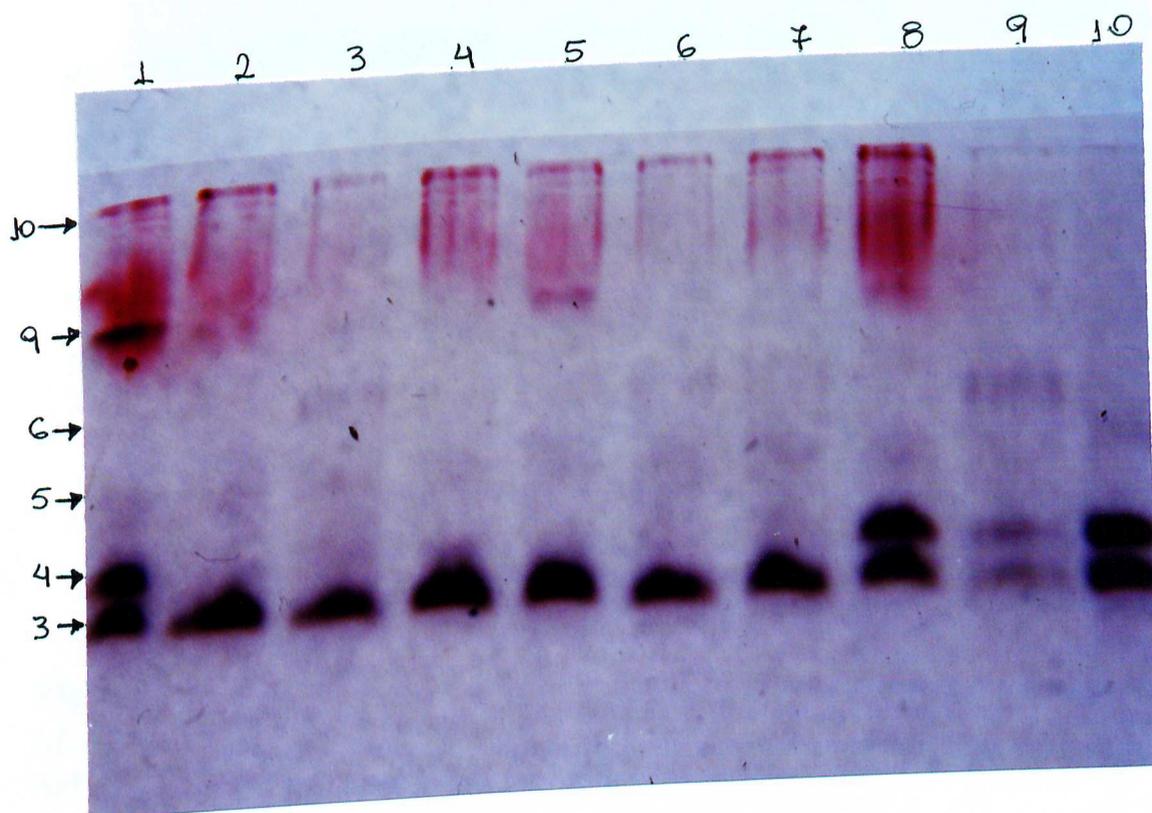


Figura 9- Esterases no desenvolvimento ontogenético pós-embrionário de *M. scutellaris*: 1-5, PPC; 6-10, PPP. Substrato α e β -naftil propionato.

Na abelha nascente (AN) estão presentes até 5 bandas de atividade esterásica (EST-2, EST-3, EST-4, EST-9 e EST-10). Nesse estágio desaparecem as bandas EST-5 e EST-6.

Em adultos (A) verifica-se, além das bandas de atividade esterásica do estágio anterior (EST-2, EST-3, EST-4, EST-9 e EST-10) o reaparecimento da EST-1. As Figuras 10 e 11 mostram o perfil eletroforético de AN e A.

Na Figura 12 estão representadas todas as esterases verificadas em *M. scutellaris*, bem como a sua ocorrência em cada fase do desenvolvimento.

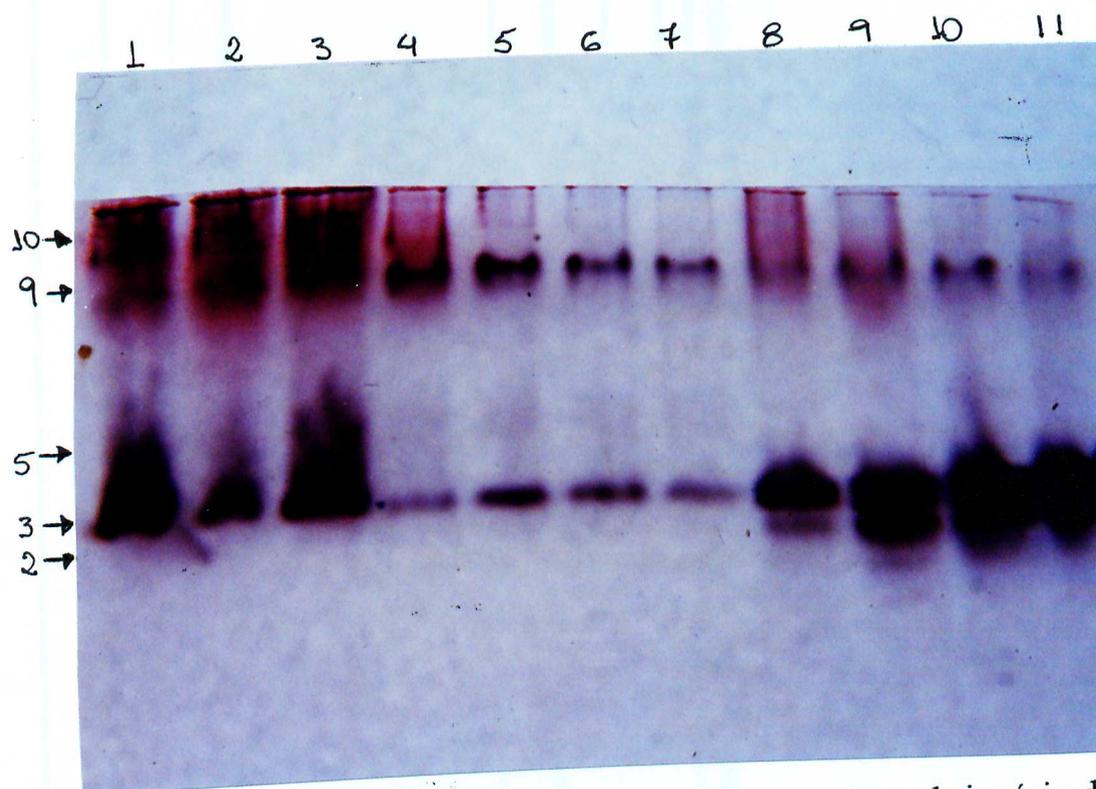


Figura 10- Esterases no desenvolvimento ontogenético pós-embriônico de *M. scutellaris*: 1-3, POP; 4-5, PPC; 6-7 PPP; 8-10 AN. Substrato α e β -naftil propionato.

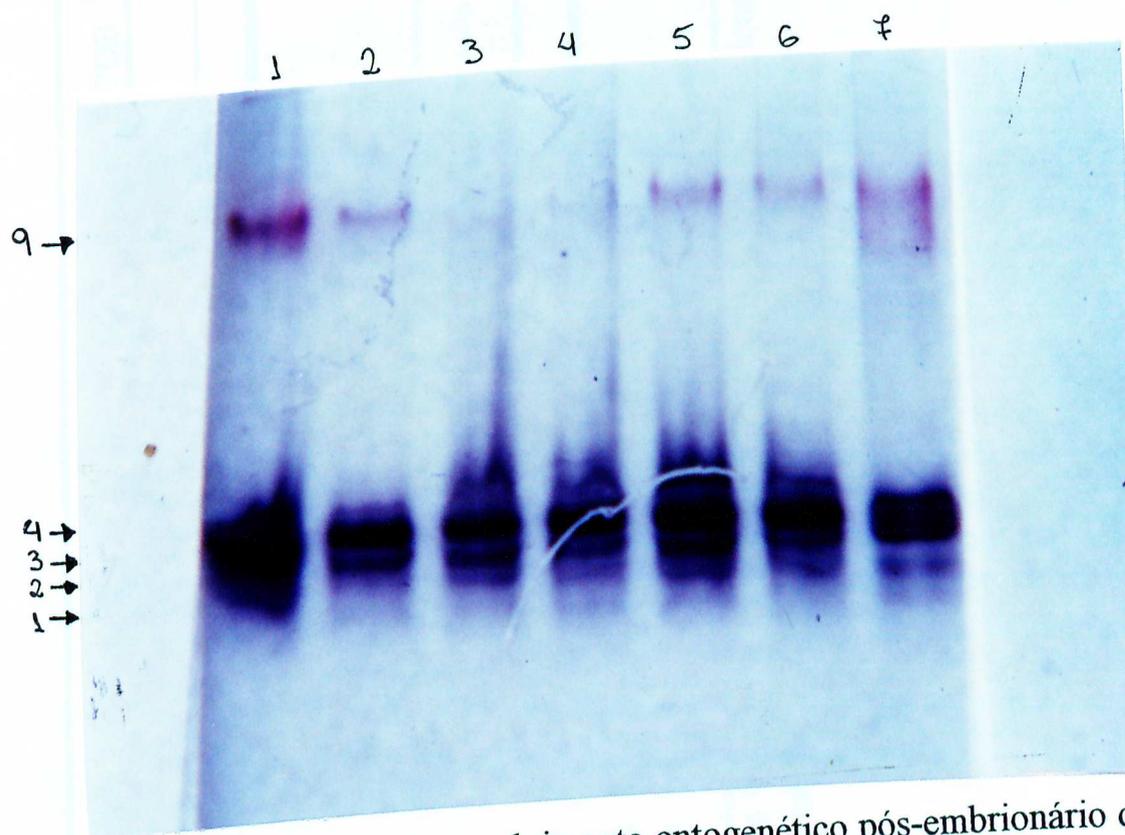


Figura 11- Esterases no desenvolvimento ontogenético pós-embriônico de *M. scutellaris*: 1-7, A. Substrato α e β -naftil propionato.

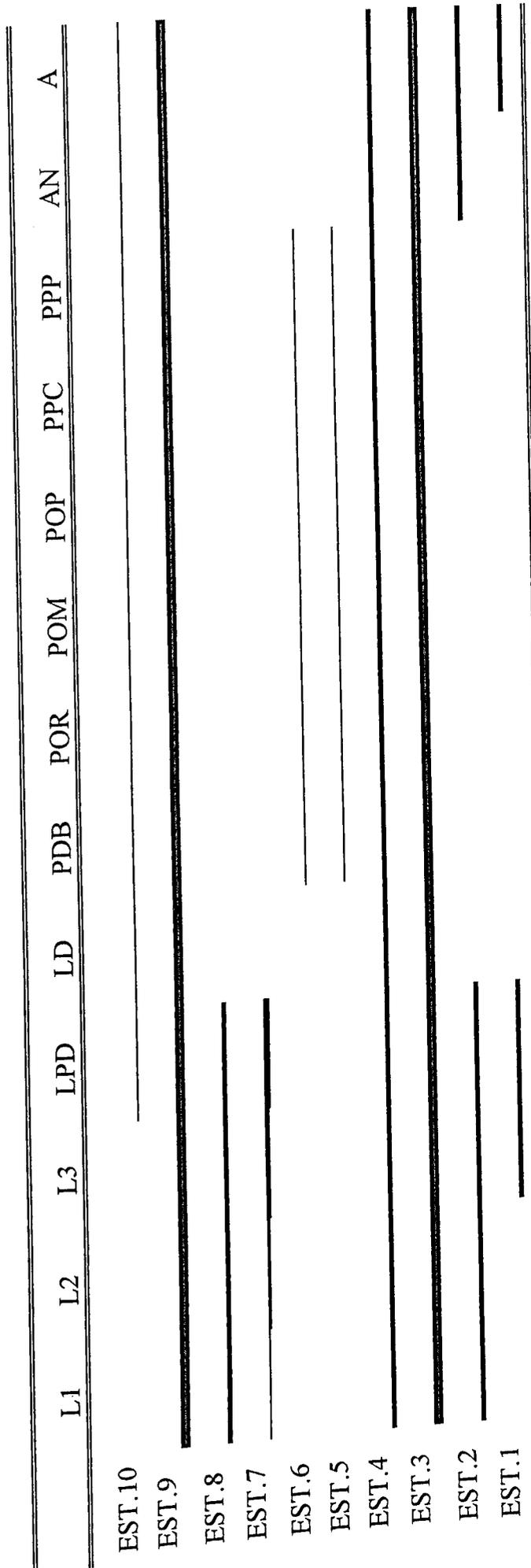


Figura 9- Desenho esquemático dos padrões eletroforéticos de esterases detectadas durante o desenvolvimento ontogenético pós-embrionário de *M. scutellaris*.

Instituto de Física da Universidade de São Paulo
 São Carlos, SP, Brasil

As esterases EST.3, EST.4 e EST.9 são encontradas durante todo o desenvolvimento pós-embrionário dessas abelhas, enquanto as demais (EST-1, EST-2, EST-5, EST-6, EST-7, EST-8 e EST-10) apresentam variações quanto à ocorrência e intensidade, durante o desenvolvimento:

EST-1: presente em L3, LPD e Adultos.

EST-2: ocorre em L1, L2, L3, LPD, AN e Adultos.

EST-3: presente em todas as fases do desenvolvimento pós-embrionário. É a banda do tipo α -esterase, mais intensa.

EST-4: presente em todas as fases do desenvolvimento pós-embrionário.

EST-5 e EST-6: restritas às fases de pupa (POB, POR, POM, POP, PPC e PPP) e são bandas de intensidade fraca.

EST-7 e EST-8: predominam nos estágios larvais anteriores à fase em que a larva se torna defecante (L1, L2, L3 e LPD) desaparecendo nessa fase (LD). A EST-7 tem praticamente a mesma intensidade em todas as fases larvais e a EST-8 tem sua intensidade aumentada a partir da fase de L1 até LPD.

EST-9 está presente em todo o desenvolvimento ontogenético pós-embrionário. Apresenta-se como uma banda de atividade muito intensa.

EST.-10: aparece na fase de LPD e continua até Adulto. No entanto, essa esterase ocorre sempre com fraca intensidade.

IV.2. Esterases em Rainhas, Operárias e Machos

Conforme mostra a Figura 13 não foram observadas diferenças no perfil eletroforético das esterases entre pupas e adultos de Rainhas, Operárias e Machos.

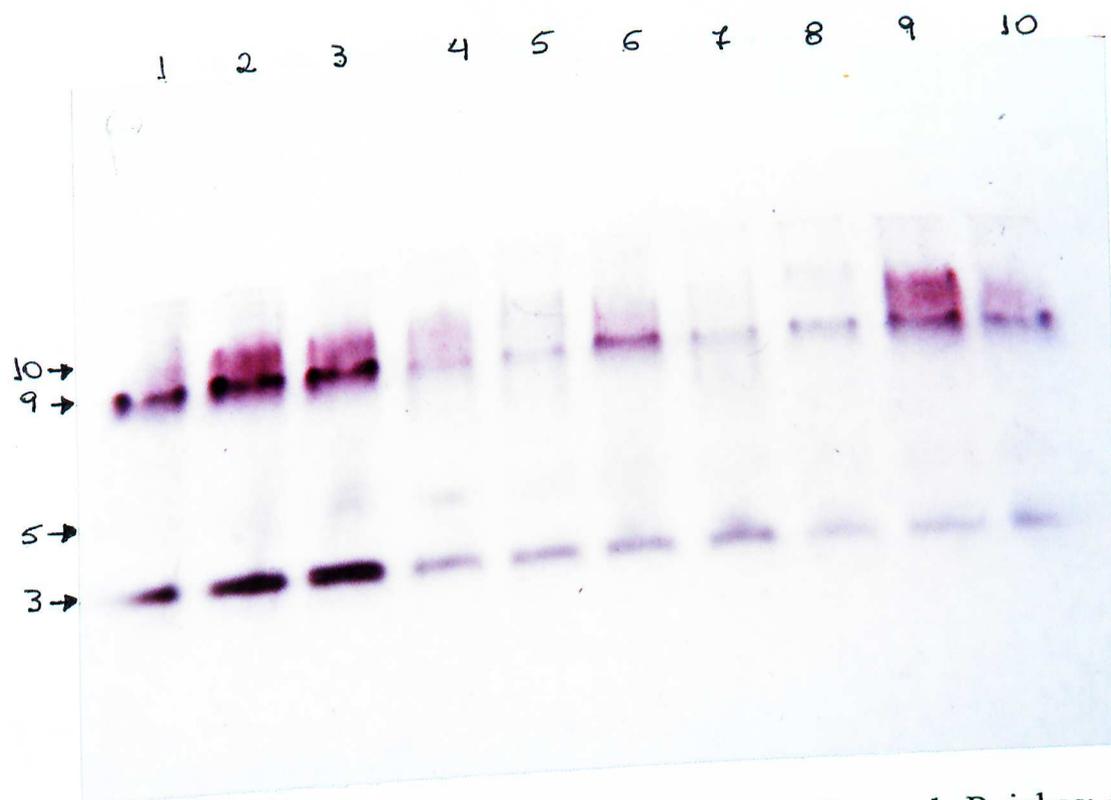


Figura 13-Perfil de esterases em *M. scutellaris*: 1-3, Pupas de Rainhas; 4-7, Pupas de Operárias; 8-10, Pupas de Machos. Substrato α e β -naftil propionato.

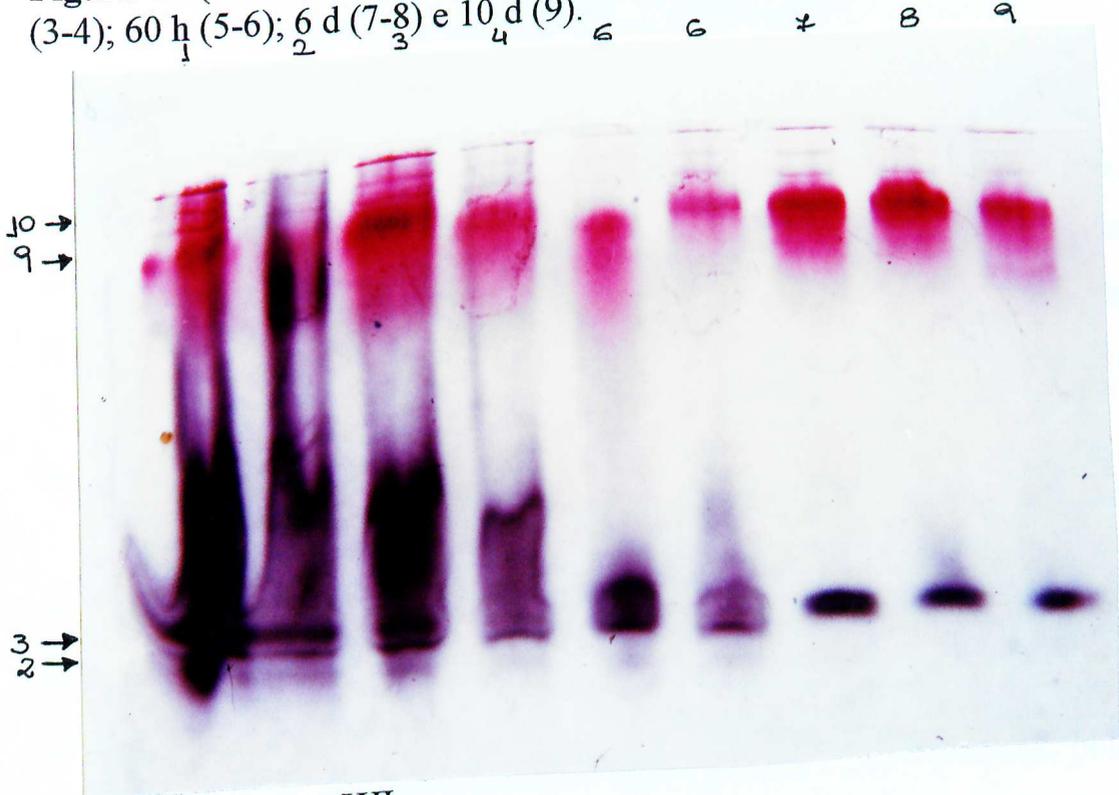
IV.3. Esterases em indivíduos tratados ou não com HJI

Após ter sido definido o padrão eletroforético das esterases durante o desenvolvimento ontogenético pós-embrionário de *M. scutellaris*, foram feitos experimentos com o objetivo de se observar possíveis alterações induzidas pelo tratamento de larvas pré-defecantes com HJI.

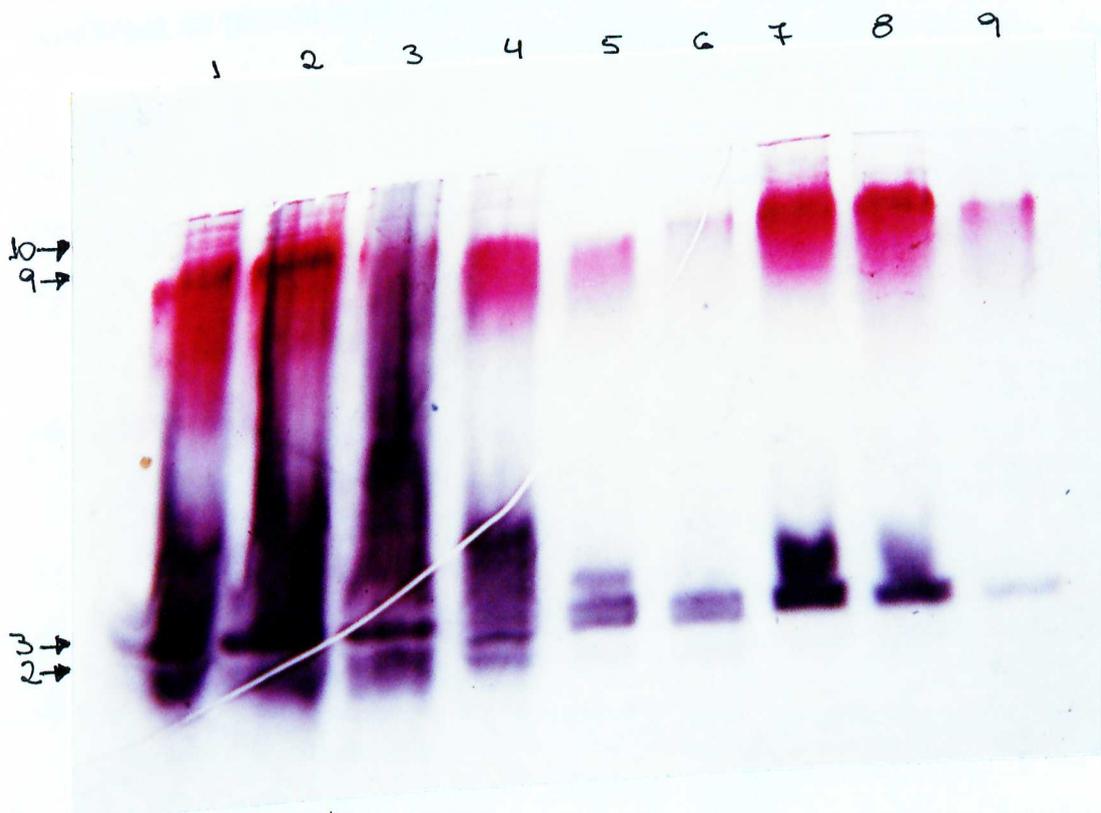
Indivíduos tratados e não tratados (controle) foram coletados em diferentes momentos do desenvolvimento após a aplicação do HJI (12 h, 36 h, 60 h, 6 d e 10 d após tratamento) e congelados. Amostras com 12 h, 36 h, 60 h e 6 d encontravam-se na fase de LD e as amostras com 10 d já haviam sofrido metamorfose para POB de rainha, no caso de amostras tratadas com HJI e de operária, no caso de amostras do grupo controle.

Os resultados referentes à análise do perfil esterásico de amostras tratadas ou não com HJI estão ilustrados na Figura 14.

Figura 14 (A e B)- Perfil de esterases em indivíduos com 12 h (1-2); 36 h (3-4); 60 h (5-6); 6 d (7-8) e 10 d (9).



14 A- tratados com HJI.



14 B- sem tratamento.

A análise revelou não ter havido alteração no padrão das esterases sob efeito do HJI quando se comparou com amostras não tratadas.

V. DISCUSSÃO

Abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* constituem-se em um modelo ideal para estudos de expressão gênica, visto que nessas abelhas, os genes feminizantes estão totalmente ativos em rainhas (fêmeas completas) parcialmente ativos em operárias e quase inativos em machos. Além disso, é possível, via manipulação experimental, ativar genes feminizantes nas larvas.

O padrão esterásico obtido com α e β -naftil acetato foi muito semelhante ao padrão verificado com α e β -naftil propionato, embora esse último possibilite melhor resolução das bandas, assim como ocorre para *M. quadrifasciata* (BONETTI, 1990).

As bandas de EST-1 a EST-6 são específicas de α -esterase, pois só aparecem na presença de ésteres α -naftil.

As bandas de EST-7 e EST-9 são do tipo α e/ou β -esterase, desde que podem ser coradas em presença de um e/ou de outro éster de naftil, mas a banda EST-9 aparece mais intensamente corada com éster de β -naftil.

A banda EST-10 é específica de β -esterase e só aparece na presença de éster de β -naftil.

Considerando-se que o enfoque deste trabalho centrou-se na análise da expressão gênica manifestada pelo fenótipo esterásico durante o desenvolvimento pós-embriônico, não nos detivemos nos estudos dos prováveis polimorfismos que ocorrem, tão pouco na variabilidade alélica.

As abelhas, como insetos holometábolos, apresentam quatro fases de desenvolvimento ontogenético, a saber, os estágios de embrião, larva, pupa e adulto. Dessa maneira, as necessidades enzimáticas para o desempenho metabólico das atividades tecido-específicas variam em cada fase do

desenvolvimento. Assim, algumas enzimas podem ser requeridas e apresentar atividade na fase embrionária, desaparecer nas fases de larva e de pupa, voltando a serem necessárias na fase adulta.

As bandas correspondentes às EST-3 e EST-9 ocorreram em todas as fases do desenvolvimento, aparecendo sempre, em todos os géis, enquanto as demais (EST-1, EST-2, EST-5, EST-6, EST-7, EST-8 e EST-10) mostraram-se estágio-específicas e, mesmo dentro do estágio considerado, nem sempre eram visíveis em todos os géis. A EST-4, apesar de ocorrer em todas as fases do desenvolvimento, não aparecia em todas as repetições.

O tempo de duração das diferentes fases do desenvolvimento varia entre espécies e, algumas vezes, entre indivíduos da mesma espécie; além disso, diferença de poucas horas pode ser muito importante, quando se considera o "ligar" e o "desligar" de genes e os títulos de enzimas correspondentes.

A atividade de algumas enzimas aumenta, diminui ou não é detectada em épocas definidas, no decorrer do desenvolvimento de vários organismos, o que indica que o processo do desenvolvimento é controlado direta ou indiretamente por mudanças no padrão de expressão gênica.

O fato de uma atividade esterásica aparecer no fenótipo em dado momento do desenvolvimento, desaparecer em outro e voltar a mostrar expressão mais tarde, pode significar síntese "de novo" da enzima ou ativação de formas pré-existentes da própria enzima, em circulação.

No presente trabalho foram analisadas, quanto à ocorrência de esterases, treze momentos do desenvolvimento de *M. scutellaris* (L1, L2, L3, LPD, LD, POB, POR, POM, POP, PPC, PPP, AN e A).

Resultados mostraram que ocorrem variações na atividade das esterases durante o desenvolvimento pós-embrionário dessas abelhas, as quais incluem síntese de novas esterases, perda e/ou recuperação de

atividade de esterases pré-existent. Essas variações permitiram designar 7 fenótipos esterásicos distintos: 1- fenótipo de larvas L1 e L2, 2- fenótipo de larva L3, 3- fenótipo de larva pré-defecante (LPD), 4- fenótipo de larva defecante (LD), 5- fenótipo de pupas (POB a PPP), 6- fenótipo de abelha nascente (AN) e 7- fenótipo de adulto.

BONETTI (1990) determinou os padrões eletroforéticos para esterases durante estágios do desenvolvimento de *Melipona quadrifasciata* e determinou que o perfil eletroforético mostrou diferenças com relação ao número e intensidade de atividade das esterases, durante o desenvolvimento. O número de esterases nos estágios de larvas e adultos foi maior que o encontrado em pupas, sendo que a partir do estágio de POP, formas esterásicas do estágio larval começavam a reaparecer, algumas com fraca intensidade, consolidando-se desta fase em diante o reaparecimento das esterases da fase larval. No adulto foi detectada uma região de atividade característica.

Neste trabalho também determinou-se esterases da fase larval que voltaram a aparecer somente nos estágios de AN e A. Nos estágios de pupa houve uma diminuição das esterases que estavam presentes nas fases anteriores, mas foi possível verificar a ocorrência de novas bandas de atividade esterásica que, embora de fraca atividade, estavam presentes somente nestes estágios. Também determinou-se esterases características dos estágios larvais. No entanto não houve nenhuma esterase que fosse característica apenas do estágio de adulto.

Considerando-se que o aumento do número de esterases corresponde a um aumento na quantidade de HJ circulante, no sentido de metabolizar tal hormônio, os dados indicam que em abelhas sem ferrão *M.scutellaris*, a quantidade de HJ não deve seguir o mesmo padrão verificado em outros insetos, pois, ocorre um aumento de esterases nas fases larvais que

antecedem a metamorfose. Certamente, essas esterases ocorrem justamente para retirar da hemolinfa o HJ, no entanto, ele está ocorrendo aí em alto nível, nesse momento e deve estar sendo requerido para, direta ou indiretamente, induzir a expressão de alguns genes. Propõe-se que sejam os genes feminizantes, que atuam no processo de diferenciação de castas nessas abelhas.

O maior número de regiões com atividade esterásica (8 bandas) ocorreu em LPD, exatamente na janela temporal decisiva para diferenciação de castas nessas abelhas. Isso coincide com o verificado, em *Apis mellifera*, para o padrão de transcrição em RNAm que ocorre em rainhas e operárias, quando o maior número de transcritos ocorreu às 156 h do desenvolvimento (pré-pupas) de rainhas, fase que antecede imediatamente à pupação (SEVERSON *et al.*, 1989).

Segundo FIGUEIREDO (1993), em *Apis mellifera* o número de esterases aumenta no decorrer do desenvolvimento, atingindo o número máximo, em pupas, em processo de pigmentação, enquanto que diminui em adultos, sendo que os estágios de larva e adulto, apresentam as maiores variações no número dessas enzimas. Em *Melipona*, conforme verificado no desenvolvimento da presente investigação, o maior número de bandas esterásicas ocorre em larva pré-defecante e decai em larva defecante, contrariando o verificado por aquela autora em *Apis*.

Segundo JONES *et al.* (1982) HJE específicas podem ser diferenciadas de outras esterases, presentes na hemolinfa de insetos, por aparecerem na hemolinfa durante o último estágio larval, mais precisamente próximo à metamorfose. Vários estudos foram realizados para identificar HJE específicas e os resultados desses trabalhos revelaram que as maiores variações qualitativas e quantitativas das esterases, na

hemolinfa, ocorrem durante o último estágio larval dos insetos, devido à presença de HJE específicas.

Dentre as esterases detectadas, as que poderiam ser aqui relacionadas com a degradação de HJ, devido a sua ocorrência e atividade em larvas e adultos, são as EST-1 e EST-2 que permaneceram ausentes em pupas, estágio em que, segundo dados da literatura para a maioria dos insetos, os níveis de HJ são muito baixos.

As EST-7 e EST-8 são detectadas apenas nas fases larvais, desaparecendo a partir de LD e não voltando a ocorrer em nenhum outro estágio do desenvolvimento. Devido a essa característica, quanto à ocorrência, estão sendo consideradas larva-específicas.

As EST-5 e EST-6 ocorrem somente nos estágios de pupa (POB, POR, POM, POP, PPC e PPP) e embora os resultados não nos permitam concluir sobre sua real função, sugerimos que estejam relacionadas com o processo de maturação e funcionamento do aparelho reprodutor, o qual foi determinado pelos genes *xo* no início do desenvolvimento embrionário.

A EST-10, que começa a mostrar atividade em LPD, continua durante todas as fases de pupa, estendendo sua atividade, embora com fraca intensidade, em adultos, também pode estar relacionada com o amadurecimento e funcionamento dos órgãos reprodutores. Essa hipótese se sustenta pelo fato de termos verificado que essa região esterásica apresenta intensidade diferenciada em rainhas, fêmeas com desenvolvimento completo dos órgãos reprodutores e operárias, onde os órgãos reprodutores, embora funcionais, são atrofiados.

Em *D. virilis* também ocorrem esterases específicas da fase de pupa (KOROCHKIN & MATVEEVA, 1974).

As EST-3, EST-4 e EST-9 não se caracterizam como estágio-específicas, podem ocorrer durante todo o desenvolvimento, com pequenas

diferenças de intensidade ao longo do tempo. Devem estar relacionadas com o metabolismo de produtos de genes transcritos constitutivamente durante o desenvolvimento, para atender demandas de energia para crescimento, metamorfose, reprodução.

A aplicação tópica de HJ em larvas de *M. scutellaris* na fase LPD não promoveu alterações no padrão de esterases, a partir do momento de aplicação. O tamanho da amostra (pequeno) e a fase de aplicação podem ter influenciado os resultados.

A comparação do padrão de esterases de pupas e adultos de rainhas, operárias e machos não revelou esterases sexo e casta específicas, ou seja, não foi possível verificar modificações de expressão gênica no fenótipo esterásico desses indivíduos.

Em *Melipona scutellaris*, assim como em *Melipona quadrifasciata* (BONETTI, 1990), não foi possível verificar diferenças casta-específicas quanto ao perfil esterásico. Isso pode indicar que esterases não se constituem em fator determinante e/ou limitante para a diferenciação de castas nessas abelhas.

Parâmetros da determinação de casta estão sendo investigados por meio da análise dos produtos de transcrição gênica de maneira similar como feito por SEVERSON *et al.* (1989) para *Apis mellifera*.

VI. RESUMO

No presente trabalho foi analisado o padrão eletroforético das esterases que ocorrem em *M. scutellaris*, durante o desenvolvimento ontogenético pós-embrionário, por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE não desnaturante).

O perfil das esterases mostrou-se como segue:

- Um total de dez regiões com atividade esterásica, considerando os diversos estágios do desenvolvimento.
- As variações que ocorrem na atividade das esterases, nos estágios, permitiram enumerar sete fenótipos esterásicos para os treze estágios de desenvolvimento analisados: 1- fenótipo de larvas L1 e L2, 2- fenótipo de larva L3, 3- fenótipo de larva pré-defecante (LPD), 4- fenótipo de larva defecante (LD), 5- fenótipo de pupas (POB a PPP), 6- fenótipo de abelha nascente (AN) e 7- fenótipo de adulto (A).
- O estágio de LPD foi o que apresentou maior número de bandas com atividade esterásica.
- As EST-1 e EST-2 ocorrem somente em estágios de larva e adultos e podem estar relacionadas com o metabolismo do HJ circulante.
- Duas bandas esterásicas, EST-7 e EST-8, mostraram atividade somente nas fases larvais e por esse motivo, foram consideradas larva-específicas.
- Na fase de pupa são identificadas duas bandas, EST-5 e EST-6, específicas dessa fase, que sugerimos estarem relacionadas a maturação e funcionamento do aparelho reprodutor. A banda EST-10, que se estende desde LPD até adultos também pode estar associada com a maturação e funcionamento dos órgãos reprodutores.
- Três regiões esterásicas, EST-3, EST-4 e EST-9 não se caracterizam como estágio-específicas, podem aparecer durante todo o desenvolvimento,

indicando que estejam associadas ao metabolismo de produtos gênicos constitutivos.

Foi feita, também uma análise preliminar do perfil esterásico de indivíduos tratados e não tratados com HJI com o objetivo de verificar se ocorrem diferenças na expressão fenotípica de esterases sob efeito do Hormônio Juvenil não se verificando, no entanto, qualquer alteração no perfil esterásico desses indivíduos.

Foram comparados os padrões eletroforéticos de esterases de rainhas, operárias e machos de *M. scutellaris*, não sendo possível caracterizar esterases sexo e casta específicas.

O fato de não podermos, até o momento, associar uma ou mais esterases ao mecanismo de determinação de castas nessas abelhas pode indicar que estas enzimas não estão entre os principais fatores determinantes e/ou limitantes para essa diferenciação. O estudo dos produtos de transcrição gênica, ao longo do desenvolvimento, possibilitará análise mais precisa.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ADJAMI A.M. & RIDDIFORD L.M. (1973). Comparative metabolism of the *Cecropia* Juvenile Hormone. **J. Insect. Physiol.** 19: 635-645.
- ALDRIDGE, W.N. (1953) Serum esterase. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenil acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. **Biochem. J.** 53:110-117.
- ALMEIDA, R.B.R. (1992). Perfil proteico e esterásico de zangões de *Apis mellifera* sob ação do HJIII. **Tese de Doutorado, FMRP-USP**, 97p.
- ASTM (1951). Recommended practice for maintaining constant relative humidity by means of aqueous solutions. **Book of ASTM Standards**, Part 6: 706-710.
- BEETSMA, J. (1979). The process of queen-worker differentiation in the honeybee. **Bee World** 60(1): 24-39.
- BERGOT, B.J.; JAMIESON, G.C.; RATCLIFF, M.A. & SCHOOLEY, D.A. (1980). JH zero: new naturally occurring insect juvenile hormone from developing embryos of the tobacco hornworm. **Science** 210: 336-338.
- BEZERRA, J.M.D. (1995). Aspectos da reprodução de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). **Tese de Mestrado, UFV**. Viçosa-MG, 65p.
- BITONDI, M.M.G. & MESTRINER, M.A. (1985). Effects of different thiol reagents on the electroforetic pattern of *Apis mellifera* esterase isozymes. **Braz. J. Genet.** 8: 5-15.
- BITONDI, M.M.G. & MESTRINER, M.A. (1983). Esterase isozymes of *Apis mellifera*: substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny, and eletroforetic variability. **Biochem. Genet.** 21: 985-1002.

- BONETTI, A.M. & KERR, W.E. (1985). Sex determination in bees XX. Estudo da ação gênica em *Melipona marginata* e *Melipona compressipes* a partir da análise morfométrica. **Braz. J. Genet.** 8(4): 629-638.
- BONETTI, A.M. (1982). Ação do Hormônio Juvenil sobre expressão gênica em *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Dissertação de Mestrado, F.M.R.P.-USP**, 151p.
- BONETTI, A.M. (1984). Efeitos do Hormônio Juvenil no desenvolvimento ovariano de *Melipona quadrifasciata*. **Rev. Bras. Biol.** 44(4): 509-516.
- BONETTI, A.M. (1990). Genética da determinação de casta em *Melipona*. Ação do Hormônio Juvenil sobre esterases e *corpora allata* e durante o desenvolvimento pós-embrionário. **Tese de Doutorado, F.M.R.P.- USP**, 165p
- BONETTI, A.M., KERR, W.E. & MATUSITA, S.H. (1995). Effects of Juvenile Hormones I,II and III, in single and fractionated dosage in *Melipona* bees. **Rev. Brasil. Biol.** 55 (Supl.1): 113-120.
- BOWNES, M. (1989). The role of Juvenile Hormone, ecdysone and the ovary in the control of *Drosophila* vitellogenesis. **J. Insect Physiol.** 35: 409-413.
- BRADFORD, M.M.,(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.
- BREWER, G.J. (1970). **Introduction to isozyme techniques**. N.Y., Academic Press, pp. 87.
- CAMARGO, J.M.F. (1989). Comentários sobre a sistemática de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). **Anais do XIV Simpósio Anual da ACIESP**, Suplemento: 41-46.

- CAMARGO, J.M.F. & PEDRO, S.R.M. (1992). Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie* **23**: 1-32.
- CAMPBELL, P.M., HEALY, M.J. & OAKESHOTT, J.G. (1992). Characterization of Juvenile Hormone Esterase in *Drosophila melanogaster* *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**(7): 665-677.
- CAMPOS, L.A.O. (1975). Determinação de casta no gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae). Papel do Hormônio Juvenil. *Dissertação de Mestrado, F.M.R.P.- USP*, 44p.
- CAMPOS, L.A.O. (1977). O Hormônio Juvenil nas abelhas: seu papel na diferenciação das castas e nos aspectos do controle social. *Tese de Doutorado, F.M.R.P.-USP*, 67p.
- CAMPOS, L.A.O. (1978). Sex determination in bees. VI. Effect of a Juvenile Hormone analogue in males and females of *Melipona quadrfasciata* (Apidae). *J. Kansas Ent. Soc.* **51**(2): 228-234.
- CAMPOS, L.A.O.; VELTHUIS, F.M. & VELTHUIS, H.H. (1975). Sex determination in bees. VII. Juvenile Hormone and caste determination in a stingless bee. *Naturwissenschaften* **62**(2): 98-99.
- CARRASCO, C.E., PÉREZ-CHIESA, Y & BRUCK, D. (1984). The esterases of *Drosophila dunni*. *Comp. Biochem. Physiol.* **79**(3): 375-378.
- CONKLE, M.T.; HODGKISS, P.D.; NUNNALLY, L.B. & HUNTER, S.C. (1982). *Starch Gel Electrophoresis of Conifer Seeds: a Laboratory Manual*. USDA, Pacific Southwest Forest and Range Experimental Station, 18p.
- DE KORT, C.A.D.; WIETEN, M. & KRAMER, S.J. (1979). The occurrence of Juvenile Hormone specific esterases in insects. A comparative study. *Proc. K. Ned. Akad. Wet. Ser. C* **82**: 325-331.

- DE KORT, C.A.D. & GRANGER, N.A. (1981). Regulation of Juvenile Hormone titer. **Ann. Rev. Entomol.** 26: 1-28.
- DEL LAMA, M.A.; LOBO, J.A., SOARES; A.E.E. & DEL LAMA, S.N. (1990). Genetic differentiation estimated by isozymic analysis of africanized honeybee populations from Brazil and from Central América. **Apidologie** 21: 271-280.
- DENLINGER, D.A. & TANAKA, S. (1989). Cycles of Juvenile Hormone Esterase activity during the Juvenile Hormone driven cycles of oxygen consumption in diapause of flesh flies. **Experientia** 45: 474-476.
- DOWNER, R.G.H.; WIEGAND, M. & SMITH, S.M. (1975). Suppression of pupal esterase activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by an insect growth regulator. **Experientia**, 31(10): 1239-1240.
- ENGELMANN, F. (1970). **The physiology of insect reproduction.** International series of monographs in pure and applied Biology. Ed. by Pegamon Press: 143-189.
- FALCÃO, T.M.M.A. & CONTEL, E.P.B. (1990). Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees. I. Isozyme patterns and polymorphism for esterases and total protein. **Braz. J. Genet.** 13(4): 731-754.
- FIGUEIREDO, V.L.C. (1993). Efeitos do composto organofosforado O,O-dimetil-O-(2,2-diclorovinil) fosfato (DDVP) sobre o desenvolvimento de operárias africanizadas (*Apis mellifera*). **Tese de Doutorado, FMRP-USP**, 111p.
- FROHLICH, D.R.; BRINDLEY, W.A.; BURRIS, T.E. & YOUSSEF, N.N. (1990). Esterase isozymes in a solitary bee, *Megachile rotundata* (Fab.): Characterization, developmental multiplicity, and adult variability. **Biochem. Genet.** 28: 347-358.

- GILBERT, L.I.; BOLLENBACHER, W.E.; GOODMAN, W.; SMITH, S.L.; AGUE, N.; GRANGER, N. & SEDLAK, B.J. (1980). Hormones controlling insect metamorphosis. N.Y., **Recent Prog. Hormone Res. Proc. Laurentian Hormone Conf.**; **36**: 441.
- GUNAWAN, S. & ENGELMANN, F. (1984). Esterolytic degradation of Juvenile hormone in the haemolymph of the adult female of *Leucophaea maderae*. **Insect Biochem.** **14**(5): 601-607.
- HAMMOCK, B.D. & ROE, R.M. (1985). Analysis of Juvenile Hormone esterase activity. **Meth in Enzimol.** **111**:487-494.
- HOLMES, R.S.; MASTERS, C.J. & WEBB, E.C. (1968). A comparative study of vertebrate esterase multiplicity. **Comp. Biochem. Physiol.** **26**: 837-852.
- HOPKINSON, D.A.; MESTRINER, M.A.; CORTNER, J. & HARRIS, H. (1973). Esterase D; a new human polymorphism. **Ann. Hum. Genet.** **37**: 119-137.
- JONES, D.; JONES, G.; WING, K.D.; RUDNICKA, M. & HAMMOCK, B.D. (1982). Juvenile Hormone esterases of lepdoptera. I. Activity in hemolymph during the last larval instar of 11 species. **J. Comp. Physiol.** **148**: 1-10.
- JONES, B.R. & BANCROFT, H.R. (1986). Distribution e probable physiological role of esterases in reproductive, digestive, and fat-body tissues of the adult cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* boh. **Biochem. Genet.** **24**: 499-508.
- JUDY, K.J.; SCHOOLEY, D.A.; DUNHAN, L.L.; HALL, M.S.; BERGOT, B.J. & SIDDALL, J.B. (1973). Isolation, structure and absolute configuration of a new natural insect juvenile hormone from *Manduca sexta*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **70**: 1509-1513.

- KAPIN, M.A. & AHMAD, S. (1980). Esterases in larval tissues of gypsy moth *Lymantria dispar* (L): Optimum assay conditions, quantification and characterization. **Insect Biochem.** 10: 331-337.
- KERR, W.E. & NIELSEN, R.A. (1966). Evidences that genetically determined *Melipona* queens can become workers. **Genetics** 54(3): 859-866.
- KERR, W.E. & NIELSEN, R.A. (1967). Sex determination in bees (Apinae). **J. Apic. Res.** 6(1): 3-9.
- KERR, W.E. (1946). Formação das castas no gênero *Melipona* (Illiger, 1806). **An. Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queiroz"**, USP, 3: 300-312.
- KERR, W.E. (1948). Estudos sobre o gênero *Melipona*. **An. Esc. Sup. Agric. "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. (1997). Sex determination in honeybees (Apinae and Meliponinae) and its consequences. **Braz. J. Genet.** (no prelo).
- KOROCHKIN, L.I. & MATVEEVA, N.M. (1974). Genetics of esterases in *Drosophila* of the *virilis* group. II. Sequential expression of paternal and maternal esterases in ontogenesis. **Biochem. Genet.** 12: 1-7.
- LIMA, L.M.K.S. & CONTEL, E.P.B. (1990). Eletrophoretic analisys of 12 proteins in natural populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera: Noctuidae). **Braz. J. Genet.** 13(4): 711-729.
- MARKERT, C.L. & MOLLER, F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proc. Natl Acad Sci., USA** 45: 453-63.
- MARKERT, C.L. (1975). Biology of isozymes. In: Markert C.L. (ed.). **Isozymes**. New York, Academic Press: 1-9.

- MICHENER, C.D. (1990). Classification of the *Apidae* (Hymenoptera). **Univ. Kan. Sci. Bull.** 54: 75-164.
- MOTOYAMA, M. & DAUTERMAN, W.C. (1974) The role of non-oxidative metabolism in organophosphorus resistance. **J. Agr. Food. Chem.** 22: 350-355.
- MURPHY, R.W., SITES, J.W., BUTLE, D.G. e HAUFLER, C.H. (1990). Proteins I: isozyme electroforesis. *In* HILLIS, D.M. e MORITZ, C. **Molecular systematics**. Massachusetts, Sinauer Associates Inc., cap. 4, p. 45-126.
- NIJHOUT H.F. & WHEELER D.E. (1982). Juvenile Hormone and the physiological basis of insect polymorphism. **Q. Rev. Biol.** 57: 109-133.
- RACHINSKY, A. & ENGELS, W. (1995). Caste development in honeybees (*Apis mellifera*): Juvenile Hormone turns on ecdysteroids. **Naturwissenschaften.** 82: 378-379.
- RACHINSKY, A. & HARTFELDER, K. (1990). Corpora allata activity. A prime regulating element for caste-specific Juvenile Hormone titer in honeybee larvae (*Apis mellifera carnica*). **J. Insect Physiol.** 36: 189-194.
- RAUSCHENBACH, Y.; LUKASHINA, N.S.; BUDKER, V.G. & KOROCHKIN, L.I. (1987). Genetics of Esterases in *Drosophila*. IX. Characterization of the JH-Esterase in *D. virilis*. **Biochem. Genet.** 25: 687-704.
- RENUCCI, M., MARTIN, N. & STRAMBI, C. (1984). Temporal variations of hemolymph esterase activity and Juvenile Hormone titers during ovocyte maturation in *Acheta domesticus* (Orthoptera). **General and Comparative Endocrinology** 55: 480-487.

- RICHARDS, G. (1981). Insect hormones in development. **Biol. Rev.**56: 501.
- RICHIMOND, R.C.; MANE, S.D. & TOMPIKINS, L. (1986). The behavioral effects of a carboxyesterase in *Drosophila*. In: HOY, M.A. **Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications**. San Diego, Califórnia: Academic Press, Inc. cap.12.: 301-336.
- RIDDIFORD, L.M. (1980). Interaction of ecdysone and juvenile hormone in the regulation of larval growth and metamorphosis of the tobacco hornworm. In: Hoffman, J. A. (ed.), **Progress in ecdysone Research**, Amsterdam, Elsevier, p. 409.
- RIDDIFORD, L.M. (1981). Hormonal control of epidermal cell development. **Am. Zool.** 21:751.
- ROLLER, H.; DAHM, K.H.; SWEELY, C.C. & TROST, B.M. (1967). The structure of the juvenile hormone. **Angew. Chem. Internat. Edit.** 6(2): 179-180.
- ROSELER, P.F.; ROSELER, I. & STRAMBI, A. (1980). The activity of *corpora allata* in dominant and subordinated female of the wasps *Polistes gallicus*. **Insects sociaux**, 27(2): 97-107.
- ROSSINI, S.A. (1989). Caracterização das mudas ontogenéticas e biometria dos *corpora allata* de *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEP (Hymenoptera, Apidae). **Dissertação de Mestrado, UNESP-Rio CLaro**, 120p.
- SAKAGAMI, S.F. (1982). Stingless bees. In: Hermann, H.R. **Social Insect**. Academic Press, N.Y. vol. 3, cap.4: 361-423.
- SANBURG, L.L.; KRAMER, K.J.; KEZDY, F.J. & LAW, J.H. (1975). Juvenile hormone-specific esterase in the haemolymph of tobacco hornworm, *M. sexta*. **J. Insect Physiol.** 21:873.

- SCANDALIOS, J.G. (1969). Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochem. Genet.* 3: 37-39.
- SCARPASSA, V.M.; TADEI, W.P. & SUAREZ, M.F. (1996). Allozyme differentiation among allopatric populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Braz. J. Genet.* 19(2): 256-269.
- SCHWARZ, H.F. (1948). Stingless bees and their Ways: Distribution. In: *Bulletin of the American Museum of Natural History* 90, Published by Order of the Trustees, New York, p. 1-13.
- SEVERSON, D.W.; WILLIAMSON, J.L. & AIKEN, J.M. (1989). Caste-specific transcription in the female honey bee. *Insect Biochem.* 19(2): 215-220.
- SHAPIRO A.B.; WHEELOCK G.D.; HAGEDORN H.H.; BAKER F.C.; TSAY L. W. & SCHOOLEY D.A. (1986). Juvenile Hormone and Juvenile Hormone Esterase in adulte females of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Insect. Physiol.* 32: 867-877.
- SHAW, C.R. (1965). Eletroforetic variation in enzymes. *Science* 149: 936-942.
- SHEPPARD, W.S. & BERLOCHER, S.H. (1985). New allozyme variability in italian honey bees. *J. Hered.* 76(1): 45-48.
- SHEPPARD, W.S. & BERLOCHER, S.H. (1989). Allozyme variation and differentiation among four *Apis* species. *Apidologie* 20: 419-431.
- SPARKS, T.C.; HAMMOCK, B.D. & RIDDIFORD, L.M. (1983). The haemolymph Juvenile Hormone esterase of *Manduca sexta* (L.)- Inhibition and regulation. *Insect Biochem.* 13(5): 529-541.
- STEINER, W.W.M. & JOHNSON, W.E. (1973). Techniques for electrophoresis of Hawaiian *Drosophila*. US International Biological Program. Island Ecosystems IRP. Tech. Report 30: 1-21.

- TOBE, S.S. & STAY, B. (1985). Structure and regulation of the corpus allatum. *Advances Insect Physiol* 31(3): 243-249.
- VEEN, J.W.; AGUILAR, I. & SOMMEIJER, M.J. (1994). Behaviour of males in the Stingless bee *Melipona bucheii* (Apidae: Meliponinae). In: IUSSI, 12, Villetaneuse: Université Paris Nord: 22.
- WALKER, C.H. & MACKNESS, M.I. (1983). Esterases: problems of identification and classification. *Biochem. Pharmacol.* 32: 3265-3269.
- WHITMORE, D.; WHITMORE, E. & GILBERT, L.I. (1972). Juvenile Hormone induction of esterases: A mechanism for the regulation of the Hormone Juvenile titer. *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 69: 1592-1595.
- YAMAMOTO, K.; CHADAREVIAN, A. & PELLEGRINI, M. (1988). Juvenile Hormone action mediated in male accessory glands of *Drosophila* by calcium and kinase C. *Science* 239: 916-919.
- ZERA, A.J. & TEIBEL, K.C. (1989). Differences in Juvenile Hormone activity between presumptive macropterous and brachypterous *Gryllus rubens*: implications for the hormonal control of wing polymorphism. *J. Insect Physiol.* 35: 7-17.
- ZERA, A.J., GU, X. & ZEISSET, M. (1992). Characterization of Juvenile Hormone Esterase from genetically-determined wing morphs of the cricket, *Gryllus rubens*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22(8): 829-839.