

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Expressão de Genes das Vias de Biossíntese e Degradação do Hormônio Juvenil e Caracterização de Peptídeos Ligantes ao Cérebro de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Carlos Ueira Vieira

Uberlândia-MG

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Expressão de Genes das Vias de Biossíntese e Degradação do Hormônio Juvenil e Caracterização de Peptídeos Ligantes ao Cérebro de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Carlos Ueira Vieira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Co-orientador: Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

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

UBERLÂNDIA

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

V658e Vieira, Carlos Ueira, 1981-
Expressão de genes das vias de biossíntese e degradação do hormônio juvenil e caracterização de peptídeos ligantes ao cérebro de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) / Carlos Ueira Vieira. - Uberlândia, 2006.
81f. : il.
Orientador: Ana Maria Bonetti.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Abelha - Genética - Teses. 2. Hormônio Juvenil - Genética - Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU:

595.799-115

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Expressão de Genes das Vias de Biossíntese e Degradação do Hormônio Juvenil e Caracterização de Peptídeos Ligantes ao Cérebro de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Carlos Ueira Vieira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^a Dr^a Ana Maria Bonetti

Examinadores: Prof^a Dr^a Andréa Queiroz Maranhão

Prof^a Dr^a Zilá Luz Paulino Simões

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

Data da Defesa: 23 / 01 /2006

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Tese foram contempladas

(Orientador)

Uberlândia, ____ / ____ / _____

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^a Dr^a 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 a diversidade existente 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^a Dr^a Ana Maria Bonetti pela confiança em mim depositada, incentivo em minha carreira e por sua orientação e pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr pelos ensinamentos sobre Biologia e Genética de meliponídeos, pela amizade, confiança e pelo exemplo de vida.

À Prof^a Dr^a Andréa Queiroz Maranhão, do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, pelos ensinamentos, por me ajudar a participar no Curso de Princípios de Engenharia Genética na UnB, onde aprendi muito, pela amizade e pela sua participação na banca examinadora.

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

À Prof^a Dr^a Zilá Luz Paulino Simões por ter nos ajudado com as análises de expressão gênica, pela amizade e pela sua participação na banca examinadora.

À Prof^a Dr^a Maria Cristina Ramos Costa da UNAERP por ter me ajudado no início desse trabalho e por ter se tornado uma grande amiga.

Ao Prof. Dr. Klaus Hartfelder da FMRP-USP por ter nos ajudado com as análises de radioimunoensaio.

Ao Sergio Lemos pela grande ajuda na minha vida e pela ajuda nas figuras da tese.

Aos meus grandes amigos Ana Carolina, Cristina (Tininha), Rone que sempre me apoiaram e facilitaram meu trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular da UnB pela ajuda no trabalho e pela sincera amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética de Abelhas da USP-RP pela ajuda no trabalho.

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

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

Aos professores e funcionários da UFU pela boa vontade durante toda minha permanência nessa instituição.

À CAPES pela Bolsa de Doutorado.

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo auxílio financeiro.

Índice

| Descrição | Página |
|--|--------|
| Lista de Figuras | i |
| Lista de Abreviações | iii |
| Resumo Geral | 1 |
| Introdução Geral | 3 |
| Abelhas sem ferrão | 3 |
| Determinação de Castas em <i>Melipona</i> | 4 |
| Biossíntese e Degradação do Hormônio Juvenil (HJ) | 6 |
| Neurobiologia de Abelhas | 9 |
| Objetivos | 11 |
| Capítulo 1: Clonagem, Seqüenciamento e Análise da expressão do gene <i>O</i> -Metiltransferase do ácido farnesóico de <i>Melipona scutellaris</i> | |
| Resumo | 12 |
| Introdução | 13 |
| Material e Métodos | 15 |
| Material Biológico e Tratamento com HJ III | 15 |
| Extração de RNA | 15 |
| Transcrição Reversa (RT) | 16 |
| RT-PCR Semiquantitativo | 16 |

| | |
|--|----|
| Clonagem | 17 |
| Extração de plasmídeo, confirmação de clones por restrição e seqüenciamento do clone | 17 |
| Resultados e Discussão | 18 |
| Capítulo2: Perfil da expressão dos genes da Esterase do Hormônio Juvenil e Epóxide Hidrolase do Hormônio Juvenil em <i>Melipona scutellaris</i> | |
| Resumo | 28 |
| Introdução | 29 |
| Material e Métodos | 30 |
| Tratamentos Hormonais | 30 |
| Extração de RNA e síntese de cDNA | 31 |
| Amplificação do gene das enzimas Esterase e Epóxide Hidrolase de <i>M. scutellaris</i> por RT-PCR | 31 |
| Expressão dos genes EHJ e EH durante o desenvolvimento de operária por RT-PCR semiquantitativa | 31 |
| Radioimunoensaio para Hormônio Juvenil (RIA) | 32 |
| Resultados e Discussão | 35 |

Capítulo 3: Identificação de peptídeos ligantes específicos em cérebro de *Melipona scutellaris* por Phage Display. *in vivo*

| | |
|--|----|
| Resumo | 41 |
| Introdução | 42 |
| Material e métodos | 44 |
| <i>Biopanning in vivo</i> e Bioinformática | 44 |
| Imunohistoquímica | 45 |
| <i>Dot-Blotting</i> Proteína | 45 |
| Eletroforese e Atividade Esterásica | 46 |
| Resultados e Discussão | 47 |
| Conclusão Geral | 62 |
| Referências Bibliográficas | 64 |

Lista de Figuras

| Capítulo 1 | Página |
|--|--------|
| Figura 1: RNA total de <i>Melipona scutellaris</i> extraído pelo método Trizol. As setas indicam a posição do rRNA 28S e 18S. 1- pupa de olho branco; 2- pupa de olho rosa; 3- pupa de olho marrom; 4- pupa de olho preto. | 18 |
| Figura 2: RT-PCR de formas alternativas de MsFAMeT com splicing de um micro-exon de 27nt. A , Produtos de RT-PCR derivado de mRNA MsFAMeT em gel de agarose 2.5% corado com brometo de etídeo. M – Marcador 100pb (Invitrogen); 1 e 2– Amplicons de operárias POB e POP, respectivamente; B , Alinhamento das seqüências de 401pb (1) e 374pb (2) da MsFAMeT, mostrando um <i>gap</i> entre os nucleotídeos 161 e 187 do fragmento menor. | 19 |
| Figura 3: A- Cinética da amplificação dos genes de actina e FAMeT. Eletroforese em gel de agarose 2,5 % corado com brometo de etídeo; M: marcador 100 pb. B- Representação gráfica da cinética de amplificação com <i>primer</i> da Actina. C- Representação gráfica da cinética de amplificação com <i>primer</i> da FAMeT. | 23 |
| Figura 4: Análise da expressão gênica estágio-específica das formas alternativas de transcritos para MsFAMeT. A: RT-PCR semiquantitativa do fragmento do gene MsFAMeT durante o desenvolvimento de pupas de rainhas e operárias. POB: pupa de olho branco; POR: pupa de olho rosa; POM: pupa de olho marrom; POP: pupa de olho preto; POPp: pupa de olho preto corpo pigmentado. B: RT-PCR semiquantitativa do fragmento do gene da MsFAMeT em indivíduos adultos: 1 - operária recém-nascida (0 dias), 2 - campeira (30 dias), 3 - rainha virgem (4 dias). | 24 |
| Figura 5: Rápida inibição na expressão do transcrito menor de MsFAMeT após aplicação tópica de JH III. Amostras de L3 foram tratadas com 0.5µg/µL de HJ III em solução de acetona. A expressão de MsFAMeT foi analisada por RT-PCR semiquantitativo e as duas bandas relativas a MsFAMeT mRNA foram quantificadas separadamente. Realizou-se 3 experimentos independentes. A- Os asteriscos (**) representam diferença estatística significativa ($p < 0.05$, <i>t</i> -test) entre a expressão do transcrito menor de MsFAMeT controle e após tratamento com HJ III. B- A aplicação de JH III não apresenta qualquer efeito estatisticamente significativo sobre a expressão do transcrito maior de MsFAMeT. | 24 |

Capítulo 2

| | |
|---|----|
| Figura 1: Perfil de expressão da EHJ e EHHJ durante o desenvolvimento pós-embrionário de <i>M. scutellaris</i> usando RT-PCR semi-quantitativo. OD: densidade óptica. Actina foi utilizada para normalizar a reação. L2: Larva 2; L3: larva 3; LPD: larva pré-defecante; LD: larva defecante; POB: pupa de olho branco; POR: pupa de olho rosa; POM: pupa de olho marrom; POP: pupa de olho preto; POPp: pupa de olho preto corpo pigmentado; RN: recém-nascido; Camp: campeira. | 35 |
| Figura 2: Quantificação de HJ de larvas por radioimunoensaio. L3-1: larva no estágio 3 (L3) com grande quantidade de alimento e líquido, no alvéolo de cria. L3-2: larva L3 com alimento pastoso. L3-3: larva L3 com pouco alimento e sólido no alvéolo de cria. LPD: Larva pré-defecante, sem alimento no alvéolo de cria. | 37 |
| Figura 3: Efeitos da aplicação tópica de HJ III na expressão de MsEHJ (A) e MsEHHJ (B). Larvas (LPD) foram tratadas com 0,5 µg de HJ III e a expressão dos genes. MsEHJ e MsEHHJ foi analisada por RT-PCR semiquantitativo. Os asteriscos | 38 |

representam o tempo de tratamento em que a diferença de expressão dos genes analisados entre os grupos controle e tratado foi significativa (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$ *t*-test). Foram feitos 3 experimentos independentes.

Figura 4: Comparação dos títulos de ecdisona com a expressão da MsEHJ e MsEHHJ em operárias de *Melipona*. A curva de titulação de ecdisona, em *Melipona quadrifasciata*, foi feita por Pinto *et al.* (2002). POB: pupa de olho branco; POR: pupa de olho rosa; POM: pupa de olho marrom; POP: pupa de olho preto; POPp: pupa de olho preto corpo pigmentado.

39

Capítulo 3

Figura 1: Esquema da seleção de fagos ligantes ao cérebro de *M. scutellaris*.

47

Figura 2: Mapeamento da região de ligação de alguns fagos ao cérebro de *M. scutellaris* por imunohistoquímica. **1** – esquema do cérebro de abelha, CC: corpo de cogumelo; LA, lobo antenal; LO: lobo óptico. **2** – Fagos que marcaram todo o cérebro: **A-C**: E04 – transportador de glutamato; **D-F**: F08 – domínio CUB; **G-I**: G07 – receptor gustatório; **J-L**: hematoxilina-eosina (HE). Bar: 40 μ m. **3** – Fagos que marcaram regiões específicas, **A** (LO) e **C** (CA): E10 – lipoforina; **B** (LO): G02 – transportador de glutamato; **D** (CC): A10 – receptor de lipoproteína. Bar: 40 μ m.

54

Figura 3: Análises por dot-blotting da expressão da proteína no cérebro de *M. scutellaris* ligante ao peptídeo. POB: pupa de olho branco; POR: pupa de olho rosa; POM: pupa de olho marrom; POP: pupa de olho preto; POPp: pupa de olho preto corpo pigmentado; RN: recém-nascido; Camp: campeira.

55

Figura 4: Perfil de esterases após inoculação de 2×10^{11} fagos: 1: fago Helper; 2: clone F06 (similar alatostatina); 3: pool de fagos ligantes ao HJ; 4: controle (abelha sem injeção). Figura A - coloração com α -acetato. Figura B - coloração com β -acetato.

60

LISTA DE ABREVIACÕES

| | |
|---------------|---|
| AF | Ácido Farnesóico |
| μg | micrograma |
| μL | microlitro |
| μm | micrmetro |
| BSA | <i>Bovine serum albumine</i> |
| CA | <i>Corpora allata</i> |
| cAMP | Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico |
| cDNA | Ácido desoxiribonucléico complementar |
| DEPC | Dietil pirocarbonato |
| dNTP | dinucleotídeo trifosfato |
| DTT | ditiotreitol |
| EHHJ | Epóxide Hidrolase do Hormônio Juvenil |
| EHJ | Esterase do Hormônio Juvenil |
| FAMeT | <i>o</i> -metiltransferase do ácido farnesóico |
| h | hora |
| HJ | Hormônio Juvenil |
| IgG | Imunoglobulina G |
| KCl | Cloreto de potássio |
| MF | Metilfarnesoato |
| mL | mililitro |
| mM | milimolar |

| | |
|--------|---------------------------|
| mRNA | RNA mensageiro |
| ng | nanograma |
| °C | Graus Celcius |
| ORF | <i>Open read frame</i> |
| pb | Pares de base |
| PCR | Polimerase Chain reaction |
| pmol | picomol |
| RIA | Radioimunoensaio |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RNAsin | Inibidor de RNase |
| rRNA | RNA ribossomal |
| RT | Transcrição Reversa |

Resumo Geral

Abelhas do gênero *Melipona* têm importante papel na polinização de plantas no Brasil, e por apresentar mecanismo peculiar de determinação de casta genético – alimentar pode ser considerada um laboratório vivo para pesquisas de natureza molecular. O Hormônio Juvenil (HJ) é o principal hormônio que regula a diferenciação de casta e o polietismo etário em abelhas, eventos que depende de genes que estão relacionados com o controle da biossíntese e degradação do HJ. Para o entendimento do mecanismo molecular envolvido no desenvolvimento e diferenciação em abelhas foi realizado estudo sobre a expressão de enzimas que participam das vias de biossíntese e de degradação do HJ e isolamento de peptídeos ligantes ao cérebro de *Melipona scutellaris*. Foi isolado, clonado e seqüenciado um fragmento do gene *o*-metiltransferase do ácido farnesóico de *M. scutellaris* (MsFAMeT) que participa da via de biossíntese do HJ, que apresenta *splicing* alternativo de um micro-éxon de 27 nucleotídeos. O transcrito maior apresenta expressão diferencial nas castas, porém, aparentemente, não funciona como conversor do ácido farnesóico a metilfarnesoato. A diminuição nos níveis de expressão do transcrito menor nos estágios iniciais de pupas de rainhas que comparado aos mesmos estágios em operárias e sua inibição em larvas tratadas com HJ III indicam que esse mRNA está associado à via de biossíntese de HJ e confirma sua relação com a cascata regulatória de diferenciação das castas em *M. scutellaris*. O perfil de expressão dos genes que codificam para as enzimas Esterase do HJ (EHJ) e Epóxide Hidrolase do HJ (EHHJ) mostrou que essas enzimas estão expressas durante todo o desenvolvimento ontogenético pós-embrionário de *M. scutellaris*. Em *Apis mellifera*, essas enzimas não são expressas nos estágios de pupa e sua expressão em *M. scutellaris* pode indicar presença de HJ circulante nessas fases, o qual seria utilizado em processos fisiológicos diferentes daqueles que ocorrem em *Apis*. Foi verificado o aumento da expressão dos genes das enzimas EHJ e EHHJ após aplicação tópica de HJ III, indicando que esses genes são regulados por esse hormônio, enquanto que, a injeção de ecdisona não mostrou influência na expressão deles. Quando comparamos os títulos de HJ em larva pré-defecante (LPD) com a expressão do gene das enzimas da via de degradação do HJ, foi possível observar

agrupamento de indivíduos com baixos títulos de HJ devido a ação dela, confirmando o papel na via de degradação do HJ. Na fase de L3-3 ficaram agrupados dois indivíduos com altos títulos de HJ, que podem ser rainhas. Esse estágio mostrou ser o melhor para identificação de rainhas no estágio larval. O cérebro é o principal órgão que controla a biossíntese do HJ pelos *corpora allata* (CA) por meio de neuropeptídeos e aminas biogênicas, além de controlar a aprendizagem e memória. Por isso, utilizamos a técnica de Phage Display para isolar, *in vivo*, peptídeos ligantes ao cérebro de *M. scutellaris*. Após quatro ciclos de seleção, clones foram escolhidos para sequenciamento e a análise de bioinformática revelou que são similares a seqüências expressas em cérebro de outros insetos. Foram utilizados dois tipos de bibliotecas apresentadas na superfície de fagos, uma de heptapeptídeos linear e outra de heptapeptídeos constricta, sendo que em nossas análises não encontramos nenhum representante da biblioteca constricta, provavelmente em função da formação de loop no peptídeo que, dificulta a interação com proteínas do cérebro. A análise de expressão das proteínas do cérebro ligantes de peptídeos (fagos) mostrou que alguns clones similares a transportadores de glutamato e lipoforina se expressam somente em cérebro de adultos, enquanto que os ligantes de outros clones expressam-se durante os estágios de pupa e adultos. Pelo mapeamento da região do cérebro de ligação dos peptídeos foi possível mostrar que alguns fagos ligam-se a todo o cérebro, enquanto outros têm ligação sítio-específica. O perfil de expressão de esterases em campeiras que receberam injeção do clone similar a alatostatina, foi alterado, indicando o caráter funcional do peptídeo. A técnica de *phage display in vivo* foi eficiente para a caracterização de peptídeos ligante no cérebro de *Melipona*.

Introdução Geral

Abelha sem ferrão

As abelhas sem ferrão pertencem à superfamília Apoidea que se subdivide em 8 famílias: Colletidae, Erenidae, Oxaeidae, Halictidae, Melittidae, Megachilidae, Anthophoridae e Apidae. 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 (Camargo e Pedro, 1992), na Zona Tropical e Subtropical, nas Américas do Sul e Central, Malásia, Índia, Indonésia, África e Austrália.

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, morcegos, aves, alguns mamíferos, água, vento e outros insetos (Kerr *et al.*, 1996).

As abelhas eusociais apresentam a seguinte divisão de castas:

- rainhas: fêmeas férteis, responsáveis pela postura da maioria dos ovos, não apresentam comportamento de coleta de alimento.
- operária: 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.

Os machos de meliponídeos 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, que são expulsos da colméia depois do primeiro terço de vida (Kerr, 1996).

A abelha sem ferrão, popularmente conhecida como Uruçu do Nordeste, que se constitui no objeto deste estudo, pertence à espécie *Melipona scutellaris* e tem se mostrado excelente material biológico para análises genéticas devido ao seu

mecanismo peculiar de determinação de castas por fatores genético-alimentares, o que difere do padrão apresentado por outros Apidae.

Neste milênio, a extinção de espécies é, infelizmente, uma constante, e que está afetando as abelhas. Esta questão não diz respeito apenas aos meliponíneos, porém, é um problema para todos os himenópteros de fecundação cruzada. Woyke (1980) constatou que para uma população de *Apis mellifera* se manter, o número mínimo de alelos diferentes deveria ser de pelo menos seis. Em meliponíneos, foi constatado que o mesmo ocorre; para a manutenção de seis alelos x^o a população deve possuir pelo menos 44 colônias na sua área de reprodução (Kerr e Vencovsky, 1982). Segundo as fórmulas de Yokoyama e Nei (1979), se a população for menor que 44 colônias, ela será eliminada em cerca de 15 gerações.

Com base nestas informações, torna-se necessário o conhecimento dos fatores moleculares, genéticos e biológicos envolvidos na formação de fêmeas (rainhas e operárias) de maneira a se aperfeiçoar o manejo para manutenção dos meliponíneos que se tornaram, ao longo da evolução, os principais polinizadores da flora brasileira. Assim, é prioritário que se conheça e se mantenham os polinizadores para que se possa manter a flora que deles depende. Considerando-se que essas abelhas estão intrinsecamente ligadas à polinização de espécies vegetais que sustentam 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 conseqüentemente com a preservação da biodiversidade.

Determinação de Castas em *Melipona*

Segundo Michener (1974) a casta em inseto é caracterizada pela morfologia, fisiologia e comportamento de fêmeas que vivem juntas em uma colônia. As abelhas apresentam duas castas.

Duas teorias explicam a determinação de castas: blastogênica e trofogênica. A blastogênica pressupõe determinação genotípica, enquanto que na

trofogênica ou somatogênica a determinação é alimentar, como acontece em *Trigona*, *Apis* e nas mamangavas (Kerr, 1948).

Em *Melipona*, a determinação é blastogênica associada à alimentação. Não há diferença entre as células de crias (alvéolos) de rainhas e operárias, quanto a forma, quantidade e qualidade de alimento que recebem e ocorre a operculação da célula logo após a ovoposição, eliminando-se qualquer possibilidade de alimentação diferenciada.

Em 1948, 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 Hormônio Juvenil (HJ).

O mecanismo de desenvolvimento ovariano é desencadeado juntamente com as demais características de rainha. Assim, os genes que determinam o desenvolvimento ovariano são ativados em conjunto com os outros genes de morfologia que darão o “status” da casta. Todos esses traços diferenciais de castas estão sob influência do HJ (Bonetti, 1990).

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 morfologia 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 quadrifasciata*, *Melipona rufiventris*, *Melipona compresssips* e *Melipona scutellaris*. O HJ I demonstrou ser o mais eficiente na produção de rainhas em *Melipona*, seguido pelo HJ III.

Biossíntese e Degradação do Hormônio Juvenil (HJ)

Um dos hormônios envolvidos no processo de metamorfose de insetos é o HJ sintetizado pelas glândulas endócrinas *corpora allata* (CA) e secretado na hemolinfa, promovendo, de alguma maneira, a interação dos CA com o genoma, provavelmente, via receptor nuclear (Davey, 2000).

A biossíntese do HJ pode ser vista como dois caminhos justapostos: o clássico originando-se da acetil-CoA a farnesil-pirofosfato, seguido por uma série de modificações de grupos. As modificações podem ser feitas no final na molécula, iniciando com hidrólise do pirofosfato, oxidação do farnesol a ácido farnesóico, esterificação a metil farnesoato e finalmente, a epoxidação da dupla ligação 10,11 do HJ. A primeira parte dessa via é geral, entretanto a segunda parte é específica dos CA (Eersen *et al.*, 1995).

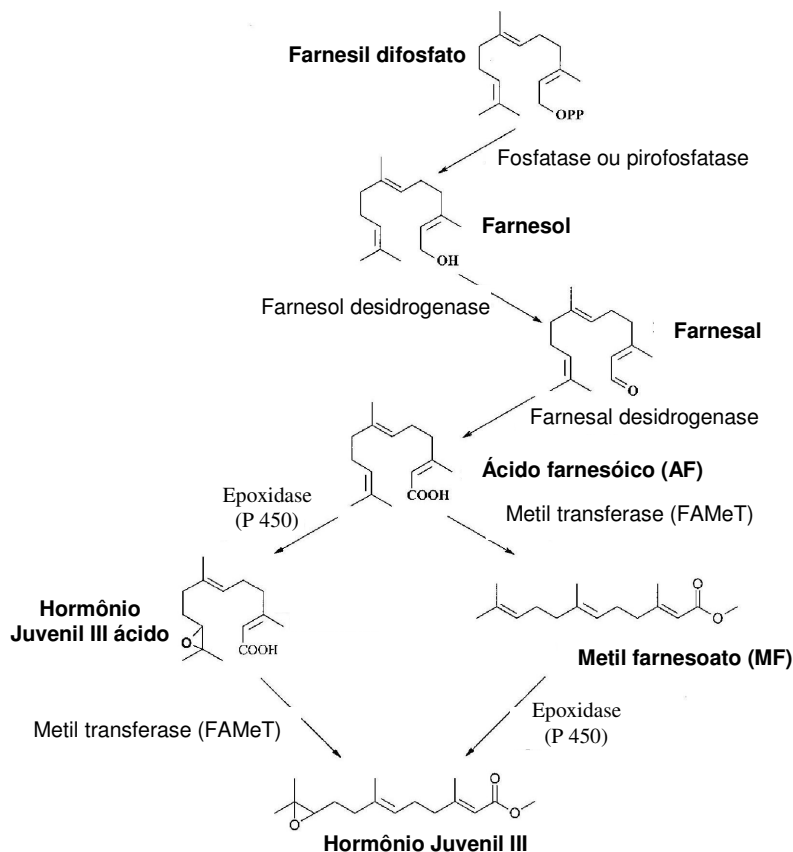


Figura 1: Esquema ilustrativo da provável via de biossíntese de HJ em insetos. Após a formação de ácido farnesóico, a biossíntese pode ser processada via epoxidação do C10, C11 seguido por metilação do HJ ácido (Lepidoptera) ou, alternativamente, metilação do AF seguido pela epoxidação (outros insetos) (Bede *et al.*, 2001).

A atividade dos CA é regulada por fatores humorais e inervação por células neurosecretoras do cérebro. Vários tipos de neuropeptídeos que provocam estimulação (alatotropina) ou inibição (alatoestatinas) têm sido descritos no controle da biossíntese de HJ em insetos (Reichwald *et al.*, 1994; Taylor III *et al.*, 1996).

Rachinsky *et al.* (2000) analisaram o efeito da alatotropina Mas-AT de *Manduca sexta*, na biossíntese de HJ de *Apis mellifera* e, observaram aumento significativo na liberação de HJ pelos CA tratados com esse neuropeptídeo, além da estimulação do seu precursor no último estágio larval, em operárias.

A influência de alatotropina (Mas-AT) e alatoestatina (Mas-AS) de *Manduca sexta*, na biossíntese de HJ pelos CA de *Lacanobia oleracea*, foi analisada por Audsley *et al.* (2000), que verificaram inibição de síntese em até 70% em CA tratados com Mas-AS e estimulação dose-dependente para Mas-AT.

Lee *et al.* (2002) descreveram *splicing* alternativo estágio e desenvolvimento-dependentes para mRNA de alatotropina (Mas-AT) de *Manduca sexta*. Esse mecanismo aumenta a capacidade de codificação de um gene e a diversidade de proteínas.

A biossíntese do HJ pode, também, ser regulada por aminas biogênicas. O tratamento de CA de *Diploptera punctata* e *Grillus bimaculatus*, com octopamina, resulta em inibição dose-dependente da biossíntese de HJ (Thompson *et al.*, 1990; Woodring e Hoofmann, 1994), enquanto que, em *Apis mellifera*, a octopamina e serotonina estimulam a biossíntese e liberação do HJ pelos CA e a dopamina e noradrenalina não tiveram nenhum efeito sobre essa glândula (Rachinsk *et al.*, 1994).

Em *Diploptera*, o efeito da octopamina na atividade dos CA é concomitante com efeitos dos níveis de cAMP (Thompson *et al.*, 1990) enquanto o diacilglicerol e 1,4,5-inositol trifosfato aparecem envolvidos na transdução de sinal de alatoestatina (Rachinsk, 1994).

O cálcio é outro fator importante na biossíntese de HJ em *Diploptera*, *Manduca* e *Grillus* (Rachinsk, 1994; Woodring e Hoofmann., 1994). Há necessidade de informações sobre o envolvimento desse íon na transdução de

sinais de neuropeptídeos e neurotransmissores, bem como de outros eventos moduladores dessa resposta.

Os títulos de HJ são regulados por duas enzimas: Esterase do Hormônio Juvenil (EHJ) e Epóxide Hidrolase do Hormônio Juvenil (EHHJ). A EHJ é membro da família carboxiesterase e hidrolisa o metilester α/β insaturado do HJ a um metabólito biologicamente inativo, o HJ ácido. O produto da reação entre EHHJ e HJ é o HJ diol (HIRASHIMA *et al.*, 1999).

EHJs de muitas ordens de insetos têm sido amplamente estudadas em função de sua importância no desenvolvimento deles e do seu potencial uso como inseticida. A proteína EHJ foi caracterizada e purificada em *Heliothis virescens* (Hanzlik *et al.*, 1989), *Leptinotarsa decemlineata* (Vermunt *et al.*, 1997a), *Manduca sexta* (Venkatesh *et al.*, 1990), *Trichoplusi ni* (Hanzlik e Hammock, 1987), *Tenebrio molitor* (Thomas *et al.*, 2000) e *Bombyx mori* (Shiotsuki *et al.*, 2000), *Lymantria dispar* (Nussbaumer *et al.*, 2000). As técnicas empregadas baseiam-se em cromatografia por afinidade ou por troca aniônica.

Clones de cDNA de EHJs têm sido obtidos e seqüenciados em *H. virescens* (Hanzlik *et al.*, 1989), *L. decemlineata* (Vermunt *et al.*, 1997b), *Choristoneura fumiferana* (Feng *et al.*, 1999), *Tenebrio molitor* (Thomas *et al.*, 2000), *Manduca sexta* (Hilton e Hammock, 2001), *Drosophila melanogaster* (Campbell *et al.*, 2001) e *Bombyx mori* (Hirai *et al.*, 2002).

Em 1995, McCutchen descreveu um método espectrofotométrico não radioativo para análise da atividade enzimática da EHJ. Esse método foi tão eficiente quanto o radioativo descrito por Hammock e Sparks (1977). Hirashima *et al.* (1999) analisaram a influência da octopamina, aplicada no alimento de *Tribolium freemani*, na atividade de EHJ e observaram aumento da atividade enzimática nos indivíduos tratados.

Epóxide hidrolases são classificadas como membros de α/β hidrolases (Beetham *et al.*, 1995). Os membros dessa família apresentam um sítio catalítico altamente conservado composto pela tríade ácido/base/ácido. O mecanismo de ação da enzima haloalcano dehalogenase, membro dessa família, foi estudado em análise por cristalografia de raio-X do complexo enzima-substrato (Schanstra *et al.*, 1996; *apud* Linderman *et al.*, 2000), envolvendo a formação de uma ligação covalente éster intermediária por um ataque nucleofílico do Asp-123. O par His-

289/Asp-260 ativa uma molécula de água que hidrolisa o éster intermediário, liberando o produto. EHHJ de *Trichoplusia ni*, foi isolado de biblioteca de cDNA de corpos gordurosos no último estágio de larva, revelando uma terminação hidrofóbica sugerindo que seja uma enzima microssomal (Harris *et al.*, 1999).

A ação combinada da EHJ e EHHJ 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 desse hormônio na hemolinfa, seguido de metamorfose. Na fase adulta, aumenta, novamente, a concentração de HJ de acordo com o estado fisiológico e reprodutivo dos insetos (De Kort e Granger, 1981). Esse é o modelo proposto para a maioria dos insetos, embora pareça ser diferente para abelhas do gênero *Melipona*.

Neurobiologia de Abelhas

A abelha *Apis mellifera* é um importante modelo para estudos neural e plasticidade comportamental, particularmente no que se refere ao comportamento social, aprendizagem e memória (Robinson, 1998 e Maleska *et al.*, 2000).

Um forte avanço em trabalhos com abelhas se deve à possibilidade de estudar comportamentos em condições laboratoriais e naturais. O estudo da vida social das abelhas tem demonstrado a influência de genes na plasticidade neural e comportamental em condições ecológicas e evolutivas, contribuindo para um maior entendimento entre a relação dos genes, cérebro e comportamento (Robinson, 1998).

Recentemente muitas pesquisas abordado o padrão de expressão de genes no cérebro de abelhas. Muitos pesquisadores isolaram o gene codificante de diversos receptores envolvidos em neurotransmissão: o receptor dopamina D1 (Blenau *et al.*, 1998) e o receptor da tiramina (Blenau *et al.*, 2000). Em 2005, Mustard e colaboradores analisaram o perfil de expressão do receptor de tiramina no cérebro de *Apis mellifera* durante o desenvolvimento e observaram um aumento correlacionado com a idade.

O projeto *Honey Bee Brain EST* coordenado pelo Dr. Gene Robinson, da Universidade de Illinois (EUA), realizou um estudo sobre o transcriptoma do

cérebro de *Apis mellifera* para acelerar os estudos moleculares de comportamento e neurociências em abelhas. Foram seqüenciados 20256 clones de cDNA, após processamento em programas que excluem vetores, leituras de baixa qualidade e seqüências menores que 200pb, restaram 15311 *ESTs* (*Espressed Sequence Tags*) que foram agrupada em 3136 *contigs* e 5830 *singlets* (Whitfield *et al.*, 2002). Até o momento não se tem um perfil completo do proteoma do cérebro de abelhas.

Whitfield *et al.* (2003) realizaram um estudo sobre o perfil de expressão de genes do cérebro individual em *Apis mellifera* com o comportamento predito. Nesse trabalho foram analisados 5500 genes e verificaram que 39% estão associados com a transição de abelhas jovens para campeiras.

Em 2004, Tsuchimoto e colaboradores analisaram mudanças na expressão gênica no cérebro de *Apis* associadas à idade. Esses autores verificaram que os genes envolvidos na via de transdução de sinal, canais iônicos, transportadores de neurotransmissores, proteínas de adesão celular, fatores de transcrição e proteínas associadas à membrana são mais expressos em campeiras do que em recém-nascidos.

Em *Melipona* não existem dados sobre o funcionamento do cérebro. Esse órgão é responsável pelo controle das atividades, e também pela neurosecreção de aminas biogênicas e neuropéptídeos que controlam a biossíntese de HJ pelos *Corpora allata*, por isso tem um importante papel na determinação de Castas.

Objetivos

Esse trabalho tem como objetivos:

- 1- Clonar, sequenciar e analisar a expressão gênica da metiltransferase do ácido farnesóico (FAMeT) em rainhas e operárias de *Melipona scutellaris* nas fases de pupas e adultos;
- 2- Analisar o perfil de expressão das enzimas Esterase do Hormônio Juvenil e Epóxide Hidrolase do Hormônio Juvenil em *M. scutellaris*.
- 3- Identificar peptídeos ligantes específicos do cérebro de *M. scutellaris* por Phage Display *in vivo*.

Capítulo 1

Clonagem, Seqüenciamento e Análise da expressão do gene *O*-Metiltransferase do ácido farnesóico de *Melipona scutellaris*

Resumo

O-Metiltransferase do ácido farnesóico (FAMeT) é uma enzima que cataliza a formação de metilfarnesoato (MF) a partir de ácido farnesóico (AF) na via de síntese de Hormônio Juvenil (HJ). Nesse trabalho nós clonamos e sequenciamos um fragmento de cDNA para uma provável FAMeT da abelha *Melipona scutellaris* (MsFAMeT) e quantificamos os valores relativos de seus transcritos por RT-PCR semiquantitativo, em pupas e adultos de rainhas e operárias. Encontramos moderada conservação entre Apidae FAMeT e Crustacean FAMeT e, no entanto, nenhuma relação com *Bombyx mori* Juvenile Hormone Acid Methyltransferase (BmJHAMT). Os resultados apresentam um *splicing* alternativo de um micro-exon de 27nt, com expressão e função inseto, estágio e tecido específicos e dependentes de importantes modificações pós-traducionais. No caso do transcrito maior, aparentemente não funciona como conversor de AF para MF, mas sua expressão apresenta-se diferencial nas castas. A diminuição dos níveis de expressão do transcrito menor nos estágios iniciais de pupas de rainhas se comparados aos mesmos estágios em operárias e sua inibição em larvas tratadas com HJ III, indicam que esse mRNA está intimamente associado na via de biossíntese de HJ e confirmam sua relação à cascata regulatória de diferenciação das castas em *Melipona scutellaris*.

Introdução

Diferente do catabolismo do colesterol em vertebrados, a via do mevalonato em artrópodes é responsável pela produção de hormônio juvenil (HJ), um grupo de compostos sesquiterpenóides que pode exercer inúmeras funções regulatórias sobre tecidos, estágios do desenvolvimento e processos fisiológicos (para revisão veja Bellés *et al.*, 2005). Da hidrólise do Farnesil Pirofosfato, os insetos produzem farnesol, o qual é oxidado a farnesal e, em seguida, desidrogenado, formando ácido farnesóico (AF). Em *Bombyx mori*, a atividade da enzima recombinante Metiltransferase do Hormônio Juvenil Ácido (BmJHAMT), dependente de SAM (S-adenosil-L-metionina), converte AF e metabólitos juvenoides ácidos diretamente nos cognatos metil esters, como metil farnesoato (MF) e HJ I, II e III (Shinoda e Itoyama, 2003). A expressão dessa enzima é quase que exclusivamente detectada no complexo *Corpora cardiaca- Corpora allata* (CC-CA) de larvas de 4^o e 5^o instars.

Por outro lado, foi clonada e caracterizada a enzima O-Metil tranferase do ácido farnesóico (FAMeT), mas também conhecida por FAOMeT e FAMTase em trabalhos de crustáceos, que converte AF em MF, no passo final da via de biossíntese do MF em diferentes crustáceos. MF é um precursor não-epoxidado e análogo ao HJ III de insetos, produzido pelos órgãos mandibulares, envolvidos em processos de crescimento, muda e reprodução. Nesses artrópodes, a expressão do mRNA de FAMeT é algumas vezes constitutiva, outras vezes verifica-se expressão diferencial em vários tecidos ao longo do desenvolvimento de machos e fêmeas jovens e adultos (Silva Gunawardene *et al.*, 2001, 2002, 2003; Ruddell *et al.*, 2003; Holford *et al.*, 2004).

Metiltransferase do Hormônio Juvenil Ácido de *Bombyx mori* (BmJHAMT) e FAMeT de crustáceos apresentam apenas 11% de similaridade, não sendo portanto ortólogos, apesar dos radioimunoensaios para ambas apresentarem atividade funcional na conversão de AF em MF (Shinoda e Itoyama, 2003). No entanto, já foi identificado em *Drosophila melanogaster* um ortólogo da FAMeT de crustáceos (CG10527; acesso GenBank AAF46666), com 41% de similiaridade.

Para entender o papel da provável FAMeT de insetos durante o desenvolvimento de Apidae, nesse trabalho foi realizada a clonagem parcial, o

sequenciamento de formas alternativas de transcritos para essa enzima, além disso conduzimos análises da expressão desse gene em pupas e adultos de operárias e rainhas de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae) e comparações com outros artrópodes.

Material e Métodos

Material Biológico e Tratamento com HJ III

O material biológico foi retirado de colméias de *Melipona scutellaris* mantidas no Meliponário Uberlândia, Uberlândia-MG (S 180 55' / W 450 17'). Os alvéolos de crias foram transportados para o Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia, onde os indivíduos foram identificados segundo o critério de Rossini (1989), como pupa de olho branco (POB), pupa de olho rosa (POR), pupa de olho marom (POM), pupa de olho preto (POP), pupa olho preto corpo pigmentado (POPp), recém-nascido (RN) e campeira (Camp), e imediatamente congeladas em ultrafreezer à -80°C . Larvas no estágio 3 (L3) foram tratadas topicamente com $1\mu\text{L}$ de HJ III ($0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Sigma) e mantidas em estufa a 32°C durante 4 horas.

Extração de RNA

A extração de RNA total das larvas foi feita pelo método do TRIzol (Gibco) segundo recomendações do fabricante. A abelha foi macerada em 1 mL de trizol para cada 100mg de tecido, agitado em vórtex e incubado por 5 minutos a 30°C . Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de trizol, agitando-se por 15 segundos e incubando-se a 30°C por 2 minutos, seguidos de centrifugação a 12000 g por 15 minutos a 4°C . A fase aquosa foi transferida para tubo de eppendorf ao qual foram adicionados $500\mu\text{L}$ de isopropanol para cada mL de trizol. A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugando-se a 12000 g por 10 minutos, a 4°C . O sedimento foi lavado com etanol 75 % e centrifugado a 7550 g por 5 minutos à 4°C . Depois de secagem ao ar, o material foi ressuspenso em $\text{H}_2\text{O}/\text{DEPC}$, quantificado a 260 nm e a integridade analisada em gel de agarose 1%.

O DNA genômico contaminante foi removido utilizando-se 10 U de Dnase I para cada $10\mu\text{g}$ de RNA. À reação adicionou-se ainda 10 U de inibidor de Rnase (Invitrogen). A reação foi realizada incubando-se por 30 min a T. A. Em seguida procedeu-se o aquecimento a 65°C por 10 min para inativar a Dnase I.

Transcrição Reversa (RT)

Na reação de transcrição foi utilizado 1 µg de RNA total tratado com Dnase I misturado a 500 µM de dNTP e 2 pmol de Oligo dT (15), completando-se o volume com H₂O/DEPC para 10 µl. Foi desnaturado a 65⁰C por 5 minutos e colocado em gelo. Em seguida foram acrescentados tampão 1 X, 5 mM de MgCl₂, 10 µM de DTT, 1 U de RNase out (Invitrogen) e 200 U de Super Script II (Invitrogen). A reação foi incubada por 42⁰C por 50 min, seguidos de 75⁰C por 15 min.

RT-PCR Semiquantitativo

Um microlitro da reação de RT foi utilizado para amplificar o gene da Metiltransferase utilizando 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, Tampão 1 X, 6 pmol de cada *Primer*, 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen).

O programa de ciclagem constituiu-se de um ciclo inicial de 95⁰C por 5 min. Trinta e cinco ciclos de 95⁰C por 1 min, 55⁰C por 1 min e 72⁰C por 1 min. Seguidos de uma incubação de 72⁰C por 5 min.

Os *primers* foram desenhados com base na seqüência da FAMeT de *Apis mellifera* (GenBank: CK628812), foward: 5' ATGCGTGGATTTTGGATAAGAT 3' e reverso: 5' CCACCCAAGCTACATAACAAA 3'. Actina foi utilizada como gene constitutivo para normalização da reação, F: 5' AGCTATGAACTTCCAGATGGT 3' e R: 5' CCACATCTGTTGGAAGGT 3'. Foi feita uma cinética de reação para verificar os números de ciclos ideais para cada gene. A densidade óptica (OD) foi analisada em programa IMVDS (*Image MasterTM VDS Software*, versão 2.0-Pharmacia Biosciences). Os valores obtidos foram submetidos à razão mRNA gene analisado/ mRNA actina, para obtenção da expressão relativa de cada gene nos indivíduos analisados.

Clonagem

Os dois fragmentos produzidos (374 e 401 pb) foram separados em gel de agarose 2,5 %, purificados pelo Kit Quiagen e clonados em pGEM-T Vector System (Promega) segundo recomendações do fabricante.

Extração de plasmídeo, confirmação de clones por restrição e seqüenciamento do clone

Foram cultivados 3 mL de cultura do clone, contendo 100 µg/mL de ampicilina *overnight*. Centrifugou-se 1,5 mL (6000 *g*), e descartou-se o sobrenadante. As células foram ressuspendidas em 200 µL de TE e incubadas no gelo por 5 min. Em seguida foram adicionados 360 µL de solução II (500 uL NaOH 2M, 500 uL SDS 10% e 4 mL de H₂O) recém preparada e homogeneizou-se por inversão. Após a lise celular adicionou-se 300 µL de solução III (3mL de acetato de Potássio 5 M, 1,15 mL de ácido acético e completar para 10 mL com água) e 2 µL de RNase (10mg/mL) e incubou-se por 10 min. Centrifugou-se por 10min a 10.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo ao qual adicionou-se 750 µL de isopropanol. Esse foi centrifugado por 10 min a 10.000 rpm. O sedimento foi resuspendido em 200 µL de TE. Foram adicionados 110 µL de acetato de amônio 7,5 M. O tubo foi vigorosamente agitado e centrifugado a 10.000 rpm por 15min a temperatura ambiente Ao sobrenadante foram acrescentados 750 µL de etanol 100% gelado e incubado -20 °C *overnight*. A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 30min a 4°C. Lavou-se com etanol 70% gelado e resuspendido em 50 uL de H₂O. O plasmídeo foi quantificado a 260 nm e visualizado em agarose 0,8 %.

Os Clones foram digeridos com a enzima Pvu II para confirmação. Clones positivos foram seqüenciados em MegaBace utilizando protocolo padrão. As reações de clonagem e sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília sob orientação da Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão.

Resultados e Discussão

O RNA foi extraído pelo método TRIzol e sua qualidade analisada em gel de agarose 1% (Figura 1). As amostras que apresentaram integridade foram quantificadas em espectrofotômetro a 260 nm.

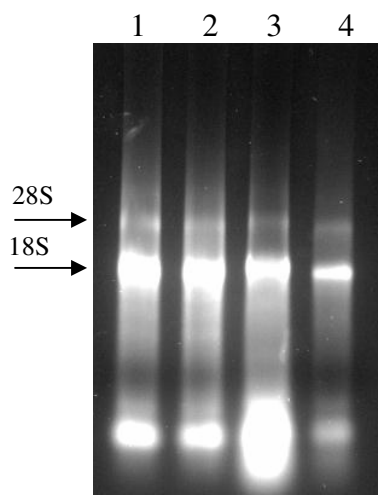


Figura 1: RNA total de *Melipona scutellaris* extraído pelo método Trizol. As setas indicam a posição do rRNA 28S e 18S. 1- pupa de olho branco; 2- pupa de olho rosa; 3- pupa de olho marrom; 4- pupa de olho preto.

Clonagem e sequenciamento de um fragmento do putativo gene MsFAMeT

Nos experimentos de RT-PCR foi usado *primers* específicos para o gene MsFAMeT que resultou em duas bandas (Figura 2), que foram purificadas do gel da agarose 2.5%. As bandas purificadas foram clonadas em pGEM-T Vector System (Promega) segundo recomendações do fabricante.

Para excluir seqüências de vetores utilizou-se VecScreen-Blast. A banda superior, sem o vetor, apresentou 401pb, enquanto que a banda inferior mostrou 374pb e foram submetidas ao GenBank com os números de acesso DQ011113 e DQ011114, respectivamente.

Utilizando *CAP3 Contig Assembly Program*, as seqüências foram alinhadas, formando um único *contig* que revelou, ainda, a presença de um *gap* de 27 nucleotídeos na seqüência relativa ao fragmento de menor tamanho, entre os nucleotídeos 161 e 187 (Figura 2 B). Ambas seqüências apresentam *Open Reading Frames* (ORF) preditas, de 133 e 124 aminoácidos.



Figura 2: RT-PCR de formas alternativas de MsFAMeT com splicing de um micro-exon de 27nt. **A**, Produtos de RT-PCR derivado de mRNA MsFAMeT em gel de agarose 2.5% corado com brometo de etídeo. M – Marcador 100pb (Invitrogen); 1 e 2– Amplicons de operárias POB e POP, respectivamente; **B**, Alinhamento das seqüências de 401pb (1) e 374pb (2) da MsFAMeT, mostrando um *gap* entre os nucleotídeos 161 e 187 do fragmento menor.

Nas análises por BLASTN do fragmento de 401pb contra dbEST (NCBI/GenBank), os três melhores *matches* correspondem a seqüências de *Apis mellifera* produzidas em diferentes bibliotecas de cDNA:

1 - BI509433 (92% de identidade; e-value = $3e^{-66}$) gerada a partir de bibliotecas *Normalized/Subtracted* preparadas de cérebros dissecados de operárias adultas de várias idades e vários grupos comportamentais.

2 -CK633115 (90% de identidade; e-value = $2e^{-48}$) gerada a partir de pupa de operária;

3 - BI946505 (90% de identidade; e-value = $2e^{-48}$) gerada via biblioteca de 5' de diferentes partes do gânglio cerebral de operárias adultas, a única até então anotada como “*similar to farnesoic acid o-methyltransferase*”.

Todos essas três prováveis ESTs ortólogos encontram-se agrupados pelo UniGene Ame.5015. Resultados similares foram encontrados quando se procedeu BlastN do fragmento de 374bp de MSFAMeT contra dbEST (NCBI/GenBank).

Utilizando BLASTN contra o genoma de *Apis* versão 3.0, ambas seqüências dos fragmentos de MsFAMeT apresentam alta similaridade ao

Group5.17. Ambas predições de aminoácidos apresentam similaridade ao Group5.17 (e-value = 5e-26 e 3e-27, respectivamente) quando analisamos por TBLASTN.

Análise por BlastP mostra alta similaridade dos fragmentos preditos de aminoácidos de MsFAMeT aos dados reunidos no LOC412543 – Entrez Gene/NCBI (GeneID: 412543) para *Apis mellifera* (e-value = 5e-59), onde encontram-se três seqüências preditas de proteínas a partir de um mesmo gene (XP_395998, XP_623146, XP_623207), corroborando que os 27nt a mais em um dos transcritos de MsFAMeT trata-se de um micro-exon (ICVGGHDRY). Alinhamentos múltiplos baseados em ClustaW (<http://services.bioasp.nl/blast/cgi-bin/clustal.cgi>) utilizando seqüências de aminoácidos de MsFAMeT, FAMeTs preditas em *Apis* e FAMeTs de crustáceos demonstram que apenas as abelhas expressam transcritos processados, com ausência dos 9aa relativos ao micro-éxon.

Análise comparativa de seqüências

Para aumentar a confiabilidade das próximas análises, levando em consideração a alta similaridade entre o fragmento de MsFAMeT e os preditos para *Apis mellifera*, utilizou-se a seqüência XP_623146 (AmFAMeT), uma predição que apresenta 296aa, para representar FAMeT dos Apidae. Verificamos que a provável FAMeT de Apidae revelou forte similaridade com Diptera, mas também entre Crustacea e Vertebrata (Tabela 1).

Caracterização molecular da MsFAMeT

Análise de motivos protéicos usando Prosite (<http://au.expasy.org/prosite>) revelou quatro sítios para *Casein kinase II phosphorylation*, dois para *Tyrosine sulfation*, um para *Tyrosine kinase phosphorylation*, três para *N-myristoylation*, um para *Asn-glycosylation*, corroborando os sítios de fosforilação para Serina (4), Treonina (2) e Tirosina (6) preditos pelo *NetPhos 2.0 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), usando *score* >0.6 como *cut-off*.

Tabela 1: Similaridades entre artrópodes e vertebrados relativos aos alinhamentos gerados por BlastP nr da seqüência AmFAMeT XP_623146.

| Organismo | GenBank | e-value |
|--|-----------|-------------------|
| <i>Drosophila melanogaster</i> (Insecta, Diptera) | AAF46666 | 6e ⁻⁹³ |
| <i>Drosophila pseudoobscura</i> (Insecta, Diptera) | EAL26493 | 4e ⁻⁹³ |
| <i>Drosophila yakuba</i> (Insecta, Diptera) | AAR10181 | 4e ⁻⁴⁶ |
| <i>Anopheles gambiae</i> (Insecta, Diptera) | XP_318631 | 2e ⁻⁴⁶ |
| <i>Homarus americanus</i> (Crustacea, Decapoda) | AAA67081 | 2e ⁻³⁰ |
| <i>Metapenaeus ensis</i> (Crustacea, Decapoda) | AAK28535 | 2e ⁻²⁹ |
| <i>Cancer pagurus</i> (Crustacea, Decapoda) | AAR00732 | 3e ⁻²⁹ |
| <i>Mesobuthus eupeus</i> (Arachnida, Scorpiones) | CAE53464 | 3e ⁻²⁹ |
| <i>Mesobuthus gibbosus</i> (Arachnida, Scorpiones) | CAE53527 | 6e ⁻²⁹ |
| <i>Panulirus interruptus</i> (Crustacea, Decapoda) | AAF65551 | 1e ⁻²⁸ |
| <i>Mesobuthus cyprius</i> (Arachnida, Scorpiones) | CAE53472 | 2e ⁻²⁸ |
| <i>Mesobuthus caucasicus</i> (Arachnida, Scorpiones) | CAE53465 | 9e ⁻²⁸ |
| <i>Gallus gallus</i> (Vertebrata, Aves) | XP_418255 | 2e ⁻¹⁹ |
| <i>Danio rerio</i> (Vertebrata, Teleostei) | XP_692623 | 2e ⁻¹⁸ |
| <i>Pan troglodytes</i> (Vertebrata, Primates) | XP_512483 | 2e ⁻¹⁸ |
| <i>Homo sapiens</i> (Vertebrata, Primates) | AAM50084 | 2e ⁻¹⁸ |

Foi feita a análise de domínios homólogos usando ProDom (<http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/current/html/form.php>) que revelou identidade com as seguintes famílias protéicas: 1 - PD293778 ($e\text{-value} = 4e\text{-}41$) entre os resíduos 157-295 (que corresponde aproximadamente a região dos domínios *DM9 repeats* descrito para *Drosophila melanogaster*), 2 - PD125360 ($e\text{-value} = 3e\text{-}37$) entre os resíduos 3-137 (que corresponde a região de *CF domain* descrito em FAMETs de crustáceos). A primeira família (PD293778) relaciona-se a “*acid o-methyltransferase*” (NorMD quality value = 1.019) e a segunda (PD125360) relaciona-se a “*metal-binding*” (NorMD quality value = 0.597). Comparações usando rpsBlast e cdartBlast, para busca de conservação e arquitetura de domínios protéicos, mostraram similaridade na porção C-terminal da AmFAMET com dois domínios DM9 consecutivos (resíduos 155 a 222, $e\text{-value} = 2e\text{-}15$; resíduos 227 a 295, $e\text{-value} = 4e\text{-}20$). Esse domínio DM9 (smart00696) é descrito como repetições encontradas em proteínas de *Drosophila*, sem função determinada. O domínio CF, presente na primeira metade N-terminal da AmFAMET, não se encontra descrito até o momento em nenhum banco de dados, mas suas características estão descritas por Holford *et al.* (2004). A massa molecular estimado para a AmFAMET (XP_623146) é 32,172Da e apresenta $pI = 4.52$ (o cálculo foi feito utilizando o programa *the Compute pI/Mw toll*, http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html).

Análise de expressão de MsFAMET durante o desenvolvimento de pupas e adultos de rainha e operária

As reações de RT-PCR foram feitas em tubos separados, mantendo a mesma proporção de todos os reagentes e também temperatura de anelamento de *primers* a 55°C, tanto para actina quanto para MsFAMET. Não foi feito a co-amplificação (reações *multiplex*) porque os tamanhos dos produtos gerados pelos *primers* MsFAMET e actina são próximos, a saber, 401pb e 374pb (MsFAMET) e 360pb (actina). A partir de uma curva cinética da fase log de amplificação para os genes MsFAMET e actina (considerando a leitura de densidade óptica), determinou-se que o número ideal de ciclos para as reações de PCR para que não houvesse saturação era 35 ciclos (Figura 3).

Para o cálculo dos níveis relativos de mRNA de MsFAMeT foram feitos três experimentos independentes, com normalização pela expressão do gene da actina e cálculo das médias e desvio padrão. A expressão de transcritos de MsFAMeT ocorre ao longo de todo desenvolvimento pupal e em adultos, com flutuações na expressão de ambos transcritos dentro das fases e entre as castas (Figura 4), segundo as análises de densitometria.

Curiosamente, apenas uma das formas alternativas de mRNA MsFAMeT está nitidamente expressa em rainhas nas fases POB, POR e POM. Dada a dificuldade de classificar rainhas, operárias e machos de *Melipona scutellaris* nos estágios larvais, não apresentamos ensaios de expressão nessas fases. No entanto, em experimentos de RT-PCR em pool de larvas, observamos expressão aparentemente constitutiva de ambos transcritos de MsFAMeT nos diversos instares (Vieira, não publicado).

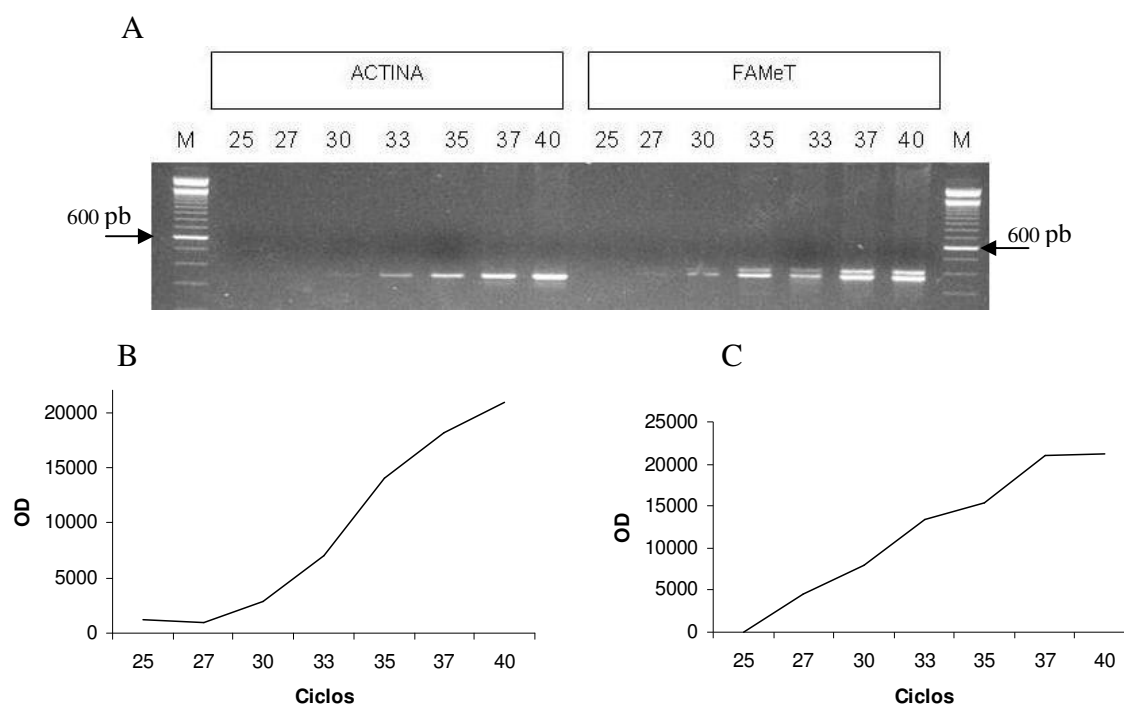


Figura 3: **A-** Cinética da amplificação dos genes de actina e FAMeT. Eletroforese em gel de agarose 2,5 % corado com brometo de etídio; M: marcador 100 pb. **B-** Representação gráfica da cinética de amplificação com *primer* da Actina. **C-** Representação gráfica da cinética de amplificação com *primer* da FAMeT.

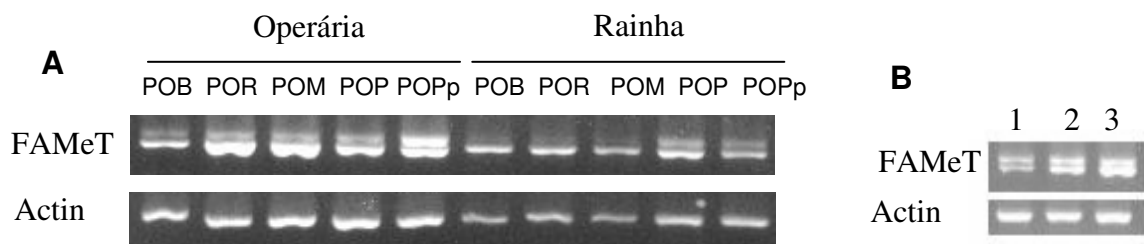


Figura 4: Análise da expressão gênica estágio-específica das formas alternativas de transcritos para MsFAMEt. **A:** RT-PCR semiquantitativa do fragmento do gene MsFAMEt durante o desenvolvimento de pupas de rainhas e operárias. POB: pupa de olho branco; POR: pupa de olho rosa; POM: pupa de olho marrom; POP: pupa de olho preto; POPp: pupa de olho preto corpo pigmentado. **B:** RT-PCR semiquantitativa do fragmento do gene da MsFAMEt em indivíduos adultos: 1 - operária recém-nascida (0 dias), 2 - campeira (30 dias), 3 - rainha virgem (4 dias).

Inibição da expressão do gene MsFAMEt após aplicação tópica de JH III

O efeito do HJ III na expressão da MsFAMEt foi analisado na fase L3. Nossos resultados mostram que o HJ provoca inibição da expressão apenas no transcrito menor de MsFAMEt após a primeira hora de tratamento, até a quarta hora. O transcrito maior apresenta uma tendência ao aumento de expressão com o acréscimo de HJ III, apesar de não ser estatisticamente significativo (Figura 5).

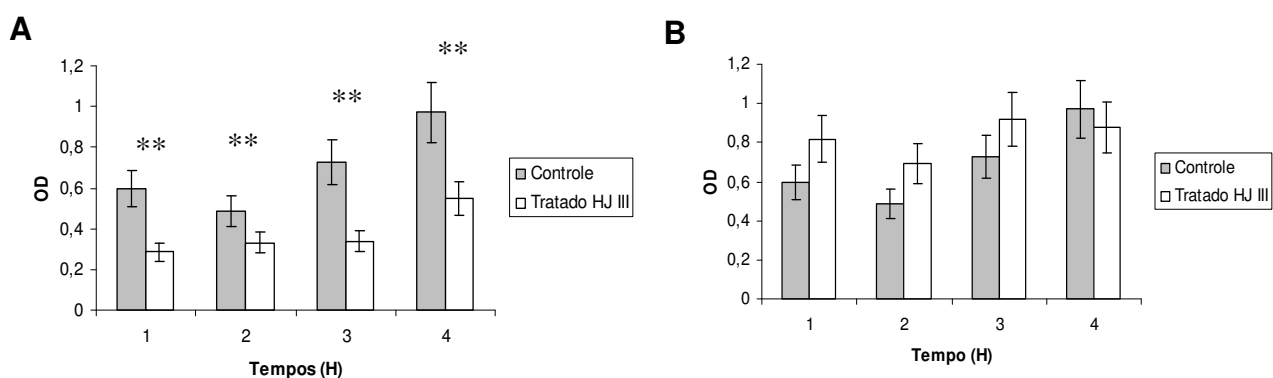


Figura 5: Rápida inibição na expressão do transcrito menor de MsFAMEt após aplicação tópica de JH III. Amostras de L3 foram tratadas com 0.5µg/µL de HJ III em solução de acetona. A expressão de MsFAMEt foi analisada por RT-PCR semiquantitativo e as duas bandas relativas a MsFAMEt mRNA foram quantificadas separadamente. Realizou-se 3 experimentos independentes. **A-** Os asteriscos (**) representam diferença estatística significativa ($p < 0.05$, *t*-test) entre a expressão do transcrito menor de MsFAMEt controle e após tratamento com HJ III. **B-** A aplicação de JH III não apresenta qualquer efeito estatisticamente significativo sobre a expressão do transcrito maior de MsFAMEt.

FAMeT é uma enzima que, em crustáceos, está envolvida na biosíntese de MF, que, por sua vez, tem importante papel no desenvolvimento, morfogênese e reprodução (Silva Gunawardene *et al.*, 2001, 2002, 2003; Ruddell *et al.*, 2003; Holford *et al.*, 2004). Nesses organismos, FAMeT falta o *SAM binding motif*, presente na enzima JHAMT de *Bombyx mori*, indicando que não são ortólogos (Shinoda e Itoyama, 2003).

Nesse trabalho nós clonamos e sequenciamos um fragmento de cDNA para uma provável FAMeT em *Melipona scutellaris*, muito similar a ESTs e outras seqüências preditas e experimentais de *Apis mellifera* e outros insetos, porém, são apenas moderadamente conservadas na evolução dos Artrópodes, sugerindo que somente domínios funcionais são conservados nessas moléculas.

Até o presente momento, as FAMeTs de crustáceos eram as únicas proteínas conhecidas que apresentam dois domínios CF em tandem, que correspondem a cerca de 95% da seqüência primária da enzima. Os domínios CF são constituídos por resíduos hidrofóbicos conservados que podem contribuir para ligação ao ácido farnesóico e também podem fazer parte do sítio catalítico (Holford *et al.*, 2004). Encontramos alta identidade entre parte da MsFAMeT com esses domínios sendo, portanto, o primeiro registro de domínio CF em insetos. Verificamos também que MsFAMeT, bem como o predito AmFAMeT (XP_623146), apresentam fraca similaridade com membros da família de genes nomeadas CPAMD8 (*complement 3 and pregnancy zone protein-like, alpha2-macroglobulin domain-containing 8*). Essa enzima também possui regiões semelhantes ao domínio CF e está envolvida na imunidade inata de vertebrados e também no transporte de hormônios (Li *et al.*, 2003).

A detecção de transcritos de mRNA de FAMeT durante todo o desenvolvimento pupal não era esperado, uma vez que, em insetos, FAMeT é uma enzima que participa das etapas finais da produção de HJ que, por sua vez, esta ausente nessas fases. Nossos dados de expressão em pupas de *Melipona scutellaris* corroboram a idéia de funções alternativas para a FAMeT, assim, sugerimos que a MsFAMeT e a CPAMD8, por possuírem características em comum, podem participar de processos biológicos correlacionados, ou, que nas fases pupais a FAMeT converta AF em MF e a via do mevalonato pararia nessa etapa, como em crustáceos. Nesse cenário, o MF apresentaria funções

específicas ligadas à metamorfose ou, também, MF seria acumulado para uso nas fases adultas, quando os títulos de hormônio juvenil aumentam, regulando eventos de vitelogenese, reprodução e polietismo etário.

As evidências computacionais encontradas nas seqüências de *A. mellifera* e o sequenciamento dos fragmentos de 401 e 374pb de *M. scutellaris* para uma provável FAMeT comprovam que uma segunda banda gerada por RT-PCR não é produto de contaminação genômica, ao contrário, trata-se de um evento *exon skipping* com *micro-exon splicing*. Análise da seqüência de um predito *DNA RefSeq* relativo ao AmFAMeT (NC_007074) indica a presença de três possíveis mRNA, das quais dois tipos foram detectados em *M. scutellaris*, incluindo esse splicing de 27nt. Esse micro-éxon de 27 nt estava flanqueado por seqüências acceptora e doadora de splicing, nomeada de AG na junção 3' e GT na junção 5' no íntron. Aparentemente, esse micro-éxon está presente em abelhas e ausente em Crustacea. Não há muitos trabalhos na literatura científica a respeito de micro-éxons. Em insetos, encontramos esse tipo de splicing descrito para os genes Fasciclina I (McAllister *et al.*, 1992), subunidade alfa 1 do canal de cálcio (Smith *et al.*, 1996; Gallo *et al.*, 2002) e Troponina T (Benoist *et al.*, 1998) em Drosophilidae.

A dedução da seqüência de aminoácidos e a predição da massa molecular do predito AmFAMeT XP_623146 (296aa; 32,172Da) assemelham-se aos encontrados para os crustáceos *Cancer pagurus* (275aa; 31,114Da), *Homarus americanus* (276aa; 31,463Da), *Metapenaeus ensis* (280aa; 32Da) e *Panulirus interruptus* (275aa; 30,973Da). Análises da seqüência protéica de AmFAMeT XP_623146 mostram múltiplos sítios para fosforilação e sulfatação dentro da molécula. Esses resultados são similares aos relatados para FAMeT, no qual mostram vários sítios para fosforilação e sulfatação em lagosta (Holford *et al.*, 2004) e camarão (Silva Gunawardene *et al.*, 2002) relacionados à função dessa enzima nesses organismos. Holford *et al* (2004) formularam duas hipóteses: 1, a enzima é inicialmente inativada e requer outros fatores para ativação ou 2, a enzima é fosforilada. Encontramos, ainda, um sítio de fosforilação de tirosina dentro dos 9aa do micro-éxon. Esse dado está de acordo Benoist *et al.* (1998) que sugerem a existência de regulação pós-traducional em associação com produtos de *splicing* alternativo em Troponina T durante o desenvolvimento.

Detectamos a expressão de ambas as bandas (cDNA) em diversos tecidos de *A. mellifera* (Nunes, não publicado) e, em *M. scutellaris*, ao longo do desenvolvimento pupal e formas adultas de rainhas e operárias (presente estudo). Essa enzima apresenta flutuações de expressão e, em alguns estágios e tecidos, uma das formas (transcrito maior) encontra-se ausente. Esse transcrito não está associado à função de converter AF em MF, pois apresenta tendência (não estatisticamente significativo) de aumento da expressão após tratamento com HJ III. Nossos resultados indicam que o transcrito maior desempenha funções relacionadas à diferenciação de castas, dada sua ausência nas fases iniciais do desenvolvimento pupal de rainhas e presença nas mesmas fases de operárias, e pode ser interpretado como mais um dos fatores protéicos ligados à cascata regulatória citada acima. Isso é similar aos dados relatados por Silva-Gunawardene *et al* (2002) quando especulam a possibilidade da FAMEt metilar outros substratos além do AF em diversos tecidos. Nossos resultados de RT-PCR semiquantitativo sugerem que a “forma maior” possui expressão inseto-, estágio-, e tecido específico.

Já o transcrito menor, após tratamento tópico de HJ III em L3, é inibido, indicando que esse mRNA está intimamente associado na via de biosíntese de HJ, não sendo tão requisitado quando há elevado título de HJ circulante. Logo, essa inibição e, mais, a diminuição dos níveis de expressão desse transcrito nos estágios iniciais de pupas de rainhas, se comparados aos mesmos estágios em operárias, confirmam que esse transcrito está relacionado à diferenciação das castas. Bonetti *et al* (1995) verificaram a produção de rainhas a partir de larvas de operárias de *Melipona* por meio da aplicação tópica de HJ I, II e III. Ou seja, o acréscimo de HJ desencadeia, nas fases larvais, a programação genética para diferenciar rainhas de operárias. Podemos interpretar que o título de HJ III ativa uma cascata gênica que regula processos de determinação e diferenciação de castas, no qual, o transcrito menor de MsFAMEt está inserido.

Em conclusão, esse trabalho abre perspectivas para o estudo da diversidade de genes e proteínas envolvidos na biosíntese de HJ, seus mecanismos de controle da expressão gênica e funções. No caso das formas alternativas de mRNA para MsFAMEt, ambas podem constituir ferramentas importantes para elucidação de eventos de diferenciação de castas em abelhas.

Capítulo 2

Perfil da expressão dos genes da Esterase do Hormônio Juvenil e Epóxide Hidrolase do Hormônio Juvenil em *Melipona scutellaris*

Resumo

O Hormônio Juvenil (HJ) é o principal hormônio que regula a determinação de casta e o polietismo etário em abelhas. Os títulos desse hormônio, na hemolinfa, são regulados pela taxa de biossíntese e degradação. Duas enzimas participam da via de degradação, a Esterase de Hormônio Juvenil (EHJ) que degrada o HJ em HJ ácido e a enzima Epóxide Hidrolase do Hormônio Juvenil (EHHJ) que o degrada em HJ diol. Nesse trabalho analisamos a expressão dos genes que codificam para Esterase do HJ (MsEHJ) e Epóxide Hidrolase do hormônio juvenil (MsEHHJ) em *Melipona scutellaris*, e a influência do HJ e da ecdisona na expressão desses genes. A análise de expressão revelou que as MsEHJ e MsEHHJ são expressas durante todo o desenvolvimento pós-embrionário. Tratamento com HJ provocou aumento da expressão nos dois genes analisados e injeção de ecdisona não mostrou nenhuma influência na expressão dos genes.

Introdução

O desenvolvimento pós-embrionário de insetos é regulado por dois hormônios: o ecdisteróides, 20-hidroxiecdisona e o sesquiterpenoide, hormônio juvenil (HJ). O HJ evita a metamorfose no estágio larval e estimula a reprodução nos estágio de adultos (Riddiford, 1996). Em abelhas, os níveis de HJ na hemolinfa é um fator importante na diferenciação de casta (Hartfelder e Engels, 1988; Bonetti 1995) e no polietismo etário (Robinson, 1987).

As enzimas Esterase do HJ (EHJ) e Epóxide Hidrolase do HJ (EHHJ) são responsáveis pela degradação do HJ. Esterase HJ é encontrada na hemolinfa enquanto que a EHHJ é encontrada no citossol. A maioria das pesquisas concentra-se no mecanismo de ação da EHJ (Kamita *et al.*, 2003), pouco é conhecido sobre a EHHJ.

O sítio primário de síntese da EHJ é o corpo gorduroso, porém existem outros tecidos que podem expressar essa enzima (Feng *et al.*, 1999). Harshman *et al.* (1991) sugerem que os vários genes EHHJs de um indivíduo representam enzimas tecido-específicas que se apresentam na forma solúvel (citoplasmática) ou microsossomais, porém as EHHJs mais associadas ao metabolismo do HJ são microsossomais (Keiser *et al.*, 2002).

Evidências apoiam a existência de dois genes codificantes para EHJ. Vermunt *et al.* (1998) clonaram e sequenciaram dois genes de esterases do HJ em *Leptinotarsa decemlineata*, que apresentam 82% de similaridade. Em *Drosophila melanogaster* o gene da EHJ é composto por 5 éxons e contém uma *open reading frame* de 1.7 Kb. Na posição 5', imediatamente adjacente ao gene da EHJ, existe outro gene carboxilesterase (FlyBase CG8424) que tem 42% de similaridade com a EHJ e contém um sítio catalítico (Kamita *et al.*, 2003), que pode ter sido gerado por duplicação (Campbell *et al.*, 2001).

Não existem dados na literatura sobre as enzimas envolvidas na degradação do HJ em abelhas sem ferrão. Nesse trabalho, analisamos a expressão dos genes MsEHJ e MsEHHJ por RT-PCR semiquantitativo durante o desenvolvimento pós-embrionário de *M. scutellaris* e a influência do HJ e Ecdisona exógenos na expressão desses genes.

Material e Métodos

O material biológico foi retirado de colméias de *Melipona scutellaris* mantidas no Meliponário Uberlândia, Uberlândia-MG (S 180 55' / W 450 17'). Os alvéolos de crias foram transportados para o Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia, onde os indivíduos foram identificados segundo o critério de Rossini (1989), como 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 olho preto corpo pigmentado (POPp), recém-nascido (RN) e campeira (Camp). Para quantificação de HJ o estágio L3 foi subdividido L3-1: grande quantidade de alimento líquido no alvéolo de cria; L3-2: alimento pastoso; L3-3: pouca quantidade de alimento e sólido no alvéolo. Em seguida, foram imediatamente congeladas em freezer a -80°C .

Tratamentos Hormonais

Larvas no estágio LPD foram tratadas topicamente e isoladamente com 1 μL de HJ III (Sigma), dissolvido em acetona P.A. (Merck) na dosagem de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. As larvas foram mantidas em estufa a 31°C , com umidade relativa de 80%, mantida por meio de solução saturada de KCl em dessecador (ASTM 1951). Larvas controle (tratadas com acetona) foram idênticamente manipuladas. Após uma e quatro horas do tratamento, foram coletadas larvas Tratadas e Controle e congeladas em ultrafreezer a -80°C até o momento da extração do RNA.

Uma solução de 40 μg de ecdisona (Fluka) dissolvido em 10 μl de etanol foi preparada e diluída em 30 μL de solução Ringer no momento do uso, foi injetado, com microsseringa Hamilton no 2° tergito, 1 μL dessa solução de ecdisona (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em pupa de olho rosa (POR). Indivíduos na fase de pupa de olho marrom (POM) foram coletados e congelados em ultrafreezer para posterior análise da expressão gênica. Indivíduos controle foram injetados com etanol diluído em solução Ringer, sem ecdisona e igualmente manipulados.

Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA total foi feita pelo método do TRIzol (Gibco) segundo recomendações do fabricante. O material foi ressuspendido em H₂O/DEPC, quantificado a 260 nm e a integridade analisada em gel de agarose 1%. O DNA contaminante foi removido por digestão com DNase I Rnase-Free (Sigma). Um micrograma de RNA foi utilizado para reação de transcrição reversa, utilizando-se 2 pmols de poli(T)₁₅ e 1 µL de SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante.

Amplificação do gene das enzimas Esterase e Epóxide Hidrolase de *M. scutellaris* por RT-PCR

Um microlitro da reação de RT foi utilizado para amplificar os genes MsEHJ e MsEHHJ utilizando 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, Tampão 1 X, 10 pMol de cada *primer*, 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen).

O programa de ciclagem constituiu-se de um ciclo inicial de 95⁰C por 5 min, seguidos por quarenta ciclos de 95⁰C por 1 min, 58⁰C por 1 min e 72⁰C por 1 min e extensão final de 72⁰C por 5 min.

Os *primers* foram desenhados com base na seqüência da esterase (AY647436) e Epóxide hidrolase (XM 394922) de *Apis mellifera*. Os *primers* usados na PCR foram: EHJ-F, 5'- AGATGCGCCCAGAGTAAAAA-3', EHJ-R 5'- TTTCCCAACTGGAGGTAACG- 3', Actina-F, 5'- AGCTATGAACTTCCAGATGGT- 3' e Actina-R 5'- CCACATCTGTTGGAAGGT-3'; EHHJ-F, 5'- GTTATCGCTTCTGATATGGCT -3' e EHHJ-R 5'- GATGGGAAATAGGTACCGAC- 3',

Expressão dos genes EHJ e EH durante o desenvolvimento de operária por RT-PCR semiquantitativa

A actina foi utilizada como gene constitutivo para normalização da reação. Foi feita uma cinética de reação para verificar o número ideal de ciclo para cada gene envolvido na análise, sendo 35 ciclos tanto para actina, quanto para EHJ e

37 para EH. Os transcritos dos indivíduos analisados foram processados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % e corados com brometo de etídeo. A densidade ótica (OD) foi analisada em programa IMVDS (*ImageMaster™ VDS Software*, versão 2.0- Amersham Biosciences). Os valores obtidos foram submetidos à razão mRNA alvo/ mRNA actina para obtenção da expressão relativa de cada gene nos indivíduos analisados.

Radioimunoensaio para Hormônio Juvenil (RIA)

1) Extração de HJ da hemolinfa

Extração de HJ de amostras de hemolinfa foi feita na USP - Ribeirão Preto sob a orientação do Dr. Klaus Hartfelder. Para a extração, 500µL acetonitrila são adicionados a cada 5µL de hemolinfa. Após agitação vigorosa, as amostras e manter em gelo por 10min, os tubos de ensaio de vidro (1,5 mL) foram centrifugados a 7500 g por 10 min a 4°C. Para a extração em fase líquida, o sobrenadante dos tubos foi transferido para tubos de ensaio de 5 mL aos quais foram adicionados 1 mL NaCl (0,9% m/v) e após agitar vigorosamente, adicionado mais 1 mL de hexano. Os tubos foram vigorosamente agitados por 30 s e deixados em gelo por 10 min. A separação das fases aquosa e orgânica ocorreu por centrifugação a 200 g, 5 min, 4°C. A fase superior, contendo o extrato em hexano foi transferida para novo tubo de vidro e a extração foi repetida duas vezes por adição de 1 mL de hexano à fase aquosa. O conjunto das fases de hexano (3 ml por amostra) foi reduzido para 1 mL por centrifugação a vácuo (Speed-Vac). Os extratos foram transferidos para tubos de ensaio de vidro 1,5 mL e o solvente removido totalmente em Speed-Vac para iniciar o RIA.

2) Curva-padrão

Para o estabelecimento da curva padrão foram pipetados 0,5 a 100µL de uma solução mãe de HJ III (Fluka, Suíça) com 100 pg/µL em metanol em tubos de ensaio de vidro, criando uma curva padrão de 50 pg a 10 ng de HJ III em duplicata. Após remoção completa do solvente por centrifugação a vácuo das

amostras e da solução da curva padrão, foi realizado o RIA, segundo protocolo de Goodman *et al.* (1990).

3) Reação de diluição de isótopos por competição antígeno-anticorpo.

A solução de HJ radioativo foi preparada para conter 6000-6500 cpm/50 μL de [10^{-3}H(N)] hormônio juvenil (NEN, Boston, atividade específica de 718 GBq/mmol) em tampão Borato. O antisoro específico para detecção de HJ, preparado por injeção de HJ conjugado com tireoglobulina (Goodman *et al.*, 1990) que foi cedido pelo Prof. Walter Goodman (Univ. Wisconsin, Madison, USA). O antisoro específico utilizado foi diluído 1:2000 em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) contendo 0,1% (m/v) de albumina de soro bovina (Sigma), 0,1 % (m/v) IgG de coelho (Sigma) e 0,02% (m/v) azida de sódio. Como soro controle para determinar a ligação inespecífica foi utilizado o tampão fosfato com BSA e IgG.

Para montagem do RIA, cada tubo de ensaio recebeu 50 μL de solução de HJ marcado. Após agitar os tubos vigorosamente para garantir mistura completa de HJ da amostra com a solução de HJ marcado, os tubos receberam 200 μL de solução de soro anti-HJ, com exceção dos dois tubos da ligação inespecífica que receberam 200 μL de soro controle. Após agitar vigorosamente, os tubos foram mantidos a 4°C por, no mínimo, 12 horas para garantir o equilíbrio da reação de ligação do HJ marcado e não marcado com o anticorpo.

O RIA foi finalizado por adição de 250 μL de solução saturada de sulfato de amônio, mantendo uma concentração final de 50% de sulfato de amônio, assim garantindo a separação de HJ ligado ao anticorpo do HJ livre. Para contagem da emissão beta, o sedimento foi ressuspensionado em 20 μL de água destilada e transferido para um tubo de cintilação líquida. O tubo de ensaio foi novamente lavado com 20 μL de água e, transferidos para o mesmo tubo de cintilação líquida. Posteriormente, foi adicionado o líquido de cintilação HiSafe3 (Wallac-Packard).

4) Análise dos dados.

Os resultados da contagem da emissão beta, obtidos em contador de cintilação líquida (Beckman, LS 6000) foram introduzidos em planilha Excel para calcular o conteúdo de HJ nas amostras. A análise baseou-se na transformação

log/logit dos resultados da curva padrão, para obtenção dos coeficientes da regressão linear utilizados no cálculo das concentrações de HJ nas amostras de hemolinfa. As dosagens foram expressas em μg equivalentes de HJ III por μL de hemolinfa.

Resultados e Discussão

As enzimas Esterase do HJ e Epóxide Hidrolase do HJ estão envolvidas na degradação do HJ, esse hormônio tem grande importância no crescimento e desenvolvimento de insetos (Newman *et al.*, 2005). Em abelhas, o título de HJ na hemolinfa é fator importante na diferenciação de casta (Kerr 1974; Hartfelder e Engles, 1998).

O perfil de expressão do mRNA de MsEHJ e MsEHHJ de *M. scutellaris* durante o desenvolvimento pós-embrionário (Figura 1), analisados por RT-PCR semiquantitativo, revelou diferença de expressão desses genes durante o desenvolvimento ontogenético.

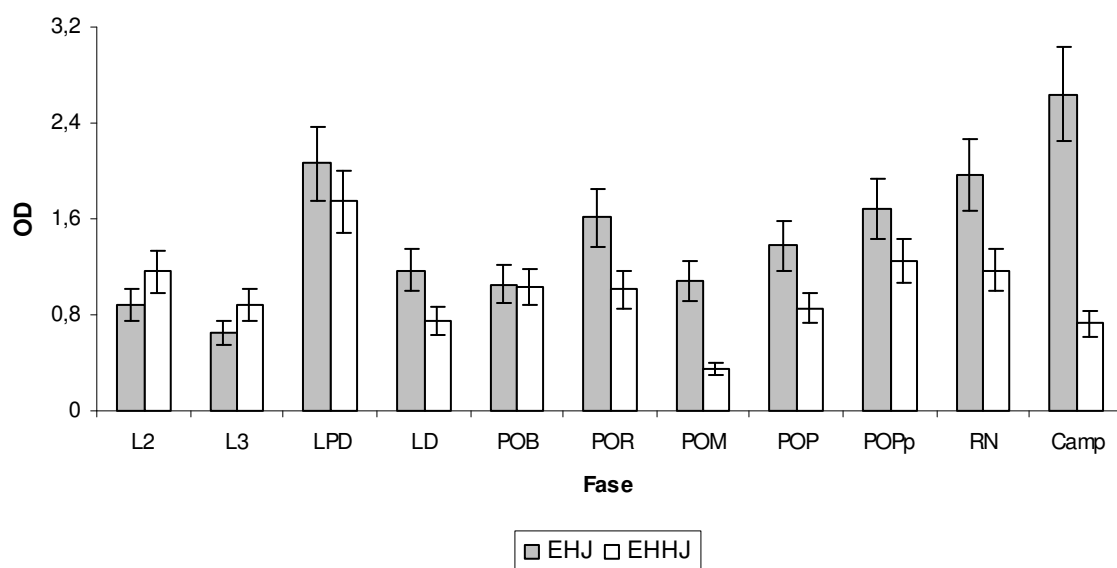


Figura 1: Perfil de expressão da EHJ e EHHJ durante o desenvolvimento pós-embrionário de *M. scutellaris* usando RT-PCR semi-quantitativo. OD: densidade óptica. Actina foi utilizada para normalizar a reação. L2: Larva 2; L3: larva 3; LPD: larva pré-defecante; LD: larva defecante; POB: pupa de olho branco; POR: pupa de olho rosa; POM: pupa de olho marrom; POP: pupa de olho preto; POPp: pupa de olho preto corpo pigmentado; RN: recém-nascido; Camp: campeira.

A análise de expressão dos genes MsEHJ e MsEHHJ mostrou que, no estágio larval, LPD tem o dobro de mRNA desses genes do que L3, pico que ocorre em função da necessidade de degradar o HJ circulante para que ocorra a metamorfose. Zhang *et al.*, (2005) encontraram forte expressão da EHHJ no final

do quarto e no início do quinto instar e decréscimo no final do quinto instar, em *Bombyx mori*, exatamente como ocorreu em larvas de *M. scutellaris* no último instar larval. Em *Culex quinquefasciatus* ocorrem dois picos de atividade de EH, um antes e outro durante a metamorfose (Lassiter *et al.*; 1995).

Khlebodarova *et al.* (1996) realizaram análises comparativa da atividade de duas enzimas metalolizadoras do HJ (EHJ e EHHJ) em *Drosophila* e verificaram baixa atividade da enzima EHJ em larva, com um único pico de atividade durante a metamorfose e declínio da atividade após a mesma. Para EHHJ ocorre um pico em larva, com declínio na metamorfose e aumento da atividade em adultos. No quarto instar de *Bombyx mori*, Hirai *et al.* (2002) verificaram transcritos da BmJHE no corpo gorduroso, porém baixa atividade enzimática na hemolinfa. Esses autores comprovaram em análises por *western blot* que BmJHE apesar de ser transcrita no quarto instar é secretada na hemolinfa no quinto instar.

A atividade de EHHJ e EHJ de *Culex quinquefasciata* foi mensurada no último estágio larval e em pupa por Lassiter *et al.* (1995). Esses encontraram níveis basais de atividade dessas duas enzimas durante os estágios de pupa. Diferentemente desses resultados, encontramos uma forte expressão de mRNA de MsEHJ nas fases de pupa. Feng *et al.* (1999), também, encontraram expressão de mRNA de EHJ em *Choristoneura fumiferana* nos primeiros dias de vida de pupa, porém a expressão diminuindo com o aumento da idade das pupas. Keiser *et al.* (2002) encontraram forte atividade enzimática de EH nos estágios de larva, pupa e adultos de *Ctenocephalides felis*, e análises de expressão de mRNA revelaram uma expressão relativamente constante desse gene durante todos os estágios do desenvolvimento. Observaram, ainda, que a EHHJ tem uma expressão menor do que a esterase do HJ.

As análises, por RIA, do título de HJ em larvas de *M. scutellaris* revelaram que no estágio L3-3 dois indivíduos distinguem-se com alto título de HJ (327,25 e 346,31 pg/ μ L) entre os indivíduos que apresentaram títulos entre 190,0 a 31,12 pg/ μ L (Figura 2). As larvas com alto título de HJ podem ser de rainhas, visto que em meliponídeos, as rainhas têm maior título de HJ circulante do que as operárias (Hartfeldr e Rembold,1991; Kerr *et al.*, 1975). O estágio de L3-3 mostrou ser o mais favorável para identificação de larvas que provavelmente se diferenciarão em rainhas, pois é possível destacar um grupo de indivíduos com títulos mais

altos de HJ do que outros. Quando comparamos a expressão dos genes que codificam para as enzimas EHJ e EHHJ com o título de HJ, em larvas, é possível correlacionar um aumento na expressão dessas enzimas em LPD com um agrupamento de indivíduos entre 100 e 3 pg/ μ L (Figura 2), confirmando papel delas na degradação do HJ.

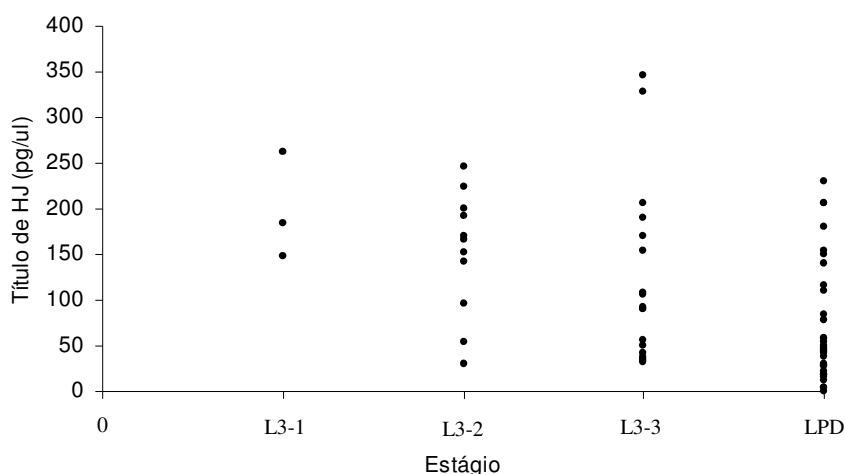


Figura 2: Quantificação de HJ de larvas por radioimunoensaio. L3-1: larva no estágio 3 (L3) com grande quantidade de alimento e líquido, no alvéolo de cria. L3-2: larva L3 com alimento pastoso. L3-3: larva L3 com pouco alimento e sólido no alvéolo de cria. LPD: Larva pré-defecante, sem alimento no alvéolo de cria.

Em pupas de *M. scutellaris*, a análise mostrou expressão dos genes MsEHJ e MsEHHJ nos estágios de pupa, o que discorda para os dados obtidos para *A. mellifera* nessa fase do desenvolvimento. Os níveis basais de HJ circulante na hemolinfa nos estágios de pupa, em *Apis* (Rembold, 1987), podem estar relacionados com a ausência de expressão dos genes dessas enzimas, nessa fase. Em *Melipona*, a expressão desses dois genes em pupa, pode indicar presença de HJ circulante nessas fases, o qual seria utilizado em processos fisiológicos diferentes daqueles que ocorrem em *Apis*.

Operárias recém nascidas, de *M. scutellaris*, apresentam alta expressão do gene da EHHJ ao contrário de campeiras que apresentaram uma baixa expressão. Resultado similar foi encontrado por Khlebodarova *et al* (1996) que observaram elevada atividade da enzima EHHJ durante os estágios larvais, rápida queda em pupa e altos níveis de atividade dessa enzima, em adultos de

Drosophila melanogaster. Entretanto, operárias recém-nascidas não apresentam diferença na expressão da EHJ em relação as camperias.

Alguns estudos têm indicado que mudanças nos títulos de EHJ e EHHJ na hemolinfa de insetos são reguladas temporalmente (Kramer *et al.*, 1977; Wing *et al.*, 1981). Em *C. fumiferana*, HJ-I aumenta e 20E diminui a expressão do mRNA EHJ em cultura de células CF-203 (Feng *et al.*, 1999). Em *T. ni*, análogo do HJ induz a expressão de mRNA EHJ *in vivo* (Verkataraman *et al.*, 1994). Lassiter *et al.* (1995) observaram aumento na atividade da EHHJ em pupas de *Culex quinquefasciatus*, tratadas com HJ. Similarmente, encontramos um aumento da expressão de MsEHJ após três e quatro horas de tratamento com HJ III e aumento na quarta hora na expressão da MsEHHJ, em larva LPD de *M. scutellaris* (Figura 3), indicando que a expressão desses genes é regulada por esse hormônio.

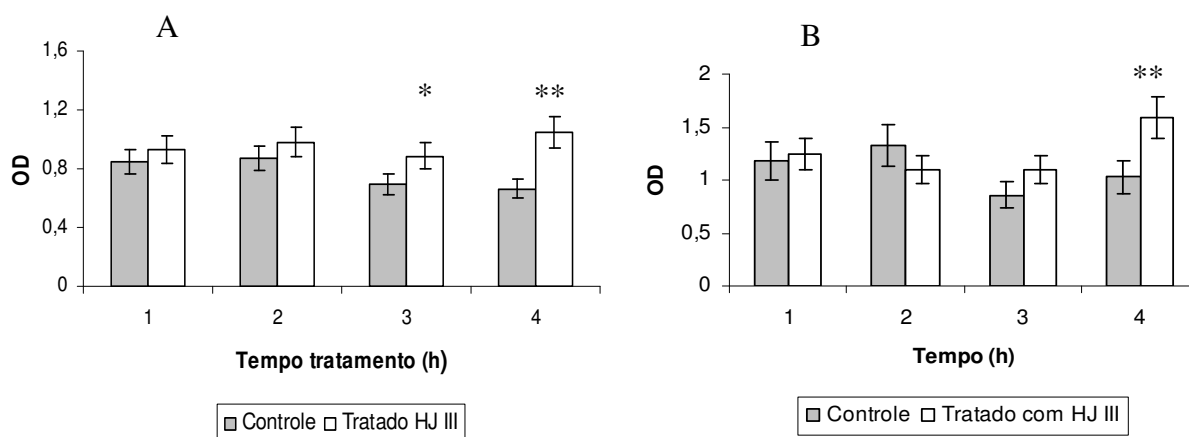


Figura 3: Efeitos da aplicação tópica de HJ III na expressão de MsEHJ (A) e MsEHHJ (B). Larvas (LPD) foram tratadas com 0,5 µg de HJ III e a expressão dos genes. MsEHJ e MsEHHJ foi analisada por RT-PCR semiquantitativo. Os asteriscos representam o tempo de tratamento em que a diferença de expressão dos genes analisados entre os grupos controle e tratado foi significativa (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$ *t*-test). Foram feitos 3 experimentos independentes.

A comparação do perfil de expressão de mRNA de pupas em *M. scutellaris* com os títulos de ecdisona em *Melipona quadrifasciata* obtido por Pinto *et al.* (2002) mostra em POR alta expressão dos genes que codificam para MsEHJ e

MsEHHJ e baixo título de ecdisona em POM, a queda na expressão desses genes é acompanhada pela elevação dos títulos de ecdisona (Figura 4). Para verificar a hipótese de que a ecdisona influencia na expressão dos genes MsEHJ e de MsEHHJ, foi injetado ecdisona na fase de POR e analisada a expressão dos genes na fase de POM. Não se observou diferença na expressão desses genes. Levantam-se duas hipóteses: 1- ecdisona não tem influência na expressão dos genes MsEHJ e MsEHHJ; 2- enzimas degradam rapidamente a ecdisona exógena impedindo-a de alterar a expressão dos genes.

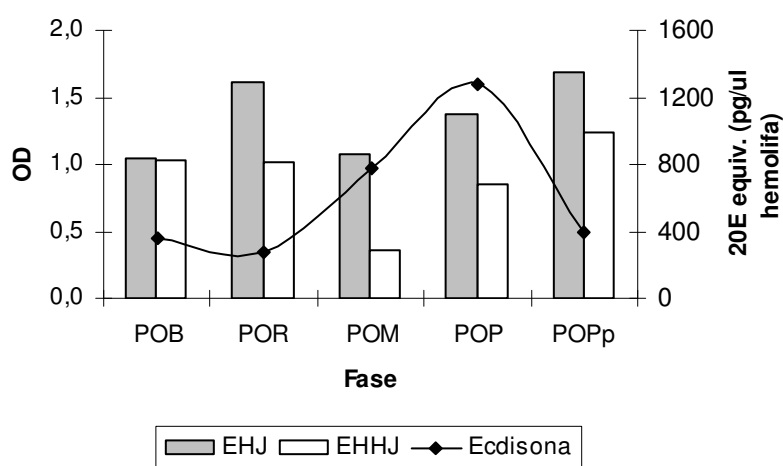


Figura 4: Comparação dos títulos de ecdisona com a expressão da MsEHJ e MsEHHJ em operárias de *Melipona*. A curva de titulação de ecdisona, em *Melipona quadrifasciata*, foi feita por Pinto *et al.* (2002). POB: pupa de olho branco; POR: pupa de olho rosa; POM: pupa de olho marrom; POP: pupa de olho preto; POPp: pupa de olho preto corpo pigmentado.

Em *M. scutellaris*, a análise da via de degradação do HJ mostrou que os genes que codificam para as enzimas EHJ e EHHJ estão se expressando durante todas as fases do desenvolvimento pós-embrionário. Larvas que receberam tratamento com HJ III e foram analisadas 1, 2, 3 e 4 horas após o tratamento apresentaram aumento significativo da expressão desses genes 4 horas após a aplicação, conforme se detectou via RT-PCR semiquantitativo. A quantificação de HJ circulante na hemolinfa depende da síntese, manutenção e/ou degradação do HJ durante o desenvolvimento do indivíduo. Considerando isso, é possível concluir que a expressão dos genes das enzimas de degradação do HJ está

diretamente relacionada como os processos fisiológicos que, entre outros produtos, promove a diferenciação em rainha ou operária, em determinada fase do desenvolvimento pós-embriônico.

A expressão dos genes das enzimas de degradação do HJ em *Melipona* mostrou perfil diferente do apresentado por *A. mellifera* (Santos, c.p.) o que pode indicar envolvimento no peculiar mecanismo de diferenciação das castas em *Melipona* corroborando a hipótese de Kerr (1974). Para testar essa hipótese, a expressão desses genes será analisada, em trabalhos posteriores, durante o desenvolvimento de rainhas.

Capítulo 3

Identificação de peptídeos ligantes específicos em cérebro de *Melipona scutellaris* por Phage Display *in vivo*

Resumo

Abelhas são insetos sociais e excelentes modelos para estudos de neurobiologia de aprendizagem e memória porque, apesar de terem cérebro pequeno podem realizar um repertório complexo de comportamento. Nesse trabalho, utilizamos a técnica de Phage Display *in vivo* para identificar peptídeos ligantes específicos ao cérebro da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*. Foram utilizados dois tipos de bibliotecas apresentadas em fagos M-13, uma linear e uma constricta, somente clones da biblioteca de peptídeos linear foram seqüenciados. A análise de bioinformática mostrou que todos os clones selecionados apresentaram peptídeos similares a proteínas expressas em cérebro de outros insetos. A análise de expressão das proteínas do cérebro ligantes de peptídeos (fagos) revelou que alguns clones similares a transportadores de glutamato e lipoforina estão expressos somente em cérebro de adultos, enquanto que os ligantes de outros clones estão expressos durante os estágios de pupa e adultos. A análise do mapeamento da região de ligação dos fagos no cérebro de *M. scutellaris* mostrou que alguns fagos se ligam em todo o cérebro e outros têm ligação sítio-específica. Foi verificada a funcionalidade de um clone similar a alatostatina, que modificou o perfil de expressão de esterases em campeiras.

Introdução

As abelhas são insetos sociais e excelentes modelos para estudos de neurobiologia da aprendizagem e memória porque apesar de terem cérebro pequeno, podem realizar um grande repertório de comportamento (para revisão, veja Menzel, 1999; Page e Erber, 2002). Elas apresentam “displays” cognitivos ricos, complexos e flexíveis (Wehner, 1971) e formam colônia com uma única rainha, alguns machos e centenas ou milhares de operárias. Em contraste com rainhas e machos, as operárias realizam uma variedade de trabalhos dentro da colônia. As operárias jovens (nutridoras) alimentam e cuidam das larvas e da rainha em *Apis*. Em *Melipona*, as operárias aprovisionam o alvéolo de cria e após a oviposição pela rainha, o operculam e o mesmo é reaberto na eclosão do adulto. Além disso, elas cuidam da estrutura da colméia e estocagem do mel e pólen. As abelhas campeiras coletam néctar e pólen (Kerr *et al.*, 1962).

Esses comportamentos requerem um sistema sensorial elaborado que permitem aprendizagem e memória (Tsuchimoto *et al.*, 2004) e são acompanhados por mudanças no sistema endócrino, na bioquímica do cérebro e demais estruturas associadas. Os níveis de hormônio juvenil (HJ) e aminas biogênicas são altos em campeiras em comparação com nutridoras (Fahrbach e Robison, 1996; Wagener-Hulme *et al.*, 1999). O volume de glomérulos no lobo antenal e de neurópilas dos corpos de cogumelos aumentam, também, dependendo da idade e da atividade do inseto (Sigg *et al.*, 1997).

A tecnologia de Phage Display tem sido utilizada para produzir diagnósticos clínicos, novas drogas contra diversas patologias e para mapeamento de interação proteína-proteína (veja revisão em Rodi e Makowski, 1999). Proteínas, anticorpos, hormônios, inibidores de proteases, enzimas e proteínas que se ligam a ácidos nucleicos tem sido mapeados por essa técnica. Normalmente, utiliza-se o bacteriófago filamentosso M-13 para construção de uma biblioteca de pequenos peptídeos fusionados à proteína pIII, que permite realizar “screening” de peptídeos ligantes a molécula alvo por seleção *in vitro* (biopanning). Bibliotecas de peptídeos randômicos têm sido usadas com sucesso para identificar peptídeos bioativos contra receptores purificados e imobilizados ou contra células intactas (Rodi e Makowski, 1999) e para identificar alvos ligantes de um órgão particular ou um tipo celular *in vivo* (Pasqualini e Ruoslahti, 1996). Sem alvo, a partícula

viral (fago) não tem tropismo por células, exceto células bacterianas (Barry *et al.*, 1996).

Nesse estudo utilizamos a técnica de Phage Display *in vivo* para identificar peptídeos ligantes específicos no cérebro de abelha sem ferrão *M. scutellaris*, sobre a qual não existem dados na literatura sobre a estrutura e funcionamento cerebral. Abelha *Melipona* tem importante papel na polinização de plantas no Brasil e apresenta importante mecanismo peculiar de determinação de casta genético - alimentar (Kerr, 1974), podendo ser considerada um laboratório vivo para pesquisas de natureza molecular. Bibliotecas de fagos expressando heptapeptídeos foram injetadas no abdome de campeiras e fagos ligantes ao cérebro foram isolados. A análise de bioinformática mostrou que todos os peptídeos são similares a proteínas expressas em cérebro de outros insetos. As análises de imunohistoquímica foram eficientes para mapear a ligação de alguns fagos em regiões específicas do cérebro e outros que se ligam em todo o cérebro. A técnica de dot-blotting foi utilizada com sucesso para analisar a expressão de proteína do cérebro que interage com o peptídeo do fago, em todos os clones analisados, a operária campeira apresentou a marcação mais forte, demonstrando que a técnica foi eficiente para selecionar fagos ligantes a proteínas expressas em cérebro de operária.

Material e Métodos

Biopanning *in vivo* e Bioinformática

Abelhas operárias de colméias de *Melipona scutellaris* coletadas no estado da Bahia, Brasil (nas cidades de Catu, Murici e Alagoinhas), que são mantidas no Meliponário Uberlândia, Uberlândia-MG, foram usadas como material biológico nesse trabalho.

Duas bibliotecas comerciais de peptídeo apresentadas em fago M-13 foram utilizadas, sendo uma biblioteca linear *heptapeptide phage library Ph.D.-7* e uma constricta *conformational heptapeptide phage library Ph.D.-C7C* (complexidade: $1,28 \times 10^9$ transformantes) com heptapeptídeos fusionados a proteína pIII (3-5 cópias por partícula de fago) da New England BioLabs, Schwalbach, Alemanha.

Os fagos foram injetados no segundo tergito de operárias campeiras na dose de 2×10^9 fagos/ μ L (mistura das duas bibliotecas) diluídos em tampão salina fostato (PBS) e 30 min após, o cérebro foi dissecado, colocado em eppendorf, adicionado 1 mL de PBS-Tween (0.1% (v/v) no primeiro ciclo e 0.5% (v/v) nos outros) e centrifugado a 5000 rpm por 1 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o processo de lavagem foi repetido por 10 vezes para eliminar os fagos não ligados. Os fagos ligados ao cérebro foram eluídos com 50 mM glicina, pH 2.0. O eluato foi neutralizado em tampão Tris 1 M (pH 9.1) e amplificado em *Escherichia coli* ER2738 em 20 mL de LB e a seleção foi repetida mais três vezes. Em cada seleção, o eluato e o amplificado foram titulados. Após o quarto ciclo de seleção, fagos foram escolhidos aleatoriamente para sequenciamento em MegaBace™ 1000 (Molecular Dynamics/Amersham).

O programa *DNA PRO* (<http://relic.bio.anl.gov/>) foi utilizado para traduzir as seqüências. Análise de similaridade dos heptapeptídeos com proteínas de insetos foi feita o banco BLAST *search for short, nearly exact matches* (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Imunohistoquímica

Os cérebros de operárias campeiras foram dissecados e fixados em solução de periodato-lisina-paraformaldeído contendo paraformaldeído 4% por 1 hora, desidratados e incluídos em parafina. Cortes de 5 μm foram submetidos à recuperação antigênica com tampão citrato de sódio 10mM pH 6.0 em panela à vapor por 30 minutos, bloqueados com leite desnatado 5% e soro normal de cabra (1:6) por 4 horas e incubados com 1×10^9 fagos/ μL *overnight*. Após lavagem do tecido com tampão A (20 mM fosfato de sódio, pH 7.4 contendo 0.4 M NaCl e Triton X-100 0.3%), as secções foram incubadas com anticorpo anti-M13 conjugado com peroxidase (BioLabs) por 1 hora. Em seguida, foram lavadas com tampão A e a revelação da peroxidase feita utilizando-se 3, 3'-Diaminobenzidina pelo kit DAB (Vector), segundo o protocolo do fabricante. Todos os procedimentos foram feitos em câmara úmida e à temperatura ambiente. Os cortes receberam contra-coloração com Hematoxilina Harris e, posteriormente, foram desidratados e montados com Permout (Fischer Scientific) e lamínula. Outros cortes foram submetidos à coloração com Hematoxilina e Eosina para base morfológica.

Dot-Blotting de Proteínas

Operárias de *M. scutellaris* nas fases de: pupa de olho branco (POB), pupa de olho rosa (POR), pupa de olho marro (POM), pupa de olho preto (POP), pupa de olho preto com corpo pigmentado (POPp), recém-nascida (RN) e campeira (Camp) foram utilizadas nesse experimento. Após dissecação, cérebros foram macerados em tampão de extração de proteína (20mM Tris-HCl pH 7,2; 10mM EDTA, 2mM EGTA, 250mM sacarose, 1mM DTT, 1mM benzamidina), centrifugado por 10000 g por 15 min e o sobrenadante coletado, em seguida foi feita quantificação de proteína pelo método de Bradford. Em membranas de nitrocelulose Hybond (Amersham Bioscience), foram adicionados 12 μg (2 μl) de proteína do cérebro de *M. scutellaris*. Após secagem das proteínas, a membrana foi bloqueada com leite desnatado 5% diluído TBS-T 0.5% por 1 hora. Em seguida, o bloqueio foi trocado e adicionados 100 μL de sobrenadante de uma cultura de fago amplificados *overnight* e foi incubado por 2 horas. Posteriormente, a membrana foi incubada com anti-M13 (Biolabs) conjugado com peroxidase diluído 1:5000 em solução bloqueio, por 1 hora. Após ligação do anticorpo anti-

M13, a membrana foi lavada 10 vezes com TBS-T 0.5% e revelada com Sigma Fast 3,3'-Diaminobenzidine tablets sets (Sigma). A revelação foi interrompida com lavagens da membrana em água destilada. Todos os processos de incubação foram processados à temperatura ambiente.

Eletroforese e Atividade esterásica

Os testes enzimáticos foram realizados por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes, de acordo com o método de Laemmli (1970), utilizando-se gel de separação a 12% e de empilhamento a 5%, preparados em tampão Tris-HCl 0,375M, pH 8,8. Foram aplicados 100µg de proteína total por amostra. A eletroforese foi conduzida a uma amperagem constante de 40 mA, em tampão de corrida Tris (0,087M) - Glicina (0,013M) pH 8,3, por 3 horas em câmara fria (4 °C).

Após a separação eletroforética, a identificação das esterases foi realizada de acordo com o método de Lapenta *et al.* (1998). Os géis foram pré-incubados em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,5 por cerca de 45 minutos a 37° C e, em seguida, submetidos à coloração com α e/ou β naftil acetato, como substratos sintéticos. As atividades α e β esterases foram visualizadas nos géis como bandas de coloração preta e vermelha, indicando a hidrólise preferencial do α ou do β -naftil acetato, respectivamente. A reação de coloração foi realizada no escuro, a 37° C por 1 hora, em uma solução contendo 30 mg de α e/ou de β naftil acetato, previamente diluídos em 1mL de acetona e combinados com uma solução recém-preparada e filtrada de 85 mg de Fast Blue R/R Salt em 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M , pH 6,5. As bandas com atividade esterásica foram numeradas a partir da extremidade anódica do gel.

Resultados e Discussão

Bibliotecas de peptídeos apresentadas na superfície de fagos M-13 foram utilizadas para seleção *in vivo* de peptídeos ligantes ao cérebro de operária de *Melipona scutellaris*. Foram usados dois tipos de biblioteca de peptídeos, uma de heptapeptídeos linear e outra de heptapeptídeos conformacional (constrita). A figura 1 mostra o esquema da seleção de fagos ligantes ao cérebro.

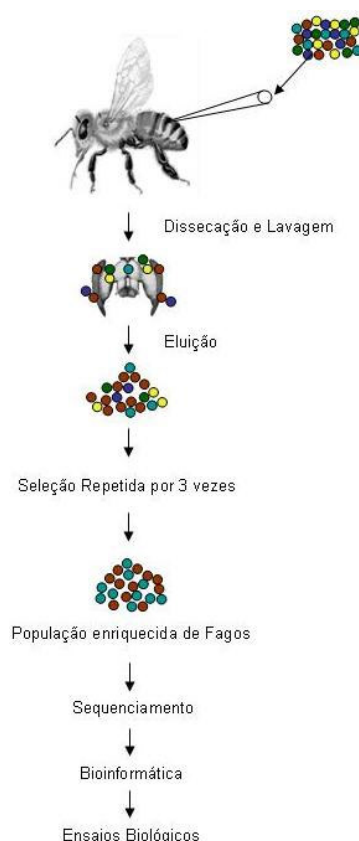


Figura 1: Esquema da seleção de fagos ligantes ao cérebro de *M. scutellaris*.

No primeiro ciclo foi utilizado PBS-Tween 20 (PBS-T) 0.1% (v/v), para lavagens de fagos não ligados ao cérebro e nos demais, a concentração de Tween 20 foi aumentada para 0.5%, elevando a estricção do processo para garantir a seleção de fagos altamente específicos. Os fagos ligados ao cérebro foram recuperados mudando o pH do meio para 2.2, o que provoca uma mudança na estrutura de proteínas e, conseqüentemente, um rompimento da interação

peptídeo-proteína. No final de cada ciclo o eluato (fagos ligados ao cérebro) e o amplificado foram titulados (Tabela 1).

Após o quarto ciclo foram escolhidos clones aleatórios para sequenciamento. A análise de bioinformática apresenta seqüências dos peptídeos dos fagos selecionados, o match com outras proteínas de insetos, a similaridade, o nome da proteína que foi similar e a provável função (Tabela 2). Todos os peptídeos anotados nesse trabalho tiveram similaridade com proteínas expressas em cérebro de insetos.

Tabela 1: Títulos de eluato e amplificado de cada ciclo.

| Ciclo | Eluato | Amplificado |
|-------|-------------------|----------------------|
| 1° | $4,6 \times 10^2$ | $2,4 \times 10^{10}$ |
| 2° | $7,0 \times 10^2$ | $4,0 \times 10^{11}$ |
| 3° | $4,9 \times 10^3$ | $3,5 \times 10^{10}$ |
| 4° | $4,2 \times 10^5$ | |

Entre os clones seqüenciados não foi encontrado nenhum representante da biblioteca constrita. Uma possível explicação é que esse tipo de biblioteca é construída colocando o inserto entre dois códons para cisteínas. Os resíduos de cisteínas por fazerem ponte dissulfeto promovem formação de *loop* nos peptídeos, conformação que pode dificultar a interação entre os peptídeos do fago e as proteínas do cérebro de *M. scutellaris*.

Após análises de bioinformática, alguns clones foram escolhidos para, por meio de imunohistoquímica, o mapeamento da região de ligação ao cérebro de *M. scutellaris*. Alguns clones ligaram-se em todas as regiões do cérebro, E04 (similar ao transportador de glutamato), F08 (similar ao domínio CUB) e G07 (similar ao receptor gustatório) e outros clones tiveram especificidade para determinadas regiões do cérebro, como os clones G02 (similar ao transportador de glutamato) presente somente no lobo óptico, A10 (similar ao receptor de lipoproteína de baixa densidade) que reconhece ligantes na região do corpo de cogumelo e o clone E10 (similar ao precursor de apolipoproteína) reativo às regiões do lobo óptico e lobo antenal do cérebro (Figura 2).

Tabela 2: Análise de Bioinformática dos peptídeos selecionados por Phage Display *in vivo* em *M. scutellaris*. A seqüência de aminoácidos de vermelho, em *Match*, não são similares a seqüências de peptídeos do fago.

| Clone | Peptídeos | Match | Similaridade | Nome | Função Anotada |
|-------|-----------|-------------|--|--|--|
| A03 | VPHVNTP | VPTAKIHVNTP | similar to CG33288-PB [Drosophila melanogaster] | Alpha-tubulin suppressor and related RCC1 domain-containing proteins | Cell division and chromosome partitioning / Cytoskeleton |
| A04 | KAPELLP | KAPELL | similar to ENSANGP00000009147 (Apis mellifera) | Extracellular ligand-binding receptor GPCR, family 3, metabotropic glutamate receptor-like | Extracellular ligand-binding receptor. |
| A05 | IVHRPIN | HRPIN | ENSANGP00000024607 [Anopheles gambiae str. PEST] | Cation channel, non-ligand gated | Cation channels are transport proteins responsible for the movement of cations through the membrane. |
| A07 | THMSNSN | HMSNS | RE69316p [Drosophila melanogaster] | axon growth cone guidance | Migration of an axon growth cone is directed to a specific target site. |
| A10 | TVFPPTS | TVFPP | similar to ENSANGP00000012534 [Apis mellifera] | Low-density lipoprotein receptor | Low-density lipoprotein receptor |
| A11 | STLYTTK | STAYTTK | similar to ENSANGP00000014070 [Apis mellifera] | Preprotein translocase subunit YidC | Intracellular trafficking and secretion |
| B01 | WSNTTAT | WNNTTA | similar to ENSANGP00000005994 [Apis mellifera] | Activin type II receptor | Involved in transmembrane signalling, |
| B03 | AGALHQF | ALHQF | ENSANGP00000017995 [Anopheles gambiae str. PEST] | ATP/GTP-binding site motif A (P-loop) | ATP binding |
| B05 | AVPDWSL | VPDWSL | ENSANGP00000007163 [Anopheles gambiae str. PEST] | Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase, catalytic | Production of the secondary messenger inositol-1,4,5,-trisphosphate. |

| | | | | | |
|-----|---------|----------|---|---|---|
| B09 | HPPQYQN | PPEYQN | ENSANGP00000022705 [Anopheles gambiae str. PEST] | Na+/K+ ATPase, beta subunit | sodium:potassium-exchanging ATPase activity |
| B11 | KHWSPMS | HWTPM | similar to Neuroglian precursor [Apis mellifera] | similar to Neuroglian precursor [Apis mellifera] | members are components of neural cell adhesion molecules |
| B12 | TQLVTAK | TQLVT | Q8IMQ6 [Drosophila melanogaster] | Putative gustatory receptor 97a | |
| B10 | QPPYPLR | QPPYP | ENSANGP00000013354 [Anopheles gambiae str. PEST] | Fibronectin, type III | Fibronectins are glycoproteins found in an insoluble form in loose connective tissue and basement membranes |
| C02 | QLRLMNH | QIRLMDH | similar to ENSANGP00000009655 [Apis mellifera] | Ca2+-dependent lipid-binding protein | |
| C03 | TFLAIKP | TFLAI | ENSANGP00000019225 [Anopheles gambiae str. PEST] | Olfactory receptor, Drosophila | olfactory receptor activity. |
| C04 | HVPWHTA | HVPWQ | AAB96654 [Heliothis virescens] | juvenile hormone esterase | Degradação Hormônio Juvenil |
| C05 | QPYPQPR | QPYPQP | RH66362p [Drosophila melanogaster] | N-methyl-D-aspartate selective glutamate receptor | ionotropic glutamate receptor activity. |
| C06 | QWPKSYF | QWPKSQ | ENSANGP00000013018 [Anopheles gambiae str. PEST] | ABC transporter, transmembrane region | ATP binding, ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances |
| C07 | FLPVSSL | FLT VSSL | ENSANGP00000012634 [Anopheles gambiae str. PEST] | Sodium/calcium exchanger membrane region | Sodium/calcium exchangers regulate intracellular Ca2+ concentrations. |
| C11 | TYIQFPP | YIQFP | CG32853-PA [Drosophila melanogaster] | Probable G-protein coupled receptor Mth-like 12 | |
| C12 | IPTHPSG | IPTQPS | ENSANGP00000004338 [Anopheles gambiae str. PEST] | Pleckstrin homology-type | The PI domain has a similar structure to the insulin receptor substrate-1 PTB domain. |
| D02 | YLAPRS | YLAPR | ENSANGP00000019858 [Anopheles gambiae str. PEST] | Pleckstrin-like | Proteins involved in intracellular signaling or as constituents of the cytoskeleton |

| | | | | | |
|-----|---------|-----------|---|---|---|
| D03 | FIPTHHA | FIPTLH | ENSANGP00000016875 [Anopheles gambiae str. PEST] | Laminin-type EGF-like | Components of basement membranes that mediate cell adhesion, growth migration, and differentiation. |
| D04 | YPMTLWG | PMTLW | ENSANGP00000017849 [Anopheles gambiae str. PEST] | Laminin-type EGF-like | Components of basement membranes that mediate cell adhesion, growth migration, and differentiation. |
| D05 | APRDPK | APREPAK | CG7173-PA [Drosophila melanogaster] | Proteinase inhibitor II, Kazal | Peptide proteinase inhibitors |
| D06 | FDAHHLT | FDAHH | XP_394311 [Apis mellifera] | similar to insulin-like peptide receptor; ILP-R [Apis mellifera]. | |
| D09 | KALPLGP | KLPLGP | ENSANGP00000022987 [Anopheles gambiae str. PEST] | K+ channel, pore region | Each type of K+ channel is activated by different signals and conditions depending on their type of regulation. |
| D10 | ALTPTR | TTPTR | ENSANGP0000004655 [Anopheles gambiae str. PEST] | Opioid growth factor receptor repeat | Act as growth factors in neural and non-neural cells and tissues, in addition to serving for neurotransmission/neuromodulation in the nervous system. |
| D12 | IHHNLPM | HNLPM | ENSANGP00000013459 [Anopheles gambiae str. PEST] | Speract/scavenger receptor | A membrane glycoprotein implicated in the pathologic deposition of cholesterol in arterial walls during arterogenesis), an enteropeptidase and T-cell surface glycoprotein CD5 (may act as a receptor in regulating T-cell proliferation) |
| E01 | SSMYPQW | SSMFPDW | ENSANGP00000020874 [Anopheles gambiae str. PEST] | Rhodopsin-like GPCR superfamily | Protein family that includes hormone, neurotransmitter and light receptors. |
| E04 | NHWLSPL | NHWLSPL | AAB84380 [Trichoplusia ni] | high-affinity Na+-dependent glutamate transporter | |
| E06 | VHPMPIS | VVPMPIS | CG8743-PA [Drosophila melanogaster] | calcium channel | calcium ion transport |
| E07 | MDTFPDP | MDTIPD | ENSANGP00000015009 [Anopheles gambiae str. PEST] | Leucine-rich repeat | Proteins with diverse functions, such as hormone – receptor interactions, enzyme inhibition, cell adhesion and cellular trafficking |
| E08 | SLAQTRL | SLAAVQTRL | CG4168-PA [Drosophila melanogaster] | transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity | transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway, transmission of nerve impulse |
| E10 | RPNINFD | PKINFD | T18358 Manduca sexta (tobacco hornworm) | apolipoprotein precursor protein | |
| E11 | HDTPTP | HETTPSP | GH09355p [Drosophila melanogaster] | chitin binding | Interacting selectively with chitin, a linear polysaccharide consisting of P-1,4-linked N-acetyl-D-glucosamine residues |

| | | | | | |
|-----|---------|---------|--|---|--|
| E12 | QNSNSPP | QNSNSPP | CG5166-PA, isoform A [Drosophila melanogaster] | Ataxin-2 | The sequential, electrochemical polarization and depolarisation that travels across the membrane of a nerve cell (neuron) in response to stimulation |
| F01 | EGQWWLA | QGDWWLA | similar to ENSANGP0000005994 [Apis mellifera] | SH3 | SH3 (Src Homology-3) domains are small protein modules . They are found in a great variety of intracellular or membrane-associated proteins |
| F02 | YSLSGSG | YSLSGTG | CG6977-PA [Drosophila melanogaster] | Cadherin | Cadherins are calcium dependent cell adhesion proteins |
| F03 | SSLYLSM | SSLYLS | ENSANGP0000010177 [Anopheles gambiae str. PEST] | ABC transporter related | Responsible for the controlled efflux and influx of substances (allocrites) across cellular membranes |
| F04 | NINHVTY | NHVTY | CAD27762 [Anopheles gambiae] | Cadherin | putative cell-adhesion protein |
| F06 | SVLQPSI | SVLLPMK | XM_393130 [Apis mellifera] | Apis mellifera similar to allatostatin neuropeptide precursor | Group of insect neuropeptides that inhibit juvenile hormone biosynthesis. |
| F07 | AWSSQLS | WSSQL | CG11895-PA [Drosophila melanogaster] | Protocadherin-like wing polarity protein stan | Involved in the fz signaling pathway that controls wing tissue polarity. Also mediates homophilic cell adhesion. |
| F08 | SLIADRK | SLVADR | ENSANGP0000006827 [Anopheles gambiae str. PEST] | CUB | The CUB domain is an extracellular domain which is found in functionally diverse, mostly developmentally regulated proteins and in peptidases belonging to MEROPS peptidase families M12A (astacin) and S1A (chymotrypsin) |
| F10 | ITRDYSN | VTRDYNN | similar to ENSANGP00000021248 [Apis mellifera] | Aminopeptidase N [Amino acid transport and metabolism] | The members differ widely in specificity, hydrolysing acidic, basic or neutral N-terminal residues. This family includes leukotriene-A4 hydrolase. |
| G02 | QQTNYLH | QQTNYLH | similar to ENSANGP00000010049 [Apis mellifera] | PRA1 family protein | This family includes the PRA1 (Prenylated rab acceptor) protein. This family also includes the glutamate transporter EAAC1 interacting protein GTRAP3-18 |
| G06 | AWMGVRP | WMGVR | AAP49026 [Vanessa cardui] Lepidoptera | blue-sensitive opsin | photoreceptor |
| G07 | TNSMPLT | SMPLT | ENSANGP00000023859 [Anopheles gambiae str. PEST] | gustatory receptor | |
| G08 | STARISW | STPRISW | XP_397471 [Apis mellifera] | similar to lachesin | Cell adhesion molecule (cam). Immunoglobulin-like domains may be involved in protein-protein and protein-ligand interactions. |

| | | | | | |
|-----|----------|---------|---|--------------------------------|--|
| G09 | STTSLYF | TSLYF | CG3182-PB, isoform B [Drosophila melanogaster] | potassium channel | |
| G10 | STLLPSI | STLLPDI | ENSANGP0000001414 [Anopheles gambiae str. PEST] | CD36 antigen | CD36 is a scavenger receptor for oxidized LDL and shed photoreceptor outer segments and in recognition and phagocytosis of apoptotic cells and is the cell adhesion molecule in platelet adhesion and aggregation, platelet-monocyte and platelet-tumor cell interaction |
| G11 | MNHAYQ | MNHH | ENSANGP00000017535 [Anopheles gambiae str. PEST] | Olfactory receptor, Drosophila | Candidate odorant receptors in Drosophila. |
| H04 | SQILAGG | SQILAGG | ENSANGP00000013427 [Anopheles gambiae str. PEST] | K+ channel, pore region | |
| H05 | GPLLTPPE | PLLTPPE | ENSANGP00000019227 [Anopheles gambiae str. PEST] | Esterase/lipase/thioesterase | This profile covers the active site serine of a wide variety of enzymes including esterases, lipases, peptidases etc. |

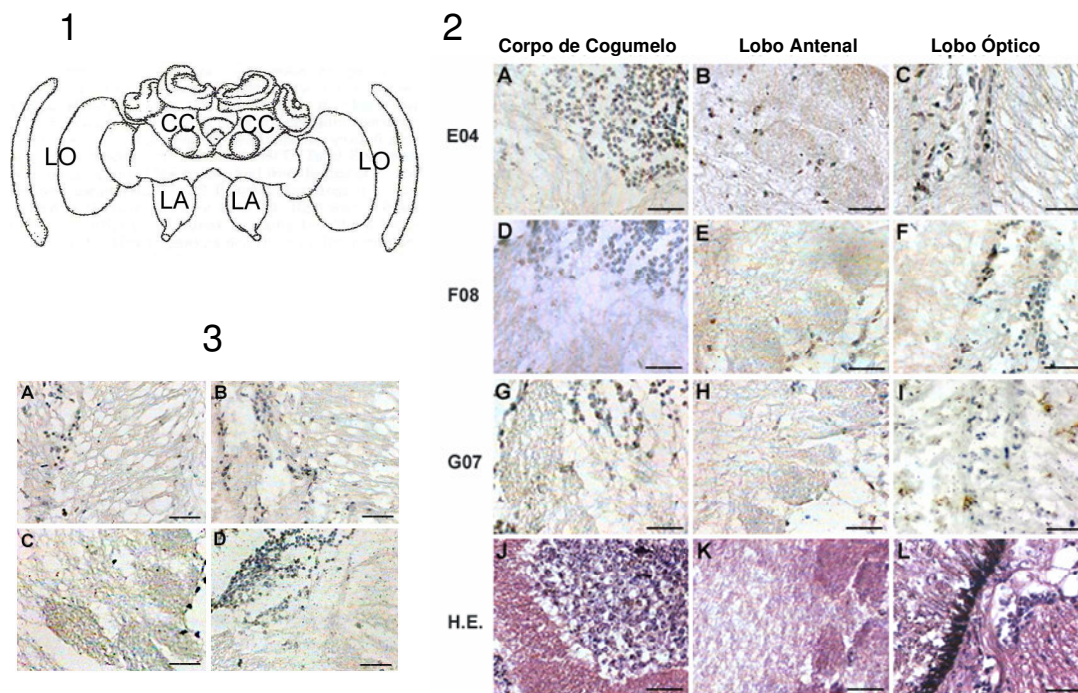


Figura 2: Mapeamento da região de ligação de alguns fagos ao cérebro de *M. scutellaris* por imunohistoquímica. **1** – esquema do cérebro de abelha, CC: corpo de cogumelo; LA, lobo antenal; LO: lobo óptico. **2** – Fagos que marcaram todo o cérebro: **A-C**: E04 – transportador de glutamato; **D-F**: F08 – domínio CUB; **G-I**: G07 – receptor gustatório; **J-L**: hematoxilina-eosina (HE). Bar: 40µm. **3** – Fagos que marcaram regiões específicas, **A** (LO) e **C** (CA): E10 – lipoforina; **B** (LO): G02 – transportador de glutamato; **D** (CC): A10 – receptor de lipoproteína. Bar: 40µm.

A análise da expressão dos ligantes proteicos, por *dot-blotting*, durante o desenvolvimento de pupa e adultos (recém-nascido e campeira) mostrou expressão diferencial dos ligantes de todos fagos testados. Os clones G02, E04 e E10 marcaram somente adultos, os recém-nascidos com fraca marcação e as campeiras com forte marcação. Enquanto que os clones G07, A04, A10 e F08 reconheceram todas as fases analisadas, porém, campeira teve marcação mais forte que os demais estágios. Esses dados refletem a expressão da proteína presente no cérebro, a qual os peptídeos interagem e não a expressão dos peptídeos (Figura 3).

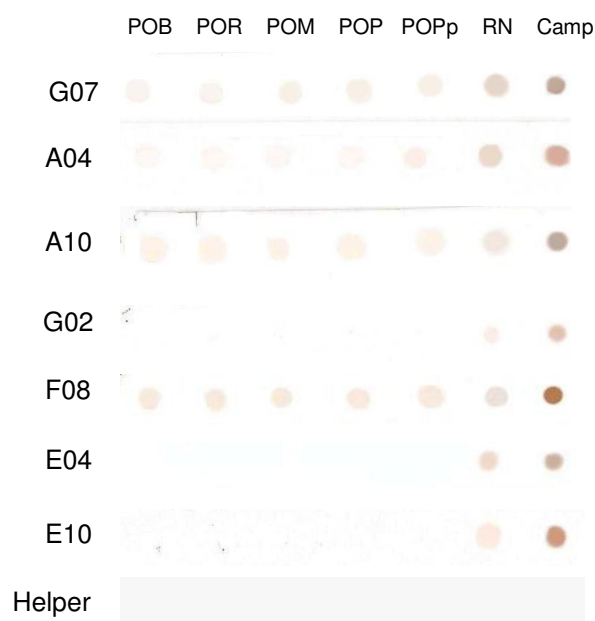


Figura 3: Análises por dot-blotting da expressão da proteína no cérebro de *M. scutellaris* ligante ao peptídeo. POB: pupa de olho branco; POR: pupa de olho rosa; POM: pupa de olho marrom; POP: pupa de olho preto; POPp: pupa de olho preto corpo pigmentado; RN: recém-nascido; Camp: campeira.

Esse trabalho foi pioneiro em utilizar a técnica de Phage Display para identificar moléculas ligantes no cérebro de um inseto eusocial, como é o caso da abelha sem ferrão *M. scutellaris*. As análises dos heptapeptídeos mostraram similaridade com receptores iônicos, canal iônico, moléculas guias, moléculas de adesão, enzimas, neuropeptídeos e proteínas de transportes. Alguns heptapeptídeos tiveram similaridade com moléculas de adesão como fibronectina, laminina (Schöck e Perrimon, 2003), caderina (Hill *et al.*, 2001) e neuroglina, uma molécula de adesão neural (Forni *et al.*, 2004). As moléculas de adesão estão envolvidas em múltiplos eventos morfogênicos no desenvolvimento de insetos, bem como no modelamento do sistema nervoso central, estabilidade na formação de tecidos e sinalização intercelular (Hill *et al.*, 2001; Schöck e Perrimon, 2003). O clone F08 é similar ao domínio extracelular CUB presente em proteínas relacionadas com desenvolvimento. Esse clone teve similaridade com o gene de *Anopheles gambiae* ENSANG00000006827, que contém além do domínio CUB, um domínio EGF Lam (laminin-type epidermal growth factor-like domain). Esse gene é ortólogo ao CG7466 (*Drosophila melanogaster*). A análise no banco de dados Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu>) mostrou que esse gene atende

aos processos biológicos: adesão celular, comunicação celular, resposta defensiva, desenvolvimento do ectoderma e neurogênese. Anholt e Machay (1991) referem-se ao gene CG7466 como uma proteína de adesão celular.

O clone A10 foi similar ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (receptor LDL), e seu ligante imunolocalizado no corpo de cogumelo, região do cérebro responsável pela aprendizagem e memória (Fahrbach *et al.*, 1998). Provavelmente, devido à atividade neuronal, ocorreu expressão do ligante desse clone em todas as fases do desenvolvimento, com maior expressão em campeiras em função do status de forrageamento (Figura 3). Apesar de ser um receptor de LDL, tem a capacidade de mediar a endocitose de lipoforinas (Dantuma *et al.*, 1999) que são proteínas multiméricas, tipo HDL, da hemolinfa e transportam gorduras, feromônios, HJ e lipídeos cuticulares para seu sítio de utilização (Soulages e Wells, 1994). O repertório comportamental pode ser, também, regulado por feromônios. (Grozinger *et al.*, 2003). O ligante do clone similar a lipoforina está presente em regiões de processamento sensorial, lobos óptico e antenal (Figura 2, 2A e C), e ainda com maior expressão em campeira (Figura 3), sugerindo que o ligante no cérebro esteja relacionado à sinalização por meio de feromônio em adultos.

As comunicações intercelulares e sensoriais de animais são mediadas por receptores transmembrânicos acoplados a proteína G (GPCRs) e seus ligantes. GPCRs são ativados por uma variedade de ligantes, luz, ions, neurotransmissores, odor e hormônio (Mitra *et al.*, 2004). O glutamato funciona como agonista do receptor N-methyl-D-Aspartate (NMDA) e está envolvido na aprendizagem e memória nos animais (Milner *et al.*, 1998). Recentes descobertas demonstraram que a transmissão glutamatérgica é parte integral na memória de *Apis mellifera* (Si *et al.*, 2004). Liu *et al.* (2005) descobriram um receptor ionotrópico de glutamato (GluCl) em *Diploptera puctata*, onde verificaram que a ativação dos canais GluCl das glândulas *corpora allata* induz a uma hiperpolarização das células, devido ao influxo de íons cloreto e diminui a biossíntese de HJ.

Funada *et al.* (2004) clonaram dois receptores metabotrópicos de glutamato no cérebro de *Apis* e verificaram que o receptor AmGluRB está expresso somente no cérebro, enquanto o receptor AmGluRA expressa-se no

cérebro, abdome e tórax, sugerindo que esse último esteja presente em terminais pré-sinápticos de junções neuromusculares de abelhas. Esses autores analisaram, também, o perfil de expressão desses receptores em diferentes idades de operárias adultas, verificando que não existe diferença na expressão. Em *M. scutellaris* foram encontrados dois clones com similaridade ao receptor NMDA (receptor de glutamato). O clone A04 teve similaridade com *Apis mellifera* e a proteína ligante ao peptídeo (fago) apresentou expressão durante todo o desenvolvimento de pupa de operária, com aumento gradual na expressão desde recém-nascido até campeira de *M. scutellaris* (Figura 3), diferente do resultado encontrado por Funada *et al.* (2004). Essa diferença pode decorrer de diferentes genes em *Apis* e *Melipona*, visto que a família de genes para receptores de glutamato não está totalmente caracterizada, ou ainda, o perfil de expressão desses genes em *Melipona*, pode ser diferente do de *Apis*.

Foram encontrados, também, dois clones similares a transportadores de glutamato, que são responsáveis pela liberação e re-captção do glutamato na fenda sináptica e estão presentes nos terminais pré- e pós-sinápticos, sendo dependentes de sódio e tendo ação distinta do receptor de glutamato (Veenberg, 1998). Kucharski *et al.* (2000) clonaram um gene do transportador de glutamato de *A. mellifera* e o perfil de expressão desse gene sugere que o glutamato é um importante neurotransmissor no cérebro de abelhas, principalmente nos lobos ópticos e nos corpos de cogumelo. Os resultados de imunohistoquímica em *M. scutellaris* corroboram esses dados encontrados. O fato do clone E04 ter marcado todas as regiões do cérebro (Figura 2, 2A, B e C) e o clone G02 somente o lobo óptico (Figura 2, 3B), e ainda, que campeiras apresentaram maior expressão do ligante (Figura 3), sugere que o glutamato tem importante papel na aprendizagem de campeiras de *Melipona*.

Todos os organismos especializados têm mecanismos para reconhecer e responder às informações quimiossensoriais do ambiente. Os neurônios olfatórios reconhecem substâncias voláteis servindo de recurso, habilitando o organismo para detectar alimento, predadores e no acasalamento. Em contrastes, neurônios gustatórios reconhecem substâncias químicas solúveis, habilitando o comportamento de alimentação. Em insetos, neurônios tácteis também são responsáveis pela iniciação sexual e respostas reprodutivas (Scott *et al.*, 2001).

Em *M. scutellaris* a imunolocalização do clone G07, similar a receptor gustatório, mostrou a expressão do ligante em todo o cérebro (Figura 2; 2G, H e I) e de acordo com o *dot-blotting*, o ligante é expresso em todos os estágios do desenvolvimento (Figura 3).

Alguns clones tiveram similaridade com canais iônicos (canal de K⁺, Ca²⁺ e Na⁺) e proteínas transportadoras (*ABC transport*). Os canais iônicos têm importante papel na regulação da excitabilidade, atividade rítmica e função sináptica (Gisselmann *et al.*, 2004). Tsuchimoto *et al.* (2004) encontraram genes categorizados como transportadores de neurotransmissores e canais iônicos que são altamente expressos em campeira quando comparado com abelhas recém-nascidas em *Apis*. O sistema de transporte ABC (ATP Binding Cassete) compreende uma classe de proteínas transportadoras de membrana que utiliza a energia da hidrólise do ATP para translocar solutos em membranas biológicas, além de estarem envolvidas em processos de transdução de sinal, secreção de proteínas, resistência a antibióticos e drogas, apresentação de antígeno, patogênese bacteriana e esporulação (para revisão Schneider e Hunke, 1998). Classes de proteínas transportadoras e de canais iônicos são importantes para as funções desempenhadas pela campeira e, também, para os processos de metamorfose em abelhas.

Dois heptapeptídeos, em particular, chamaram atenção nesse trabalho, um similar ao neuropeptídeo alatostatina e outro à enzima Esterase do Hormônio Juvenil (EHJ). Alatostatina é uma família de neuropeptídeos que inibem a biossíntese do Hormônio Juvenil (Woodhead *et al.*, 1989; Reichwald *et al.*, 1994) e a EHJ é uma enzima, produzida no corpo gorduroso e secretada na hemolinfa, que participa da via de degradação do HJ, convertendo-o em HJ ácido (Hilton e Hammock, 2001).

O Hormônio Juvenil (HJ) pertence a um grupo de sesquiterpenoides acíclicos que regulam muitos aspectos da fisiologia de insetos como desenvolvimento, reprodução, diapausa, polietismo e determinação de casta (Riddiford, 1996; Hartfelder e Engels, 1998; Bonetti *et al.*, 1995; Robinson, 1987). A atividade biossintética dos *corpora allata* (CA) é, geralmente, considerada o principal fator de regulação dos títulos de HJ (Tobe e Stay, 1985). Em função disso, não esperávamos encontrar um clone similar a EHJ (C04), visto que essa é

uma enzima circulante na hemolinfa (Hirai *et al*, 2002). A presença do clone C04 ancorado a alguma molécula no cérebro (panning *in vivo*) pode indicar a existência de um receptor para essa enzima ou alguma molécula ligante nesse órgão de *Melipona*, provavelmente, devido à necessidade de degradar o HJ circulante e impedir um super-estímulo provocado por este hormônio, ou ainda, para evitar feedback negativo, já que as glândulas CA localizam-se próximas ao cérebro. As análises de sequenciamento da biblioteca de cDNA de cérebro de *Apis mellifera* do Dr. Gene Robinson, da Universidade de Illinois (EUA), detectaram ESTs com similaridade a EHJ, indicando a expressão desse gene no cérebro dessa abelha (Whitfield *et al.*, 2002).

Para verificar se o peptídeo expresso pelo clone F06 (similar alatostatina) tem a capacidade de ativar os receptores de alatostatina no CA, injetamos fagos em operárias adultas e analisamos o perfil de esterases após uma hora e meia. Como controle negativo utilizamos fago Helper (linhagem selvagem, sem peptídeo) e abelhas sem injeção. Fagos com peptídeo ligantes ao HJ (Vieira, não publicado) foram usados como controle positivo. Nossa hipótese é que esses fagos ligam ao HJ circulante, impedem sua entrada na célula, bloqueando seu efeito hormonal na regulação gênica. O perfil esterásico mostrou que nos indivíduos tratados com o pool de fagos ligantes ao HJ, foram expressas as esterases EST-1, EST-2, EST-4, EST-6 e EST-7 com hidrólise do substrato α -naftil acetato. Hidrolizaram o β -naftil acetato, as EST-1, EST-3, EST-4 e EST-5 (Figura 4, A e B). As abelhas injetadas com o clone F06 tiveram resultado similar, expressando as mesmas esterase. As abelhas Controle (não injetadas) apresentaram, em gel, esterases contra α -naftil acetato: EST-2, EST-3, EST-4, EST-5, EST-6 e EST-7; enquanto que as EST-1, EST-2, EST-4 e EST-5 contra β -naftil acetato (Figura 4, A e B).

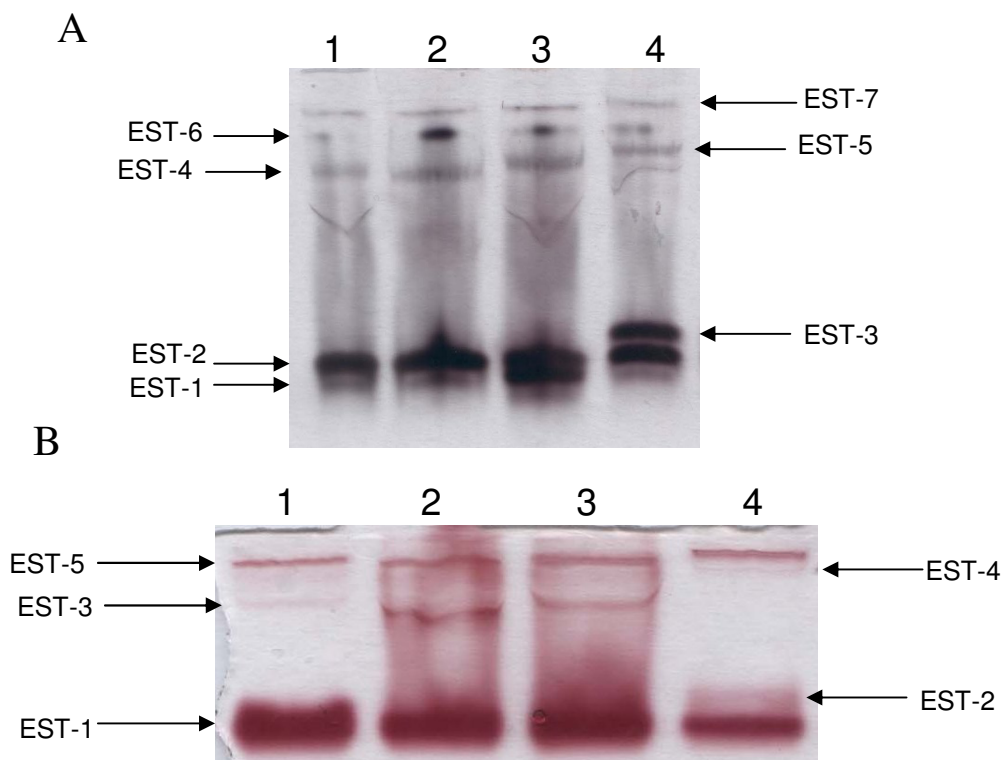


Figura 4: Perfil de esterases após inoculação de 2×10^{11} fagos: 1: fago Helper; 2: clone F06 (similar alatostatina); 3: pool de fagos ligantes ao HJ; 4: controle (abelha sem injeção). Figura A - coloração com α -acetato. Figura B - coloração com β -acetato.

As EST-3 e EST-5 (α naftil acetato) e a EST-2 (β -naftil acetato) ocorrem somente na amostra Controle, correspondendo ao produto de genes que são desligados pela presença de fagos com peptídeos fusionados a pIII ou não. Algum produto do fago tem influência sobre a expressão do gene das EST-3, EST-5 e EST-2 desligando-os. Esse produto deve estar relacionado ao mecanismo de defesa da abelha, que pode estar bloqueando a expressão desses genes pela entrada do fago. Outros testes *in vivo*, com acompanhamento do desenvolvimento da operária, seguidos da caracterização do gene dessas enzimas são necessários para testar essa hipótese.

O aumento da expressão da EST-6 (α -naftil acetato) e da EST-3 (β naftil acetato) são exclusivas das amostras que receberam tratamento com fagos com peptídeos fusionados à pIII. A expressão dessas esterases foi influenciada pela

presença dos peptídeos que ao se ligarem ao receptor de alostatina (amostra 2, Figura 4 A e B) diminuiu a biossíntese do HJ pelos CA, ou ao se ligarem ao HJ circulante (amostra 3, Figura 4 A e B) impedem sua entrada na célula, bloqueando a ação do HJ sobre a expressão gênica. A expressão dos genes da EST-6 e EST-3 devem ser suprimidas pela presença do HJ, com a diminuição de HJ circulante, esses genes são ligados.

Esse é um indício da funcionalidade dos peptídeos selecionados no *panning in vivo*. Serão feitos outros experimentos para verificar nossa hipótese com a dosagem de HJ após a injeção do clone similar a alostatina. Foi possível, ainda, observar a supressão de esterases após a aplicação dos fagos, até mesmo com o fago helper que não contém peptídeo.

Cinquenta e oito peptídeos foram identificados como ligantes ao cérebro de *Melipona scutellaris*, dos quais, somente três (KAPELLP, QLRLMNH e IHHNLPM) tiveram dois clones repetidos, o que reflete na diversidade de ligantes encontrados no cérebro dessa abelha. A técnica de phage display *in vivo* foi eficiente para a caracterização de peptídeos ligantes no cérebro de *Melipona*. A identificação das proteínas do cérebro de abelhas ligantes aos peptídeos poderá contribuir para estudos de neurobiologia e entendimento do complexo comportamento de abelhas.

Conclusão Geral

As investigações dos peptídeos ligantes ao cérebro e as análises do perfil de expressão das enzimas das vias de biossíntese e degradação do Hormônio Juvenil em *Melipona scutellaris* revelaram que:

- A expressão do gene da enzima *o*-metiltransferase do ácido farnesóico (MsFAMeT) tem relação com o processo de determinação de castas.
- O gene MsFAMeT apresenta um *splicing* alternativo para um micro-éxon de 27 nucleotídeos, com expressão e funções inseto, estágio e tecido-específicos e dependente de modificações pós-traducionais.
- O transcrito menor do gene MsFAMeT parece estar associado a via de biossíntese de Hormônio Juvenil, visto que sua expressão é menor em rainha e mostrou ser inibido pela aplicação tópica de HJ III.
- O transcrito maior da MsFAMeT aparentemente não funciona como conversor do ácido farnesóico para metilfarnesoato, mas apresentou expressão diferencial nas castas.
- A análise do perfil de expressão dos genes das enzimas Esterase do Hormônio Juvenil (EHJ) e Epóxide Hidrolase do Hormônio Juvenil (EHHJ) revelou que essas enzimas são expressas durante todo o desenvolvimento pós-embriônico de *M. scutellaris*.
- A aplicação tópica de HJ III em larvas provocou aumento na expressão dos genes EHJ e EHHJ dentro de um período de 4 h após o tratamento e injeção de ecdisona não teve influência na expressão desses genes.

- A análise do título de HJ por radioimunoensaio (RIA) mostrou que o estágio L3-3 é o mais favorável para detecção de larvas que se diferenciarão em rainhas.
- O aumento da expressão dos genes das enzimas EHJ e EHHJ teve correlação com agrupamento de indivíduos com baixos títulos de HJ, confirmando o papel dessas enzimas na degradação desse hormônio.
- Os genes que codificam para as enzimas EHJ e EHHJ se expressam durante os estágios de pupa, indicando a presença de HJ circulante nessas fases.
- A técnica de Phage Display foi eficiente para isolar peptídeos ligantes ao cérebro de *M. scutellaris*. Todos os peptídeos isolados tiveram similaridade com proteínas expressas no cérebro de insetos.
- Análises por *dot-blotting* revelaram peptídeos ligantes para proteínas com expressão somente em cérebro de operárias adultas (G02 e E04 e E10) e outros que se expressam durante os estágios de pupa e adulto (G07, A04, A10 e F08).
- A região de ligação do fago ao cérebro de *M. scutellaris* foi mapeada por imunohistoquímica que permitiu identificar peptídeos que se ligam em todo o cérebro (clones E04, F08 e G07) e outros que se ligam em regiões específicas, como o clone G02 no lobo óptico, A10 no corpo de cogumelo e o clone E10 que reconhece ligantes nas regiões do lobo óptico e lobo antenal do cérebro.
- O peptídeo F08 mostrou ser funcional, modificando o perfil de expressão de esterases após 1 hora e 30 minutos de injeção desse fago em operárias campeiras.

Referências Bibliográficas

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.

Andersen JF, Ceruso M, Unnithan GC, Kuwano E, Prestwich GD, Feyereisen R. 1995. Photoaffinity labeling of methyl farnesoate epoxidase in cockroach corpora allata. *Insect Biochem Molec Biol* 25 (6):713-719.

Anholt RRH, Mackay RFC. 2001. The genetic architecture of odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behavior Genetics* 31:14-27.

Audsley N, Weaver RJ, Edwards JP. 2000. Juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of larval tomato moth, *Lacanobia oleracea*, and regulation by *Manduca sexta* allatostatin an allatotropin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30:681-689.

Azevedo MO, Felipe MSS, Brígido MM, Maranhão AQ, De-Souza MT. 2003. *Técnicas básicas em biologia molecular*, Editora Universidade de Brasília, 212.

Barry MA, Dower WJ, Johnston SA. 1996. Toward cell-targeting gene therapy gene therapy vectors: selection of cells-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries. *Nat Med* 2:299-305.

Bede JC, Teal PEA, Goodman WG, Tobe SS. 2001. Biosynthetic pathway of insect juvenile hormone III in cell suspension cultures of the sedge *Cyperus iria*. *Plant Physiology* 127: 584-593.

Beethan JK, Grant D, Arand M, Garbafino J, Kiyosue T, Pinot F, Oesch F, Belknap WR, Shinozaki K, Hammock BD. 1995. Gene evolution of epoxide hydrolases and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* 14:61.

Bellés X, Martin D, Piulachs MD. 2005. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu Rev Entomol* 50:181-199.

Bellingham J, Wilkie SE, Morris AG, Bowmaker JK, Hunt DM. 1997. Characterization of the ultraviolet-sensitive opsin gene in the honeybee, *Apis mellifera*. *Eur J Biochem* 243: 775-781.

Benoist P, Mas JA, Marco R, Cervera M. 1998. Differential muscle-type expression of the *Drosophila* troponin T gene. A 3-base pair microexon is involved in visceral and adult hypodermic muscle specification. *J Biol Chem* 273:7538-7546.

Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali C, Paquet N, Ravier F, Sanchez JC, Frutiger S, Hochstrasser D. 1993. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14:1023-1031.

Blenau W, Balfanz S, Baumann A. 2000. *AmTyr1*: Characterization of gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor. *J. Neurochem* 74:900-908.

Blenau W, Erber J, Baumann A. 1998. Characterization of a dopamine D1 receptor from *Apis mellifera*: cloning, functional expression, pharmacology, and a mRNA localization in the brain. *J. Neurochem* 70 :15-23.

Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. 1999. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294:1351-1362.

Bonetti AM, Kerr WE, Matusita SH. 1995. Effects of Juvenile Hormones I, II and III, in single and fractionated dosagem in *Melipona* bees. *Rev Bras Biol* 55:113-120.

Bonetti AM, Landim CC, Kerr WE. 1994. Sex determination in bees. XXX. Effects of Juvenile Hormone in development of tergal glands in *Melipona*. *Journal of Apicultural Research* 33:11-14.

Bonetti AM. 1982. Ação do Hormônio Juvenil sobre a expressão gênica em *Melípona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação de Mestrado. FMRP-USP, Ribeirão Preto, São Paulo.

Bonetti AM. 1984. Efeitos do Hormônio Juvenil no desenvolvimento ovariano de *Melipona quadrifasciata*. *Revista Brasileira de Biologia* 44:509-518.

Bonetti AM. 1990. Genética da determinação de casta em *Melipona*. Ação do Hormônio Juvenil sobre Esterases e Corpora Allata durante desenvolvimento pós-embriônico. Tese de Doutorado. FMRP-USP, Ribeirão Preto, São Paulo.

Camargo JMF, Pedro SRM. 1992. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie* 23:1-32,

Campbell PM, Harcourt RL, Crone EJ, Claudianos C, Hammock BD, Russell RJ, Oakeshott JG. 2001. Identification of a juvenile hormone esterase gene by matching its peptide mass fingerprint with a sequence from the *Drosophila* genome project. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 513-520.

Chang BS, Ayers D, Smith WC, Pierce NE. 1996. Cloning of the gene encoding honeybee long-wavelength rhodopsin: a new class of insect visual pigments. *Gene* 173:215-219.

Chen L, Segal DM, Mash DC. 1999. Semi-quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction: an approach for the measurement of target gene expression in human brain. *Brain Research Protocols* 4:132-139,

Dantuma NP, Potters M, De Winther MPJ, Tensen CP, Kooiman FP, Bogerd J, Van de Horst DJ. 1999. An insect homolog of the vertebrate very low density lipoprotein receptor mediates endocytosis of lipophorin. *Journal of Lipid Research* 40:973-978.

Davey KG. 2000. The model of action of juvenile hormones: some questions we ought to ask. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30:663-669.

De Kort CAD, Granger NA. 1981. Regulation of Juvenile hormone titer. *Ann. Rev. Entomol* 26:1-28.

Ebendal T, Bengtsson H, Soderstrom S. 1988. Bone morphogenetic protein and their receptor: potential functions in the brain. *J Neurosci Res* 51:139-146.

Elekovich MM, Jez K, Ross AJ, Robinson GE. 2003. Larval juvenile hormone treatment affects pre-adult development, but not adult age at onset of foraging in worker honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*. 49: 359-366.

Fahrbach SE, Moore D, Capaldi EA, Farris SM, Robinson GE. 1988. Experience-expectant plasticity in the mushroom bodies of the honeybee. *Learn Mem* 5(1-2): 115-23.

Fahrbach SE, Robinson GE. 1996. Juvenile hormone, behavioral maturation, and brain structure in the honey bee. *Dev Neurosci* 18:102-114.

Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K, Bairoch A. 2002. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res* 30:235-238.

Fann M-Jr, Patterson PH. 1994. Neurotrophic cytokines and activin A differentially regulate the phenotype of cultured sympathetic. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:43-47.

Feng QL, Ladd TR, Tomkons BL, Sundaram M, Sohi SS, Retnakaran A, Davey KG, Palli SR. 1999. Spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) juvenile hormone

esterase: hormonal regulation, developmental expression and cDNA cloning. *Mol Cell Endocrinol* 148:95-108.

Forni JJ, Roman S, Doherty P, Tear G. 2004. Neuroglial and Fasciclin II can promote neurite outgrowth via the FGF receptor Heartless. *Mol Cell Neurosci* 26:282-291.

Funada M, Yasuo S, Yoshimura T, Ebihara S, Sasagawa H, Kitagawa Y, Kadowaki T. 2004. Characterization of the two distinct subtypes of metabotropic glutamate receptors from honeybee, *Apis mellifera*. *Neuroscience Letters* 359: 190-194.

Gallo A, Thomson E, Brindle J, O'Connell MA, Keegan LP. 2002. Micro-processing events in mRNAs identified by DHPLC analysis. *Nucleic Acids Res* 30:3945-3953.

Gilliand G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. 1990. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantification by competitive chain reaction. *Proceedings of Natural Academy of Science of the United States of America* 87:2725-2729,

Gisselmann G, Wetzel CH, Warnstedt M, Hatt H. 2004. Functional characterization of I_{h^-} channels splice variants from *Apis mellifera*. *FEBS Letters* 575:99-104.

Goodman WG, Coy DC, Baker FC, Xu L, Toong YC. 1990. Development and application of a radioimmunoassay for the juvenile hormones. *Insect Biochem* 20: 357-364.

Grozinger CM, Sharabash N, Whitfield CW, Robinson G. 2003. Pheromon-mediated gene expression in the honey bee brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14519-14525.

Hammock BD, Sparks TC. 1977. A rapid assay for insect juvenile hormone esterase activity. *Analyt Biochem* 82:573-579.

Hanzlik TN, Abdell-Aal YAI, Harshman LG, Hammock BD. 1989. Isolation and sequencing of cDNA clones coding for juvenile hormone esterase from *Heliothis virescens*: evidence for a catalytic mechanism for the serine carboxyl esterase J Biol Chem 264:12419-12425.

Hanzlik TN, Hammock BD. 1987. Characterization of affinity-purified juvenile hormone esterase from *Trichoplusia ni*. J Biol Chem 262:13584-13591.

Harris SV, Thompson DM, Linderman RJ, Tomalski MD, Roe RM. 1999. Cloning and expression of a novel juvenile hormone metabolizing epoxide hydrolase during larval-pupal metamorphosis of the cabbage looper *Trichoplusia ni*. Insect Mol Biol 8: 85-96.

Hartfelder K, Engels W. 1988. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honey bee. In: Pedersen, RA. E Schatten, G. P. (ed.). Current Topic in Developmental Biology 40:45-77.

Hartfelder K, Rembold H. 1991. Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. Comparative Physiology B 160:617-620.

Hertel H, Ventura DF. 1985. Spectral sensitivity of photoreceptors in the compound eye of stingless tropical bees. Journal of Insect Physiology 31:931-935.

Higgins CF. 1992. ABC transport: from microorganism to man. Annu. Rev Cell Biol 8:67-113.

Hill E, Broadbent ID, Chothia C, Pettitt J. 2001. Cadherin superfamily protein in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. J Mol Biol 305:1011-1024.

Hilton AV, Hammock BD. 2001. Purification of purification of juvenile hormone esterase and molecular cloning of the cDNA from *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32:57-66.

Hirai M, Kamimura M, Kikuchi K, Yasukochi Y, Kiuchi M, Shinoda T, Shiotsuki T. 2002. cDNA cloning and characterization of *Bombyx mori* juvenile hormone esterase: an inducible gene by the imidazole insect growth regulator KK-42. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32:627-635.

Hirashima A, Suetsugu E, Hirokado S, Kuwano E, Taniguchi E, Eto M. 1999. Effect of octopamine on the activity of juvenile-hormone esterase in the silkworm *Bombyx mori* and the red flour beetle *Tribolium freemani*. *General and Comparative Endocrinology* 116:373-381.

Holford KC, Edwards KA, Bendena WG, Tobe SS, Wang Z, Borst DW. 2004. Purification and characterization of a mandibular organ protein from the American lobster, *Homarus americanus*: a putative farnesoic acid O-methyltransferase. *Insect Biochem Mol Biol* 34:785-798.

Huang X, Madan A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9:868-877.

Kamita SG, Hinton AC, Wheelock CE, Wogulis MD, Wilson DK, Wolf NM, Hock B, Hammock BD. 2003. Juvenile hormone esterase: Why are you so JH specific? *Insect Biochem Mol Biol* 33:1261-1273.

Keiser KCL, Brandt KS, Silver GM, Wisniewski N. 2002. Cloning, partial purification and in vivo developmental profile of expression of the juvenile hormone epoxide hydrolase of *Ctenocephalides felis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 50:191-206.

Kerr WE. 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Anais ESALQ-USP* 5:181-276.

Kerr WE. 1967. The history of the introduction of african bee in Brazil S. Afr. Bee J 39:3-5.

Kerr WE. 1974. Sex determination in bees III. Caste determination in *Melipona* and genic control. Insects Sociaux 21:357-368.

Kerr WE, Akahira Y, Camargo CA. 1975. Sex determination in bees. IV. Gentic control of juvenile hormone production in *Melipona quadrifasciata* (Apidae). Genetics 54:859-866.

Kerr WE, Carvalho GA, Nascimento VA. 1996. Abelha urucu: biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte: Acangaú 144.

Kerr WE, Nielsen R. 1966. Evidences that genetically determined *Melipona* queens can become workers. Genetics 54:859-866.

Kerr WE, Vencovsky R. 1982. Melhoramento genético em abelhas. I. Efeito do números de colônias sobre o melhoramento. Braz J Genetics 5:279-285.

Kerr WE, Zucchi R, Nakadaira JT, Butolo JE. 1962. Reproduction in the social bees (Hymenoptera, Apidae). J N Y Ent Soc 70:265-276.

Khlebodarova TM, Gruntenko NE, Grenback LG, Sukhanova MZ, Mazurov MM, Rauschenbach IY, Tomas BA, Hammock BD. 1996. A comparative analysis of the juvenile hormone metabolizing enzymes in two species of *Drosophila* during development. Insect Biochem Mol Biol 26:829-835.

Kiefer C, Sumser E, Wernet MF, Linting JV. 2002. A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 96:10581-10586.

Kramer SJ, Weiten M, De Kort CAD. 1977. Metabolism of juvenile hormone in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. Insect Biochem 7:231-236.

Kucharski R, Ball EE, Hayward DC, Maleszka R. 2000. Molecular cloning and expression analysis of a cDNA encoding a glutamate transporter in the honeybee brain. *Gene* 242:399-405.

Lacourciere GM, Armstrong RN. 1994. Microsomal and soluble epoxide hydrolase are members of the same family of C-X bond hydrolase enzymes. *Chem Res Toxicol* 7:212.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lapenta AS, Bicudo HEMD, Ceron CR. 1998. Esterase patterns and phylogenetic relationships of species and strains included in the *Drosophila buzzatii* cluster. *Cytobios* 96(382):95-107.

Lassiter MT, Apperson CS, Roe RM. 1995. Juvenile hormone metabolism during the fourth stadium and pupal stage of the southern house mosquito *Culex quinquefasciatus* Say. *J Insect Physiol* 41(10):869-876.

Lau NC, Bartel D. 2003. Censores do genoma. *Scientific american* 16:50-57.

Lee KY, Chamberlin ME, Horodyski FM. Biological activity of *Manduca sexta* allatotropin-like peptides, predicted products of tissue-specific and developmentally regulated alternatively spliced mRNAs. *Peptides*, n. 649, p. 1-9, 2002.

Linderman RJ, Roe RM, Harris SV, Thompson DM. 2000. Inhibition of insect juvenile epoxide hydrolase: asymmetric synthesis and assay of glycidol-ester and epoxy-ester inhibitor of *Trichoplusia ni* epoxide hydrolase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30:767-774.

Liu HP, Lin SC, Lin CY, Yeb SR, Chiang AS. 2005. Glutamate-gated chloride channels inhibit juvenile hormone biosynthesis in the cockroach, *Diploptera punctata*. *Insect Biochem Mol Biol* 35:1260-1268.

Maleska R, Helliwell P, Kucharski R. 2000. Pharmacological interference with glutamate re-uptake impairs long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Behav Brain Res* 115:49-53.

McAllister L, Rehm EJ, Goodman GS, Zinn K. 1992. Alternative splicing of micro-exons creates multiple forms of the insect cell adhesion molecule fasciclin I. *J Neurosci* 12: 895-905.

McCutchen BF, Szekacs A, Huang TL, Shiotsuki T, Hammock BD. 1995. Characterization of a spectrophotometric assay for juvenile hormone esterase. *Insect Biochem Mol Biol* 25:119-126.

Menzel R, Blakers M. 1976. Colour receptors in the bee eye-morphology and spectral sensitivity. *J Comp Physiol* 11-33.

Menzel R, Muller U. 1996. Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Ann Rev Neurosci* 19:379-404.

Menzel R. 1999. Memory dynamics in the honeybee. *J Comp Physiol A* 185:323-340.

Michener CD. 1974. The social behaviour of the bees. A comparative study. Cambridge, Belknap press:404.

Milner B, Squire LR, Kandel ER. 1998. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20:445-68.

Mitra C, Parmentier ML, Pin JP, Bockaert J, Grau Y. 2004. Divergent evolution in metabotropic glutamate receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 279:9313-9320.

Mustard JA, Kurshan PT, Hamilton IS, Blenau W, Mercer AR. 2005. Development expression of tyramine receptor gene in the brain of the honey bee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol* 438:66-75.

Nunes FM, Valente V, Sousa JF, Cunha MA, Pinheiro DG, Maia RM, Araujo DD, Costa MC, Martins WK, Carvalho AF, Monesi N, Nascimento AM, Peixoto PM, Silva MF, Ramos RG, Reis LF, Dias-Neto E, Souza SJ, Simpson AJ, Zago MA, Soares AE, Bitondi MM, Espreafico EM, Espindola FS, Paco-Larson ML, Simoes ZL, Hartfelder K, Silva WA Jr. The use of Open Reading frame ESTs (ORESTES) for analysis of the honey bee transcriptome. *BMC Genomics* 5:84. (available online: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/5/84>).

Nussbaumer C, Hinton A, Schopf A, Stradner A, Hammock BD. 2000. Isolation and characterization of juvenile hormone esterase from hemolymph of *Lymantria dispar* by affinity- and by anion-exchanger chromatography. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30:307-314.

Page R, Erber J. 2002. Levels of behavioral organization and the evolution of division of labour. *Naturwissenschaften* 89:91-106.

Page RE, Robinson GE. 1991. The genetic of division labor in honey bee colonies. In: *Advances in Insect Physiology* Academic Press 23:117-169.

Pasqualini R, Ruoslahti E. 1996. Tissue targeting with phage peptide libraries. *Mol Psychiatry* 1:423.

Pinto LZ, Hartfelder K, Bitondi MMG, Simões ZLP. 2002. Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J Insect Physiol* 48:783-790.

Rachinsky A. 1994. Octopamine and serotonin influence on corpora allata activity in honey bee (*Apis mellifera*) larvae. J Insect Physiol 40(7):549-554.

Rachinsky A, Tobe SS, Feldlaufer MF. 2000. Terminal steps in JH biosynthesis in the honey bee (*Apis mellifera* L.): developmental changes in sensitivity to JH precursor and allatotropin. Insect Biochemistry and Molecular Biology 30:729-737.

Reichawald K, Unnithan GC, Davis NT, Agricola H, Feyereisen R. 1994. Expression of the allatostatin gene in endocrine cells of the cockroach midgut. Proc Natl Acad Sci USA 91:22894-11898.

Rembold H. 1987. Caste specific modulation of juvenile hormone titer in *Apis mellifera*. Insect Biochem 17:1003-1006.

Riddiford LM. 1996. Juvenile hormone: the status of its status quo action. Arch Insect Biochem Physiol 32:271-286.

Robinson GE. 1985. Effects of a juvenile hormone analogue on honey bee foraging behaviour and alarm pheromone production. J Insect Physiol 31:277-282.

Robinson GE. 1987. Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. Behavioral Ecology and Sociobiology 230:329-338.

Robinson GE. 1998. From society to gene with the honey bee. Amer Sci 86:456-462.

Rodi DJ, Makowski L. 1999. Phage-display technology-finding a needle in a vast molecular haystack. Curr Opin Biotechnol 10:87-93.

Rossini SA. 1989. Caracterização das mudas ontogenéticas e biometria dos *corpora allata* de *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEP (Hymenoptera, Apidae). Dissertação de Mestrado UNESP Rio Claro 120p.

Ruddell CJ, Wainwright G, Geffen A, White MR, Webster SG, Rees HH. 2003. Cloning, characterization, and developmental expression of a putative farnesoic acid O-methyl transferase in the female edible crab *Cancer pagurus*. *Biol Bull* 205:308-318.

Schneider E, Hunke S. 1998. ATP-binding cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domain 22:1-20.

Schöck F, Perrimon N. 2003. Retraction of the *Drosophila* germ band requires cell-matrix interaction. *Genes & Development* 17:597-602.

Schubert D, Kimura H, LaCorbiere M, Vauhan J, Karr D, Fisher WH. Activin is a nerve cell survival molecule. *Nature* 1990; 344:868-870.

Scott K, Brady Jr. R, Cravchik, A, Morozov P, Rzhetsky A, Zuker C, Axel R. 2001. A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell* 104:661-673.

Servant F, Bru C, Carrere S, Courcelle E, Gouzy J, Peyruc D, Kahn D. 2002. ProDom: Automated clustering of homologous domains. *Briefings in Bioinformatics* 3:246-251.

Shinoda T, Itoyama K. 2003. Juvenile hormone acid methyltransferase: a key regulatory enzyme for insect metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11986-11991.

Shiotsuki T, Bonning BC, Hirai M, Kikuchi K, Hammock BD. 2000. Characterization and affinity purification of juvenile hormone esterase from *Bombyx mori*. *Biochem Biotech Biosci* 64:1681-1687.

Si A, Helliwell P, Maleszka R. 2004. Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memory in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 77:191-197.

Sigg D, Thompson CM, Mercer AR. 1997. Activity-dependent changes to the brain and behavior of the honeybee, *Apis mellifera* (L.). J Neurosci 17:7148-7156.

Silva Gunawardene YI, Bendena WG, Tobe SS, Chan SM. 2003. Comparative immunohistochemistry and cellular distribution of farnesoic acid O-methyltransferase in the shrimp and the crayfish. Peptides 24:1591-1597.

Silva Gunawardene YI, Chow BK, He JG, Chan SM. 2001. The shrimp FAMeT cDNA is encoded for a putative enzyme involved in the methylfarnesoate (MF) biosynthetic pathway and is temporally expressed in the eyestalk of different sexes. Insect Biochem Mol Biol 31:1115-1124.

Silva Gunawardene YI, Tobe SS, Bendena WG, Chow BK, Yagi KJ, Chan SM. 2002. Function and cellular localization of farnesoic acid O-methyltransferase(FAMeT) in the shrimp, *Metapenaeus ensis*. Eur J Biochem 269:3587-3595.

Smith LA, Wang X, Peixoto AA, Neumann EK, Hall LM, Hall JC. 1996. A *Drosophila* calcium channel alpha1 subunit gene maps to a genetic locus associated with behavioral and visual defects. J Neurosci 16:7868-7879.

Soulages JL, Wells MA. 1994. Lipophorin: the structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. Adv Protein Chem 00: 371-415.

Stach S, Benard J, Giurfa M. 2004. Local-feature assembling in visual pattern recognition and generalization in honeybees. Nature 429:758-761.

Taylor III PA, Bhatt TR, Horodyski FM. 1996. Molecular characterization and expression analysis of *Manduca sexta* allatotropin. Eur. J Biochem 239:588-596.

Thomas BA, Hinton AC, Moskowitz H, Severson TF, Hammock BD. 2000. Isolation of juvenile hormone esterase and its partial cDNA clone from the beetle, *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem Mol Biol* 30:529-540.

Thompson CS, Yagi KJ, Chen ZF, Tobe SS. 1990. The effects of octopamine on juvenile hormone biosynthesis, electrophysiology, and cAMP content of the corpora allata of the cockroach *Diploptera punctata*. *J Comp Physiol B* 160:241-249.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RHA. 2002. The genetics of RNA silencing. *Annual reviews of genetics* 489-519.

Timmons L, Fire A. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395:854.

Tobe S, Stay B. 1979. Modulation of juvenile hormone synthesis by an analogue in the cockroach. *Nature* 281:481-482.

Tobe SS, Stay B. 1985. Structure and regulation of the *corpus allatum*. *Advances Insect Physiol* 18:305-432.

Townson SM, Chang BSW, Salcedo R, Chadwell LV, Pierce NE, Britt SG. 1998. Honeybee blue- and ultraviolet-sensitive opsins: cloning, heterologous expression in *Drosophila*, and physiological characterization. *J Neurosci* 18:2412-2422.

Tsuchimoto M, Aoki M, Takada M, Kanou Y, Sasagawa H, Kitagawa Y, Kadawaki T. 2004. The change of gene expression in honeybee (*Apis mellifera*) brains associated with ages. *Zoological Science* 21:23-28.

Vandenberg RJ. 1998. Molecular pharmacology and physiology of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Expr Pharmacol Physiol* 25:393-400.

Venkataraman V, O'Mahony PJ, Manzcak M, Jones G. 1994. Regulation of juvenile hormone esterase gene transcription by juvenile hormone. *Dev Genet* 15:391-400.

Venkatesh K, Abdel-Aal YAI, Armstrong FB, Roe RM. 1990. Characterization of affinity-purified juvenile hormone esterase from plasma of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Biol Chem* 265:21727-21732.

Vermunt AMW, Koopmanschap AB, Vlak JM, De Kort CAD. 1997. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a putative juvenile hormone esterase from the Colorado potato beetle. *Insect Biochem Mol Biol* 7:19-928.

Vermunt AMW, Vermeesch AMG, De Kort CAD. 1997. Purification and characterization of juvenile hormone esterase from the hemolymph of the Colorado potato beetle. *Arch Insect Biochem Physiol* 35:261-277.

Vermunt, AMW, Koopmanschap AB, Vlak JM, De Kort CAD. 1998. Evidence for two juvenile hormone esterase-related genes in the Colorado potato beetle. *Insect Mol Biol* 7:327-336.

Wagener-Hulme C, Kuehn JC, Schulz DJ, Robison GE. 1999. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. *J Comp Physiol* 184:471-479.

Wang AM, Doyle MV, Mark DF. 1989. Quantificação of mRNA by polymerase chain reaction. *Proceedings of Natural Academy of Science of the United States of America* 86:9717-9721.

Wehner R. 1971. The generalization of directional visual stimuli in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* 15:79-1591.

Whitfield CW, Band MR, Bonaldo MF, Kumar CG, Liu L, Pardini JR, Robertson HM, Soares MB e Robinson GE. 2002. Annotated expressed sequence tags and cDNA microarrays for studies of brain and behavior in the honey bee. *Genome Res.* 12(4):555-566.

Whitfield CW, Cziko AM, Robinson GE. 2003. Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science* 302:296-299.

Wing KK, Sparks TC, Lovell VM, Levinson SO, Hammock BD. 1981. The distribution of juvenile hormone esterase and its interrelationship with other proteins influencing juvenile hormone metabolism in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem* 11:473-485.

Woodhead AP, Stay B, Seidel SL, Khan MA, Tobe SS. 1989. Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5997-6001.

Woodring J, Hoffmann KH. 1994. The effects of octopamine, dopamine e serotonin on juvenile hormone synthesis, *in vitro*, in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J Insect Physiol* 40(9):797-802.

Woyke J. 1980. Effect of sex allele homo-heterozygosity on honeybee colony population and their honey production. I. Favourable development conditions and unrestricted queens. *J Apic Res* 19:51-63.

Yokoyama S, Nei M. 1979. Population dynamics of sex determining alleles in honey bees and self-incompatibility alleles in plants. *Genetics* 91:602-626.

Zhang SW, Lehrer M, Srinivasan MV. 1999. Honeybee memory:navigation by associative grouping and recall of visual stimuli. *Learn Mem* 72:180-201.

Zhang SW, Srinivasan MV. 1994. Prior experience enhances pattern discrimination in insect vision. *Nature* 368:330-333.

Zhang QR, Xu WH, Chen FS, Li S. 2005. Molecular and biochemical characterization of juvenile hormone epoxide hydrolase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 35:153-164.

Zheng X, Wang J, Haerry TE, Wu AYH, Martin J, O'Connor, MBO, Lee CHJ, Lee T. 2003. TGF- β signaling activates steroid hormone receptor expression during neuronal remodeling in the *Drosophila* brain. *Cell* 112:303-315.

Zuker CS. 1996. The biology of vision of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:571-6.