

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

VALDECI GERALDO COELHO JÚNIOR

**INFLUÊNCIA DO FARNESOL EXÓGENO SOBRE ASPECTOS
FISIOLÓGICOS DE ABELHAS *APIS MELLIFERA***

Alfenas / MG

2019

VALDECI GERALDO COELHO JÚNIOR

**INFLUÊNCIA DO FARNESOL EXÓGENO SOBRE ASPECTOS
FISIOLÓGICOS DE ABELHAS *APIS MELLIFERA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Aplicada À Saúde como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal
de Alfenas – UNIFAL-MG.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento.
Orientador: Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk.

Alfenas / MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da
Universidade Federal de Alfenas Biblioteca Central – Campus Sede

Coelho Júnior, Valdeci Geraldo
C672i Influência do farnesol exógeno sobre aspectos fisiológicos de abelhas
Apis mellifera / Valdeci Geraldo Coelho Júnior. – Alfenas/MG, 2019.
72 f.: il. -

Orientador: Angel Roberto Barchuk.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, 2019
Bibliografia.

1. *Corpora allata*. 2. Farnesol. 3. Expressão gênica. I. Barchuk, Angel
Roberto. II. Título.

CDD- 616.8

VALDECI GERALDO COELHO JUNIOR

“INFLUÊNCIA DO FARNESOL EXÓGENO SOBRE ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE
ABELHAS *Apis mellifera*”.

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre
em Biociências Aplicadas à Saúde pela
Universidade Federal de Alfenas . Área de
concentração: Neurociências e Comportamento

Aprovado em: 23 / 01 / 2019

Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: _____

Prof. Dr. Bruno Zavan
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: _____

Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes
Instituição: Universidade Federal de São Carlos
- UFSCar

Assinatura: _____

Aos meus pais, Valdeci e Ordália

Aos meus irmãos, Kelly e Dênis

Aos meus sobrinhos Cauã, Ana, Camilly, Maria e João

Ao meu porto seguro, Matheus...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos pelo amor incondicional, incentivo e me estimularem a buscar mais conhecimento. Obrigado por tudo o que fizeram e fazem por mim, por entenderem minha ausência nas datas festivas e por me desafiarem a sempre ser o melhor de mim. Amo vocês!

À minha tia Céia e à minha prima Thayná por serem pessoas completamente iluminadas e terem o dom de me tirar os mais belos sorrisos quando as vejo. Gratidão eterna pela amizade, parceria e os momentos que passamos juntos, até mesmo via redes sociais.

À técnica Marcela do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas, da Universidade de São Paulo, por ter me ensinado a dissecar *corpora allata*.

À secretária do Programa de Pós Graduação em Biociências Aplicadas À Saúde, Adriana Pereira, por ser uma excelente profissional e amiga.

À Profa. Dra. Roseli Soncini por ter me auxiliado nos estudos para adentrar na pós-graduação.

À Profa. Dra. Maria José dos Santos Wisniewski, do Laboratório de Limnologia da UNIFAL-MG, por emprestar, gentilmente, uma de suas lupas para minhas dissecções e falas de incentivo a perpetuar na vida acadêmica.

À técnica Dra. Juliana Martins Ramos por ter me ajudado no momento mais delicado do meu trabalho, pelas conversas, dicas de experimentos e ensinamentos, tornando-se uma das pessoas chaves para a concretização deste trabalho.

Às técnicas Neuza e Izabel pelos momentos de descontrações entre os intervalos de experimentos e pela amizade.

Aos meus companheiros de República que muito me ensinaram sobre a vida, agradeço eternamente por tudo e por vocês serem minha segunda família: Kamilla, Natanael, Priscila, Bianca, Leonardo e Elba.

Aos meus amigos de Alfenas, por todos os momentos que passamos juntos, por me acalmarem e consolarem em diversas situações ao longo desses dois anos de pós: Mayara, Pedro, Maíra, Rosa, Marina, João Pedro, Melissa, Amanda, Vanessa, Cássia e Rose.

Ao meu melhor amigo e porto seguro, Matheus Andrade, pelas conversas diárias, mesmo à distância, incentivos, “puxões de orelha” e ser uma pessoa magnífica em todos os aspectos.

À CAPES pelo financiamento da minha pesquisa.

Ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da UNIFAL-MG, por proporcionar os materiais e equipamentos necessários para meu trabalho.

Aos meus amigos do Grupo de Pesquisa Biologia da Socialidade pelos momentos de pesquisa, confraternizações, dias de cozinhar juntos (famoso grupo culinário MasterChef Barchuquetes), trocas de saberes e incentivo para eu poder finalizar este trabalho. Em especial à Profa. Dra. Livia Moda, aos doutorandos Délcio, Joseana, Bianca e Sheila, à mestranda Gabriele e aos graduandos Davi, Márcio e Izabella. Vocês são muito importantes para mim como colegas de trabalho, pesquisadores e pessoas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk pelos cinco anos de partilha de conhecimentos e ser uma pessoa completamente iluminada, íntegra, incentivadora e amiga. O profissional e pesquisador que estou me tornando é fruto do trabalho do Roberto. Obrigado por acreditar e apostar em mim; em sempre ver o melhor lado de uma situação; pelas reuniões semanais e suas comemorações/vibrações em cada gráfico apresentado ou objetivo de trabalho finalizado. Gratidão por ter me aceitado em 2013 no grupo de Pesquisa e ter me permitido crescer em todos os aspectos.

“The key to making progress is to recognize how to take that very first step. Then you start your journey. You hope for the best and you stick with it, day in, day out. Even if you're tired, even if you want to walk away, you don't. Because you are a pioneer. And nobody ever said it'd be easy”.

- MEREDITH GREY, 2010.

RESUMO

Tanto humanos como outros animais frequentemente entram em contato com moléculas produzidas por plantas e que podem regular direta ou indiretamente suas fisiologias. No modelo de estudo *Apis mellifera*, as operárias forrageadoras coletam néctar, pólen e resinas vegetais. No sul de Minas Gerais, a planta *Baccharis dracunculifolia* apresenta em suas resinas o farnesol, precursor importante da via de síntese do Hormônio Juvenil (HJ), hormônio que governa vários aspectos da vida de insetos. Hipotetizamos que, durante o forrageamento, as operárias entram em contato com quantidades significativas de precursores de HJ que, uma vez dentro do corpo, podem ser modificados e convertidos em HJ. Esta interferência com a via de síntese endógena de HJ nestes insetos pode promover alterações fisiológicas e comportamentais com implicações biológicas, ecológicas e agrícolas. Para testar esta hipótese, avaliamos a influência de farnesol exógeno sobre parâmetros fisiológicos de abelhas operárias jovens. Para isso, dissecamos *corpora allata* (CA), órgão responsável pela síntese de HJ, em dois grupos de abelhas, tratados por três dias: (I) 50 abelhas que receberam 1g de alimento contendo mel, açúcar e farnesol, diluído em óleo de canola, e (II) 50 abelhas que receberam 1g de alimento contendo mel, açúcar e óleo de canola (controle). Por meio de RT-qPCR determinamos o perfil de transcrição dos genes *metil farnesoato epoxidase (mfe)*, *metil transferase (mt)* e *farnesil difosfato sintase (fpps3)*, envolvidos na via de síntese do HJ, e do gene *esterase do hormônio juvenil (jhe)*, responsável pela degradação do HJ. Nossos resultados mostram que o gene *mfe* é mais expresso em indivíduos controle em relação aos suplementados com o farnesol exógeno; em contramão, para o gene *jhe* foi encontrado o inverso. Isto indica-nos que quanto mais farnesol uma abelha consumir, menor será a síntese de precursor direto de HJ e maior a degradação de HJ. Ademais, abelhas tratadas com farnesol tiveram seus volumes de CA, incluindo área e diâmetro dos núcleos, maiores em relação às abelhas controles. Analisamos, ainda, o comportamento nos dois grupos durante 72 h, e observamos que abelhas com 48 h de vida suplementadas com farnesol movimentavam-se de forma mais ativa em relação às do grupo controle. Estes achados demonstram que a agentes exógenos, como o farnesol sintetizado por plantas, alteram a fisiologia, metabolismo e comportamento de abelhas melíferas.

Palavras-chave: *Corpora allata*. Farnesol. Expressão gênica.

ABSTRACT

Humans and other animals frequently get in contact with other molecules produced by plants that can regularize direct or indirectly their physiology. In the case study *Apis mellifera*, the foraging workers collect the nectar, pollen and vegetable resins. In the South of Minas Gerais, the plant *Baccharis dracunculifolia* show in its resins the farnesol, important precursor of the synthetic pathway of the Juvenile Hormone (JH) that commands many of the bug's life aspects. We hypothesize that, during the foraging, the workers get in touch with significant amounts of JH precursors that, once inside the body, can be modified and converted in JH. This interference with the endogenous synthetic pathway of JH on these insects can cause physiological and behavioral changes with biological, ecological and agricultural implications. To test this hypothesis, we evaluated the influence of exogenous farnesol under physiological parameters of young working bees. To do that, we have dissected *corpora allata* (CA), organ responsible for the synthesis of JH, in two groups of bees, treated for three days: (I) 50 bees that received 1 g of food containing honey, sugar and farnesol diluted in canola oil, and (II) 50 bees that received 1 g of honey, sugar and canola oil (control). Through the RT-qPCR we have determined the transcription profile of the *methyl farnesoate epoxidase (mfe)*, *methyl transferase (mt)* and *farnesyl diphosphate synthase (fpps3)* genes, involved in the JH synthesis pathway, and the *juvenile hormone esterase (jhe)* gene, responsible for the JH's degradation. Our results show that the *mfe* gene is more expressed in control individuals compared to the ones supplemented with exogenous farnesol; on the other hand, to the gene *jhe* it was found the opposite. This shows us that the more farnesol a bee consumes the lower will be the synthesis of direct precursor of JH and higher degradation of JH. Furthermore, bees treated with farnesol have had their CA volumes, including area and diameter of the nuclei, bigger in relation to the control bees. We've also analyzed the behavior in both groups for 72 h and observed that bees with 48 h of life supplemented with farnesol move more active compared to the control group. These findings demonstrate that exogenous agents, such as farnesol synthesized by plants, alter the physiology, metabolism and behavior of honey bees.

Key words: *Corpora allata*. Farnesol. Genetical expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Títulos de Hormônio Juvenil (em azul) e Vitelogenina (em vermelho) de operárias adultas de abelhas <i>A. mellifera</i> 21
Figura 2	Estruturas do Hormônio Juvenil I, Hormônio Juvenil II e Hormônio Juvenil III, em insetos..... 22
Figura 3	Via de síntese do hormônio juvenil, evidenciando os intermediários da cadeia, bem como as enzimas envolvidas no processo. 23
Figura 4	Colmeia do Apiário Experimental da UNIFAL–MG usada em nosso estudo. A) Vista posterior; B) Quadros..... 28
Figura 5	Caixa de observação para abelhas..... 29
Figura 6	Mortalidade de abelhas operárias <i>A. mellifera</i> após 18 h e 28 h do início do experimento em um tratamento com 53 µL de farnesol em 1 g de alimento, contendo mel e açúcar e sem a dose de farnesol. As colunas maiores correspondem à sobrevivência de 100% das abelhas do grupo controle. As colunas em quadriculado representam a sobrevivência de abelhas alimentadas com farnesol, sendo em 18 h igual a 4 abelhas vivas e 48 h apenas uma abelha viva..... 37
Figura 7	Efeito do farnesol exógeno sobre o comportamento de abelhas operárias de 3 dias (caixas de confinamento). A) Comportamento de abelhas operárias após 48 h de início do tratamento; 1 g de alimento composto por açúcar, mel e óleo de canola. B) Comportamento de abelhas após 48 h de início do tratamento; 1 g de alimento composto por mel, açúcar e farnesol diluído em óleo de canola. 38
Figura 8	Corpora allata de operárias <i>A. mellifera</i> 39
Figura 9	Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de amplificação (40 ciclos) de fragmentos de cDNA de mt sintetizado a partir de RNA total de CA de operárias. L – Ladder; F1-F3 – primer mt para amostras 1, 2 e 3 de corpora allata com farnesol; C1-C3 - primer mt para amostras 1, 2 e 3 de corpora allata sem farnesol; B - solução controle contendo PCR Master Mix, água DEPC, primer R de mt e primer F de mt, sem cDNA. Número de ciclos igual a 40; Tempo de corrida igual a 90 minutos; Temperatura de anelamento igual a 60°C; Tempo de exposição da foto igual a 8.68 segundos; ganho igual a 2; ScanMode Fast; Brilho igual a zero; Quantidade de material colocado em cada poço igual a 21µl (amostras com 0.5µl SYBR Green I e 0.5µl Azul de bromofenol)..... 40
Figura 10.	Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de amplificação (40 ciclos) de fragmentos de cDNA de mfe sintetizado a partir de RNA total de CA de operárias. L – Ladder; F1-F3 – primer mfe para amostras 1, 2 e 3 de corpora allata com farnesol; C1-C3 - primer mfe para amostras 1, 2 e 3 de corpora allata sem farnesol; B - solução controle contendo PCR Master Mix, água DEPC, primer R de mfe e primer F de mfe, sem cDNA. Número de ciclos igual a 40; Tempo de corrida igual a 90 minutos; Temperatura de anelamento igual a 60°C; Tempo de exposição da foto igual a 7.16 segundos; ganho igual a 1; ScanMode Fast; Brilho igual a zero; Quantidade de material colocado em cada poço igual a 21µl (amostras com 0.5µl SYBR Green I e 0.5µl Azul de bromofenol). 40
Figura 11	Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de amplificação (40 ciclos) de fragmentos de cDNA de jhe sintetizado a partir de RNA total de CA de operárias. L – Ladder; F1-F3 – primer jhe para amostras 1, 2 e 3 de corpora allata com farnesol; C1-C3 - primer jhe para amostras 1, 2 e 3 de corpora allata sem farnesol; B - solução controle contendo PCR Master Mix, água DEPC, primer R

- de jhe e primer F de jhe, sem cDNA. Número de ciclos igual a 40; Tempo de corrida igual a 90 minutos; Temperatura de anelamento igual a 60°C; Tempo de exposição da foto igual a 9.28 segundos; ganho igual a 2; ScanMode Fast; Brilho igual a 1; Quantidade de material colocado em cada poço igual a 21µl (amostras com 0.5µl SYBR Green I e 0.5µl Azul de bromofenol). 41
- Figura 12 Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de amplificação (40 ciclos) de fragmentos de cDNA de fpps3 sintetizado a partir de RNA total de CA de operárias jovens. L – Ladder; F1-F3 – primer fpps3 para amostras 1, 2 e 3 de corpora allata com farnesol; C1-C3 - primer fpps3 para amostras 1, 2 e 3 de corpora allata sem farnesol; B - solução controle contendo PCR Master Mix, água DEPC, primer R de fpps3 e primer F de fpps3, sem cDNA. Número de ciclos igual a 40; Tempo de corrida igual a 90 minutos; Temperatura de anelamento igual a 60°C; Tempo de exposição da foto igual a 7.16 segundos; ganho igual a 2; ScanMode Fast; Brilho igual a 1; Quantidade de material colocado em cada poço igual a 21µl (amostras com 0.5µl SYBR Green I e 0.5µl Azul de bromofenol). 42
- Figura 13 Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de amplificação (40 ciclos) de fragmentos de cDNA de fpps3 e actina sintetizados a partir de RNA total de CA de operárias jovens. L – Ladder; F1 – primer fpps3, com temperatura de anelamento igual a 56°C, para amostra de corpora allata com farnesol; F2 – primer fpps3 com temperatura de anelamento igual a 58°C, para amostra de corpora allata com farnesol; C1 - primer fpps3, com temperatura de anelamento igual a 56°C, para amostra de corpora allata sem farnesol; C2 – primer fpps3, com temperatura de anelamento igual a 58°C, para amostra de corpora allata sem farnesol; Act1 - primer actina, com temperatura de anelamento igual a 56°C, para amostra de corpora allata; Act2 - primer actina, com temperatura de anelamento igual a 58°C, para amostra de corpora allata; B – solução controle contendo PCR Master Mix, água DEPC, primer R de actina e primer F de actina. Número de ciclos igual a 40; Tempo de corrida igual a 90 minutos; Tempo de exposição da foto igual a 6.16 segundos; ganho igual a 1; ScanMode Fast; Brilho igual a zero; Quantidade de material colocado em cada poço igual a 21µl (amostras com 0.3µl SYBR Green I e 0.5µl Azul de bromofenol). 43
- Figura 14 Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de amplificação (40 ciclos) de fragmentos de cDNA de fpps3 sintetizado a partir de RNA total de CA de operárias forrageiras. L – Ladder; A1-A3: primer fpps3, com temperatura de anelamento igual a 60°C, para amostras de corpora allata de abelhas forrageiras; B – solução controle contendo PCR Master Mix, água DEPC, primer R de fpps3 e primer F de fpps3. Número de ciclos igual a 40; Tempo de corrida igual a 90 minutos; Tempo de exposição da foto igual a 7.16 segundos; ganho igual a 1; ScanMode Fast; Brilho igual a zero; Quantidade de material colocado em cada poço igual a 21µl (amostras com 0.3µl SYBR Green I e 0.5µl Azul de bromofenol). 44
- Figura 15 Curvas de melting dos genes codificadores de enzimas da via de síntese e degradação do HJ. A-E: Curvas de melting. A: gene mt com Tm igual a 78°C; B: gene mfe com Tm igual a 70°C C: gene jhe com Tm igual a 74.5°C; D: gene actina com Tm igual a 76°. E: Curva de melting do gene fpps3, onde não é possível determinar a temperatura de melting. 46
- Figura 16 Níveis relativos de expressão de genes obtidos mediante PCR quantitativa em Tempo Real em corpora allata de *A. mellifera*. Os eixos X representam os tratamentos (controle e farnesol) para cada gene (A: jhe; B: mfe; e C: mt). Os

	eixos Y representa os níveis relativos de transcrição dos genes da via de síntese e de degradação do HJ (médias de 2 (- $\Delta\Delta cT$)). O teste estatístico utilizado foi o teste t de Student, onde $p < 0,05$ está representado no gráfico por * e $p < 0,0001$ está representado por *** 47
Figura 17	Influência do farnesol exógeno sobre a área (mm^2) e o volume (nL) de CA de operárias de abelhas <i>A. mellifera</i> . No eixo X temos os grupos estudados, sendo o grupo controle composto por abelhas de 72h de vida que foram alimentadas com uma mistura de açúcar, mel e óleo de canola durante três dias; e o grupo Farnesol composto por abelhas suplementadas com farnesol exógeno em suas dietas. Nos eixos Y temos os valores das áreas em mm^2 (A) e do volume em nL (B) de ambos os grupos. O teste estatístico utilizado foi o teste t de Student, onde $p < 0,05$ está representado no gráfico por *. 48
Figura 18	Exemplo de corte histológico em historesina de corpora allata localizadas no trato retrocerebral de abelhas <i>A. mellifera</i> . A: Par de glândulas endócrinas – CA - de abelhas do grupo controle; entre os CA tem-se parte do esôfago. B: par de glândulas endócrinas – CA - de abelhas do grupo tratado com farnesol. Entre os CA tem-se parte do esôfago. As setas pretas indicam os CA. As setas brancas indicam núcleos de células dos CA. Barra de escala: $50\mu\text{m}$. Coloração: Azul de metileno..... 49
Figura 19	Influência do farnesol exógeno sobre o (A) diâmetro em μm e (B) a área em μm^2 de núcleos de CA de operárias de abelhas <i>A. mellifera</i> . No eixo X temos os grupos estudados, sendo o grupo Controle composto por abelhas de 72h de vida que foram alimentadas com uma mistura de açúcar, mel e óleo de canola durante três dias; e o grupo Farnesol composto por abelhas suplementadas com farnesol exógeno em suas dietas. Nos eixos Y temos as medições de diâmetro em μm (A) e área em μm^2 (B) em de ambos os grupos. O teste estatístico utilizado foi o teste t de Student, onde $p < 0,05$ está representado no gráfico por *. 50
Figura 20	Influência do farnesol exógeno sobre a morfologia de CA de <i>A. mellifera</i> . A-C: CA de abelhas do grupo controle. D-F: CA de abelhas do grupo tratado com farnesol. Marcação: DAPI. Barra de escala: $50\mu\text{m}$ 51
Figura 21	Esquema dos principais achados sobre a influência do farnesol exógeno sobre aspectos fisiológicos de abelhas <i>A. mellifera</i> . CA = corpora allata; Cb = cérebro. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers forward (F) e reverse (R) utilizados nos experimentos da sqPCR e qPCR.</i> T° = temperatura.....	32
----------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

20E	20-hidroxiecdisona
BPA	Bisfenol A
BmJHAMT	O-metiltransferase do Hormônio Juvenil de <i>Bombyx mori</i>
BgJHAMT	O-metiltransferase do Hormônio Juvenil de <i>Blattella germanica</i>
CA	<i>Corpora allata</i>
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMAPP	Dimetilalilo difosfato
DmJHAMT	O-metiltransferase do Hormônio Juvenil de <i>D. melanogaster</i>
EDCs	Compostos perturbadores endócrinos
EcJHEH	Epóxido hidrolase do Hormônio Juvenil de <i>Epicauta chinensis</i>
FA	Ácido farnesóico
FES	Fitoecdisteróides
FPP	Farnesil pirofosfato
<i>fpps</i>	<i>Farnesil difosfato sintase</i>
GPPS	Geranil difosfato sintase
GGPPS	Geranilgeranil difosfato sintase
HJ	Hormônio Juvenil
IPP	Isopentenilo difosfato
JHAMT	O-metiltransferase do Hormônio Juvenil
JHE	Esterase do Hormônio Juvenil
JHEH	Epóxido hidrolase do Hormônio Juvenil
LG	Glândula labial
MF	Metil farnesoato
<i>mfe</i>	<i>Metil farnesoato epoxidase</i>
<i>mt</i>	<i>Metil transferase</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
Vg	Vitelogenina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	As colônias de abelhas <i>Apis mellifera</i> como modelo de estudo	18
1.2	Hormônio Juvenil: aspectos moleculares e biossíntese	21
1.3	Motivação e hipótese	24
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Visão Geral	27
3.2	Manutenção do Apiário Experimental	27
3.3	Tratamentos das abelhas, avaliação comportamental e dissecação de CA	28
3.4	Determinação de perfis de transcrição gênica por RT-Qpcr	30
3.4.1	<i>Extração de RNA total</i>	30
3.4.2	<i>Síntese de cDNA e ensaios de PCR para quantificação de níveis de transcritos</i>	31
3.5	Histologia com historesina.....	33
3.5.1	<i>Dissecção e fixação dos tecidos</i>	33
3.5.2	<i>Preparo de historesina</i>	34
3.5.3	<i>Coloração de lâminas</i>	34
3.6	Citoquímica com DAPI	35
3.7	Análise Estatística.....	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Padronização da concentração de farnesol e estudo comportamental	36
4.2	Análise da expressão gênica por RT-PCR e eletroforese em géis de agarose.....	39
4.3	Comportamento transcricional de genes associados ao metabolismo do HJ em resposta a farnesol exógeno	44
4.4	O farnesol exógeno aumenta o volume de CA de abelhas jovens	48
5	DISCUSSÃO	52
5.1	O gene <i>fpps3</i> não parece expressar-se em <i>corpora allata</i> de abelhas jovens	52
5.2	A expressão do gene <i>metiltransferase do hormônio juvenil (mt)</i> parece ser regulada positivamente por farnesol exógeno.....	53
5.3	O farnesol exógeno reprime a expressão do gene <i>metil farnesoato epoxidase (mfe)</i> ..	56
5.4	O farnesol exógeno altera a transcrição de genes da via de síntese e degradação do HJ, a morfologia de CA e o comportamento de operárias jovens	59
6	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

A relação entre compostos que circulam no ambiente e suas interferências nas vias de sinalização mediadas por receptores nucleares, incluindo os dos hormônios esteroides, estão sendo o foco de várias abordagens científicas (JANOŠEK et al., 2006). Os casos mais conhecidos estão representados pelos estrogênios ambientais, que imitam o estradiol e se ligam aos receptores de estrogênio. Essas moléculas agonistas pertencem ao grupo de “compostos perturbadores endócrinos” (EDCs), onde tem-se, como um tipo de estrogênio bem conhecido, o bisfenol A (BPA), utilizado como monômero na produção de policarbonato e compostos de resina epoxi, encontrados em vários produtos de consumo e disseminados por toda parte (sistemas de ar, água e solo) (WAGNER, 2009). Os organismos que entram em contato com BPA apresentam desequilíbrios hormonais e na expressão de receptores de estrogênio; distúrbios na função reprodutiva e comportamento relacionado ao sexo; efeitos adversos nos cérebros; alteração do metabolismo e aumento da susceptibilidade a doenças cardiovasculares (PASQUALI & VICENNATI; LERANTH et al., 2008). Assim, há um forte desequilíbrio hormonal em plantas, quando há a participação de BPA, repercutindo na cadeia alimentar como um todo.

Outro exemplo da influência cruzada de EDCs sobre a fisiologia de animais é o uso de piriproxifeno e metopreno no controle do crescimento que afeta o equilíbrio hormonal de insetos, resultando em forte supressão da embriogênese, metamorfose e formação de adultos. Estes compostos inseticidas têm como função controlar pragas agrícolas, veterinárias e de saúde humana como moscas, mosquitos e pulgas (UNSWORTH et al., 1974; HARMON et al., 1995; WHEELER & NIJHOUT, 2003; RIDDIFORD, 2012). Tanto o piriproxifeno quanto o metopreno são análogos ao Hormônio Juvenil (HJ) – um terpenóide lipossolúvel que regula processos de aprendizado, reprodução, migração e diapausa, juntamente com os hormônios ecdisteróides em insetos (HAMMOCK, 1985; ROE & VENKATESH, 1990; DE KORT & GRANGER, 1996; CROTEAU, 2000; KLEIN, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2004). Existe outro terpenóide lipossolúvel denominado ácido retinóico (AR), um metabólito da vitamina A, que atua como molécula sinalizadora e controla uma ampla diversidade de processos biológicos, como o desenvolvimento do sistema nervoso em vertebrados

(WHEELER & NIJHOUT, 2003; RIDDIFORD, 2012). HJ e AR compartilham algumas semelhanças moleculares e são capazes de reatividade cruzada; o AR é capaz de mimetizar alguns dos efeitos do HJ quando injetado em insetos e o HJ e seus análogos podem se ligar ao receptor de ácido retinóico (RAR) em vertebrados (PALLI, S. R., RIDDIFORD, L. M., HIRUMA, K., 1991; JONES, G.; HARMON et al., 1995). Desse modo, torna-se possível que o piriproxifeno e o metopreno possam se ligar ao RAR, ativando-o em momentos inapropriados durante o desenvolvimento do animal ou podem atuar como bloqueadores, que impedem a ligação do AR normal ao RAR, levando assim a teratogênese – desenvolvimento anormal, incluindo morte, malformação, retardo de crescimento e/ou distúrbio funcional (COLLINS & MAO, 1999; WHEELER & NIJHOU, 2003; FLATT et al., 2006). Devido à reatividade cruzada de HJ e AR, pesquisadores da área alertaram sobre a possibilidade do uso de piriproxifeno, para controle de populações de mosquito *Aedes aegypti* na água potável brasileira, causar microcefalia e sugeriram que este composto seja suspenso até terem resultados sobre seus efeitos no desenvolvimento de mamíferos (TANTIBANCHACHAI, T., 2014; EVANS et al., 2016).

Além das complicações na saúde humana, por parte do uso de piriproxifeno, este produto e seus derivados podem interferir na fisiologia e metabolismo de organismos com quem entram em contato (WHEELER & NIJHOU, 2003; FLATT et al., 2006). Por ser um análogo ao HJ e reprimir atividades biológicas benéficas ao desenvolvimento de um inseto, o piriproxifeno torna-se um agente perigoso à vida de diversos animais, que atuam muitas vezes como polinizadores (TASEI, 2001; THOMPSON et al., 2005, 2007; KLEIN et al., 2007); um dos principais polinizadores existentes diz respeito às abelhas *Apis mellifera* (KEEVAN, 1999). Ao realizarem a coleta de pólen, néctar e/ou resinas, as abelhas entram em contato com diversos compostos sintetizados pelas plantas e/ou dispersos no ar, assim podem sofrer alterações fisiológicas em decorrência destas interações (YANG et al., 2010; FOURRIER et al., 2015). Por serem organismos extremamente sensíveis à qualidade, riqueza e abundância ambiental, as abelhas podem ser usadas como modelo de estudo da influência de EDCs sobre a fisiologia animal.

1.1 As colônias de abelhas *Apis mellifera* como modelo de estudo

As abelhas *A. mellifera*, classificadas na ordem Hymenoptera, Superfamília

Apoidea, Família Apidae e Gênero Apis (CULLINEY, 1983), caracterizam-se por ser insetos eussociais (WILSON, 1971). A eussocialidade se caracteriza por sobreposição de gerações, divisão de tarefas e cuidado cooperativo com a prole (WILSON, 1971). Estas abelhas vivem em colônias e são subdivididas em três castas: rainhas, operárias e zangões. Cada colmeia contém apenas uma rainha, cerca de 100 a 400 zangões e, em média, 60 mil operárias (VIEIRA, 1989). Essa variação no número de indivíduos em uma colmeia pode dever-se a diversos fatores, especialmente: (I) taxa de oviposição, (II) quantidade de abelhas exercendo atividades intra e extranidais, (III) disponibilidade de recursos florais e (IV) temperatura ambiente. O sexo das abelhas é baseado no sistema haploide/diploide, isto é, dos ovos não fertilizados (haploides, $n=16$) emergem zangões, e dos ovos fertilizados (diploides, $2n=32$) emergem as fêmeas (NACHTSHEIM, 1916). Nas fêmeas ocorre a diferenciação em castas, operárias e rainhas, dependendo da qualidade e quantidade do alimento recebido durante o desenvolvimento larval (BEETSMA, 1979; JUNG-HOFFMANN, 1966). Portanto, a nutrição diferencial é responsável pelo dimorfismo (REMBOLD et al., 1974).

As rainhas têm como função apenas a reprodução, bem como os zangões, e estas castas podem viver até 5 anos e 8 semanas, respectivamente (TARPY & PAGE JR., 2000). Cabe às operárias realizar a maior parte das tarefas relacionadas ao crescimento e manutenção da colônia. As operárias vivem cerca de 4 semanas e estão encarregadas da limpeza de alvéolos, alimentação das rainhas e das crias, operculação, produção de cera, construção de favos, forrageamento e defesa da colônia contra invasores (ROBINSON, 1992; TARPY & PAGE JR., 2000). A divisão de trabalho em operárias está relacionada com suas diferentes características morfológicas, fisiológicas e comportamentais, de acordo com suas idades específicas (SEELEY, 1982, 1995). A mudança nas atividades desenvolvidas pelas operárias durante a vida adulta é conhecida como polietismo etário. Existem quatro estágios comportamentais relacionados à idade entre as operárias: (I) limpeza de alvéolos, (II) cuidado com os membros da colmeia, (III) armazenamento de alimento e (IV) forrageamento (SEELEY, 1982). O primeiro estágio comportamental diz respeito às operárias recém-emergidas (0 – 2 dias), que ficam responsáveis pela limpeza dos alvéolos dos favos e da colônia como um todo, no centro do ninho. O segundo estágio refere-se às operárias (2 – 11 dias) que realizam alimentação de rainhas e larvas, assim como a operculação e desoperculação de alvéolos de cria. O terceiro estágio conta com a participação de operárias (11 – 20 dias) que estocam alimentos, realizam *grooming* das companheiras, ventilação e construção dos favos, na periferia do ninho. Já o quarto

estágio diz respeito às forrageadoras (20 + dias), cuja atividade ocorre fora do ninho (SEELEY, 1982).

A plasticidade do comportamento é um fator chave para a divisão de trabalho nas sociedades de insetos (ROBINSON, 1992). A regulação da plasticidade em abelhas *A. mellifera* tem sido explorada por estudos que relacionam a biologia do comportamento, a endocrinologia, a genética e a biologia do desenvolvimento (ROBINSON, 1992). O polietismo etário é um padrão bem consagrado na literatura, porém a idade de realização de cada tarefa específica é flexível, podendo as abelhas acelerarem, atrasarem ou reverterem esse padrão de comportamento (ROBINSON, 1992). Essa plasticidade decorre de mudanças fisiológicas nas abelhas, como resultado da influência ambiental na determinação do comportamento (ROBINSON, 1992), sendo um processo crucial na adaptação das colônias de *A. mellifera* ao ambiente.

A idade em que uma abelha inicia o processo de forrageamento está relacionada com o número de abelhas forrageiras presentes na colmeia (HUANG & ROBINSON, 1996). Em colônias contendo apenas abelhas jovens, os vôos de orientação, atividade de guarda e forrageamento iniciam-se mais cedo, sugerindo que a idade demográfica de uma colônia influencia diretamente na divisão de trabalho. Como exemplo, tem-se que em uma colmeia manipulada “*single-cohort*”, constituída por abelhas de mesma idade, observa-se que algumas operárias mantêm suas tarefas de nutriz enquanto outras passam a desempenhar papel de forrageadoras (UENO et al., 2016). A ausência de abelhas forrageadoras estimula o início do forrageamento de aproximadamente 10% das operárias da colmeia (ELEKONICH & ROBINSON, 2005).

As abelhas jovens possuem baixa quantidade de Hormônio Juvenil (HJ) e alta concentração de Vitelogenina (Vg), principal proteína dos ovos de insetos, e desempenham atividades intranidais. À medida que ocorre a transição da fase de trabalho interno para o trabalho externo (forrageamento, por exemplo), as abelhas passam a ter uma quantidade maior de HJ e os níveis de Vg diminuem (ROBINSON, 1987, NILSEN et al., 2011, WANG et al., 2012). Esse balanço entre aumento e diminuição dos títulos de HJ e Vg (Figura 1) foi postulado em bases teóricas e ajustado a um modelo matemático denominado “hipótese de duplo repressor”, que propõe que a vitelogenina e o HJ se reprimem mutuamente (AMDAM & OMHOLT, 2003). Uma propriedade intrínseca de tais circuitos de duplo repressor é que, a uma concentração crítica de qualquer componente, o sistema rapidamente muda para um novo estado. Desse modo, o processo de mudança de tarefa de uma operária torna-se rapidamente viável (AMDAM & PAGE,

2007) e pode sofrer tanto alterações decorrentes de mudanças intrínsecas quanto externas.

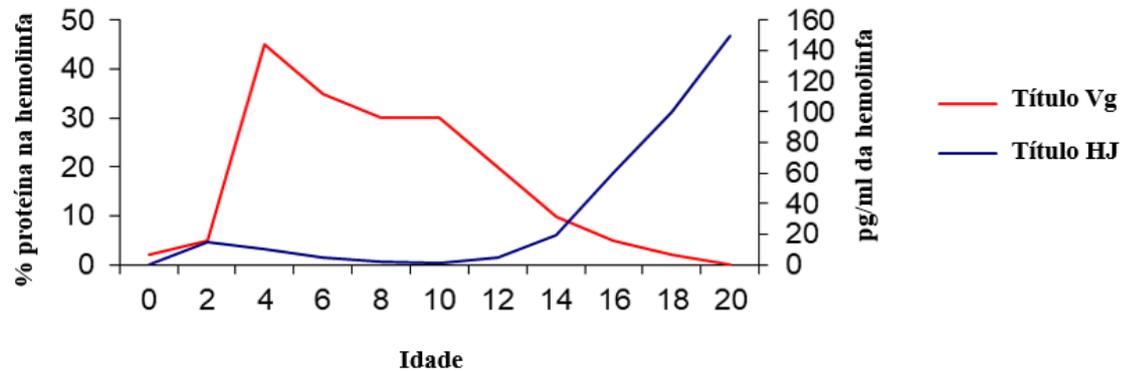


Figura 1. Títulos de Hormônio Juvenil (em azul) e Vitelogenina (em vermelho) de operárias adultas de abelhas *A. mellifera*.

Fonte: K, Hartfelder. Comunicação Pessoal.

1.2 Hormônio Juvenil: aspectos moleculares e biossíntese

O HJ, um sesquiterpenóide, ademais de regular o comportamento de operárias adultas, funciona como um importante fator regulador na embriogênese, no desenvolvimento larval e adulto, na metamorfose, reprodução, diapausa, migração, polimorfismo e metabolismo de insetos (ROE & VENKATESH, 1990; DE KORT E GRANGER, 1996; HAMMOCK, 1985). Foram descritas seis formas de HJ: HJ-I e II foram identificados em Lepidoptera e o HJ-III na maioria restante dos insetos, incluindo *A. mellifera* (Figura 2). HJ-0 e 4-metil-HJ-I parecem ser exclusivos também de Lepidoptera. Em Diptera pode ser encontrada outra forma de HJ: 6,7-epóxido-HJ-III ou JHB3 (SCHOOLEY & BAKER, 1985; BAKER et al., 1990).

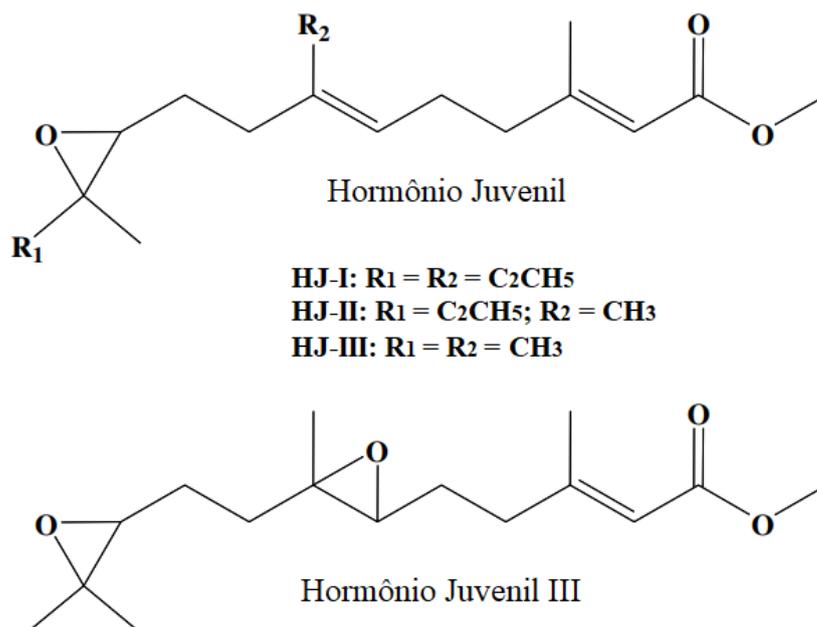


Figura 2. Estruturas do Hormônio Juvenil I, Hormônio Juvenil II e Hormônio Juvenil III, em insetos.

Fonte: Newman et al., 2005.

Por apresentar tamanha importância nos processos vitais dos insetos, a modulação dos níveis de HJ é controlada por processos de síntese, degradação e ligação a proteínas específicas na hemolinfa. A regulação da síntese de HJ tem sido considerada de suma importância para entender os mecanismos que norteiam as funções fisiológicas dos organismos, e tem crescido o número de evidências a respeito do controle estimulatório (alatrofópico) e inibitório (alatoestático) exercido pelo sistema nervoso sobre os *corpora allata* (CA) (GILBERT et al., 2000), glândulas responsáveis por sua síntese, localizadas no complexo retrocerebral de insetos.

A via de síntese do HJ (Figura 3) divide-se em duas etapas: etapa inicial, a via do mevalonato, com a formação de cinco carbonos (5C) isoprenóides unidos através da via acetato do ácido mevalônico; e a etapa final, na qual o farnesil pirofosfato (FPP) é hidrolisado pelo pirofosfato em farnesol, sendo oxidado, posteriormente, a farnesal e ácido farnesóico (FA), por meio de um álcool desidrogenase e uma aldeído desidrogenase, respectivamente (MAYORAL et al., 2009). Um dos produtos intermediários nessa via é o farnesol, um álcool sesquiterpênico natural, que é chave em alguns processos metabólicos tanto em animais quanto em vegetais e microorganismos (BELLÉS, MARTÍN & PIULACHS, 2005; FITZPATRICK et al., 2011; LINDSAY et al., 2012). Em

insetos, a maioria das sequências de genes codificadores de enzimas da via de síntese do HJ teve sua predição baseada nas sequências de vertebrados. A identidade entre as sequências destes dois grupos encontra-se entre 40-60%, para a maioria delas (BELLÉS, MARTÍN & PIULACHS, 2005).

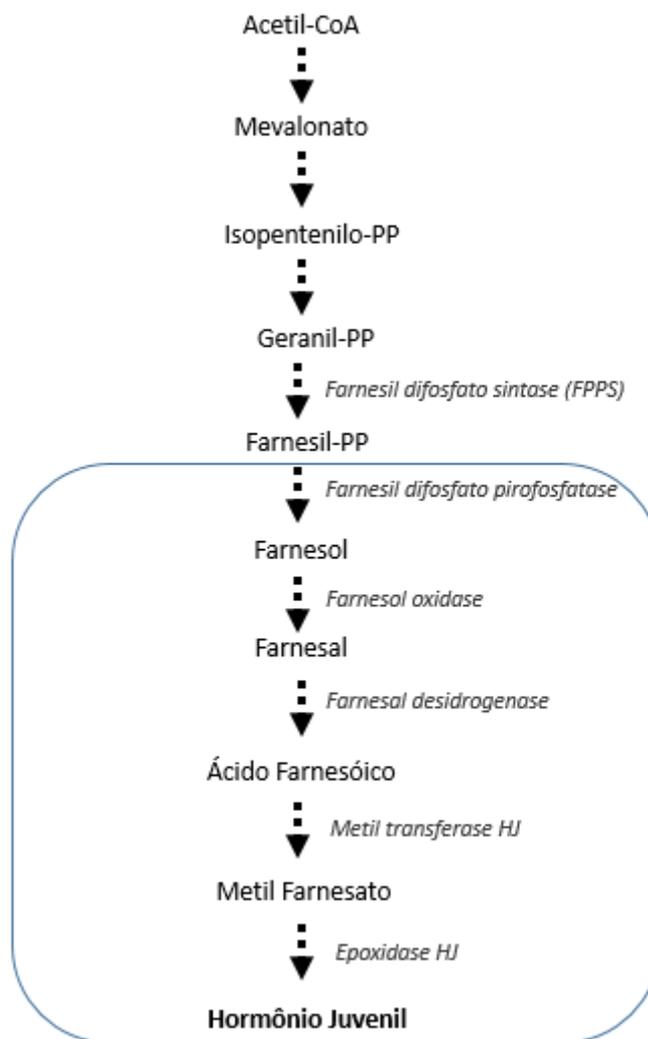


Figura 3. Via de síntese do hormônio juvenil, evidenciando os intermediários da cadeia, bem como as enzimas envolvidas no processo.

Fonte: adaptado de Bellés, Martín & Piulachs (2005).

A via de degradação do hormônio juvenil, por sua vez, é dada por meio de uma atividade hidrolítica que retira o HJ de circulação (HINTON & HAMMOCK, 2001). Aqui, há a participação de duas enzimas: (I) a esterase do HJ (JHE), membro da família das carboxiesterases e (II) a epóxido hidrolase do HJ (JHEH), membro da família das

hidrolases. A JHE encontra-se na hemolinfa e nos tecidos, e sua ação catabólica produz HJ-ácido, enquanto que a JHEH está relacionada a tecidos específicos e à fração microsomal, sendo o HJ-diol resultado da ação catabólica dessa enzima (DE KORT & GRANGER, 1996). Em *Manduca sexta*, outra enzima foi descrita, a JH-diol kinase (JHDK), com a função de converter HJ-diol em HJ-diol-fosfato, um composto inativo (MAXWELL et al., 2002a; 2002b).

Na maioria dos lepidópteros estudados, a JHE é sintetizada pelo corpo gorduroso e liberada para a hemolinfa, onde hidrolisa o grupo éster do HJ (WEIRICH et al., 1973). Proteínas que se ligam ao HJ influenciam na ação das enzimas JHE (TOUHARA & PRESTWICH, 1994); podem prevenir uma ação inespecífica do HJ concomitante com uma circulação uniforme do hormônio pelo corpo do inseto (GILBERT et al., 2000). Em insetos foram identificados três tipos de proteínas de ligação ao HJ. Kramer et al. (1976) identificaram a primeira proteína, em *M. sexta*, denominada JHBP (Juveline hormone binding protein). A segunda é uma lipoforina, identificada na hemolinfa de *Leptinotarsa decemlineata* e mais tarde também identificada em *Periplaneta americana* e *Locusta migratoria* (DE KORT & KOOPMANSCHAP, 1986, 1987, 1989). A terceira é uma proteína hexamérica encontrada em *L. migratoria* identificada por Koopmanchap e de Kort (1988).

1.3 Motivação e hipótese

As abelhas *A. mellifera* têm o hábito de coletar resinas vegetais para a elaboração da própolis, que, no ninho, é empregada para uma série de funções, como a vedação de frestas, mumificação de corpos estranhos e para a sanidade em geral da colônia, uma vez que tais resinas apresentam uma série de atividades bactericidas e fungicidas (KUROPATNICKI, SZLISZKA & KROL, 2013). Uma das plantas mais importantes como origem das resinas vegetais da própolis do sul de Minas Gerais, a *Baccharis dracunculifolia*, apresentou em suas resinas o farnesol (ALENCAR et al., 2005), como mencionado, importante precursor na via de síntese do HJ. A análise da própolis verde (a mais comum no sul mineiro e uma das mais importantes do Brasil) também revelou a presença do farnesol (TEIXEIRA et al., 2005). Considerando que o farnesol é um precursor importante na via de síntese do HJ; considerando ainda que ao coletar as resinas

vegetais, as abelhas podem entrar em contato com o farnesol, e que, sendo ele lipossolúvel, este contato pode fazer com que o farnesol ingresse à hemolinfa da abelha; e considerando o papel do HJ em vários processos vitais das abelhas, *hipotetizamos que, durante o forrageamento, as operárias entram em contato com quantidades significativas de precursores de HJ que, uma vez dentro do corpo, podem ser modificados e convertidos em HJ. Esta interferência com a via de síntese endógena de HJ pode promover alterações fisiológicas e comportamentais nas abelhas forrageiras.*

Os eventuais resultados de experimentos que testarão esta hipótese serão importantes para a compreensão dos mecanismos que norteiam aspectos relacionados à biologia de insetos sociais, quanto à socialidade destes invertebrados, sua interação com o meio, e suas respostas fisiológicas a agentes exógenos. Determinar a eventual influência de compostos naturais de plantas na fisiologia de abelhas é um problema bem atual, com implicações agrícolas, biológicas, econômicas e sociais. Este Projeto representa, ainda, a possibilidade de testar um modelo de influência ambiental sobre aspectos fisiológicos de organismos animais e seus resultados poderão ser utilizados na discussão de fenômenos equivalentes em seres humanos.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo seguem descritos abaixo.

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho visa analisar a influência de farnesol exógeno sobre a biologia de operárias adultas de *A. mellifera*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer o protocolo de criação de abelhas adultas em confinamento e adquirir habilidades na dissecção de *corpora allata*.
- b) Determinar a resposta transcricional de genes codificadores de enzimas da via de síntese de HJ após tratamento com farnesol.
- c) Identificar padrões de comportamento de operárias adultas em cativeiro associados à exposição de farnesol exógeno.
- d) Avaliar a influência do farnesol exógeno sobre características morfométricas de *corpora allata* de abelhas adultas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos empregados no presente trabalho encontram-se descritos abaixo.

3.1 Visão Geral

O experimento consistiu na suplementação alimentar de um grupo de abelhas (*A. mellifera*) africanizadas com Farnesol 1% e outro com seu veículo. Seguidamente, foram realizadas análises comportamentais, extrações de RNA total dos *corpora allata* e síntese de cDNA destas abelhas, com o objetivo de avaliar eventuais alterações nos níveis de transcritos de genes que codificam para produtos proteicos integrantes da via de síntese do HJ. Posteriormente, foram quantificados os níveis de transcritos dos genes: *metil farnesoato epoxidase (mfe)*; *metil transferase (mt) do hormônio juvenil*; *esterase do hormônio juvenil (jhe)* e *farnesil difosfato sintase (fpps3)* (ver Figura 3) nos dois grupos de abelhas. Desde que a disponibilidade de substrato nas últimas etapas da via de síntese de HJ regula a taxa de produção do hormônio (Santos, 2008), isto dar-nos-ia informação indireta sobre eventuais alterações metabólicas induzidas pelo farnesol exógeno. Além disso, mensuramos a área e volume dos CA de abelhas, tanto do grupo controle como do grupo tratado com farnesol, bem como a área e o diâmetro dos núcleos de cada célula de CA.

Todas as etapas foram realizadas no LABAInt (Laboratório de Biologia Animal Integrativa) da Universidade Federal de Alfenas, com exceção da obtenção de abelhas, que foi feita no Apiário Experimental do Grupo de Pesquisa Biologia da Socialidade, localizado às margens da Rodovia BR-491, na Fazenda da Lagoa, Alfenas – MG.

3.2 Manutenção do Apiário Experimental

Como parte integrante deste projeto, coube a realização de treinamento apícola,

para coleta de amostras e manutenção das colmeias do Apiário Experimental do Grupo de Pesquisa Biologia da Socialidade, da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL – MG. Entre as atividades desenvolvidas estiveram: (I) manuseio e transporte de colmeias (Figura 4); (II) identificação de diferentes castas existentes (operárias, rainhas e zangões); (III) identificação de diferentes estágios pupais e adulto-farato de abelhas africanizadas *A. mellifera*, especificamente a fase Pbd, que precede à emergência das abelhas adultas, para controle de taxa de emergência desses insetos; (IV) escolha de quadro adequado, contendo material biológico de interesse, para a coleta de operárias recém-emergidas; e (V) suplementação alimentar com xarope, composto por 50% água e 50% de açúcar cristalizado, para manutenção das populações de abelhas em épocas da escassez de recursos (WOLF, 2007).



Figura 4. Colmeia do Apiário Experimental da UNIFAL–MG usada em nosso estudo. A) Vista posterior; B) Quadros.

Fonte: Do Autor.

3.3 Tratamentos das abelhas, avaliação comportamental e dissecação de CA

Para a coleta de amostras biológicas, escolhia-se um quadro, de determinada colônia, que possuía em seus alvéolos crias de adulto-farato operculadas e crias emergindo. O quadro, então, foi colocado em uma estufa, a temperatura de 36° e 80% de umidade, até chegar a 100, o número de abelhas recém-emergidas. Estas abelhas foram divididas em 2 grupos em caixas de observação, 50 abelhas em cada grupo: (1)

alimentação suplementada com Farnesol (Sigma Aldrich; catálogo: F203-5g; lote: MKBG0101V) e (2) alimentação sem Farnesol (controle). Para a preparação da dieta suplementada com Farnesol (1), 1 μL de Farnesol (500 μg) foi diluído em 999 μL de óleo de canola (PURILEV $\text{\textcircled{R}}$), obtendo a concentração 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, com a concentração de farnesol no alimento sendo igual a 0,001 μL . Desta solução, 10 μL foram adicionados no alimento, composto por mel, açúcar e água. Quanto à dieta sem Farnesol, 10 μL de óleo de canola foram misturados no alimento (caixa controle). As abelhas, dentro de suas caixas de observação, foram mantidas em estufa por 72 horas, a 36°C, temperatura de uma colmeia (TAUTZ et al., 2003; JONES & OLDROYD, 2007) (Figura 5). Houve troca de alimento de 24 em 24 horas, tendo as mesmas concentrações e condições de alimentação citadas acima.

Durante as 72 h de cada experimento, as abelhas foram observadas a cada 8 horas para a identificação de qualquer alteração comportamental. Após esse período, os *corpora allata* das operárias foram dissecados, com auxílio de finas pinças cirúrgicas, alfinetes, Placa de Petri contendo parafina e lupa. As amostras, cerca de 30 pares de *corpora allata* por tratamento, foram inseridas em microtubos de 1,5 μL com 30 μL de solução salina (NaCl 0,9%) com dietil pirocarbonato (DEPC) esterilizada. Em seguida, foram adicionados 500 μL do reagente TRIzol $\text{\textcircled{R}}$ (Invitrogen); as amostras foram congeladas em freezer (-80°C) até o momento da extração do RNA total.

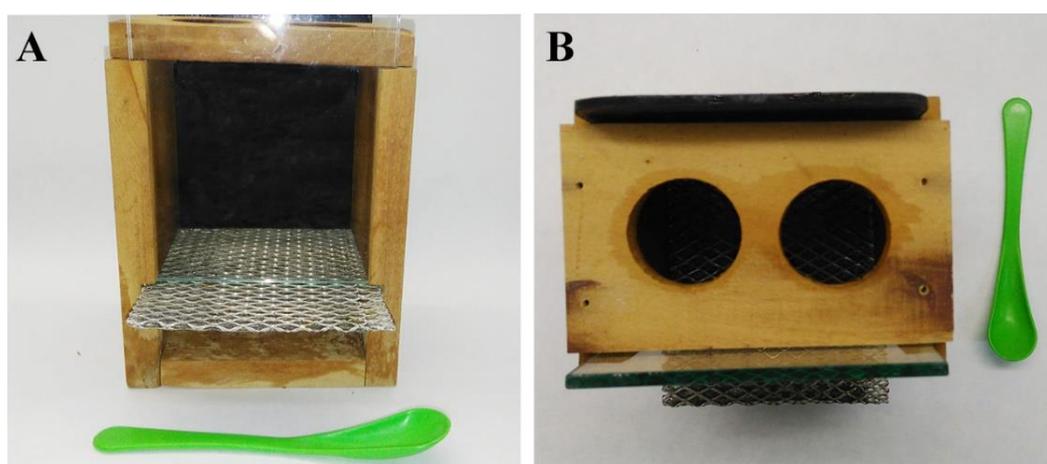


Figura 5. Caixa de observação para abelhas *A. mellifera*. A) vista frontal; B) vista área. A colher em verde possui 15 cm; o local de confinamento possui volume igual a 800 cm^3

Fonte: Do autor.

3.4 Determinação de perfis de transcrição gênica por RT-Qpcr

3.4.1 Extração de RNA total

O RNA total dos CA das abelhas operárias foi extraído utilizando o reagente TRIzol®, obedecendo o protocolo do fabricante (Invitrogen), descrito a seguir. Após o descongelamento em temperatura ambiente, as amostras foram manualmente homogeneizadas e o volume total do reagente foi completado para 1000 µL. O material ficou em temperatura ambiente por cinco minutos, em seguida foram adicionados 200 µL de Clorofórmio e as amostras foram agitadas por cerca de 15 segundos. Após serem deixadas em temperatura ambiente por 3 minutos, houve centrifugação das amostras a 12000 g, por 15 minutos a 4°C. Finalizada a centrifugação, em cada tubo formaram-se três fases: uma com coloração avermelhada (proteína), outra aquosa (RNA) e uma fase intermediária. A fase aquosa foi transferida para novos tubos de 2 mL. Para aumentar a eficiência na precipitação do RNA total, foram utilizados 10 µg de glicogênio em cada amostra, como sugerido pelo fabricante (Invitrogen). Em seguida, foram adicionados 500 µL de Álcool Isopropílico, as amostras foram agitadas por inversão e deixadas *Over Night* a 20°C. Depois da precipitação, as amostras foram descongeladas em gelo e centrifugadas a 12000 g, por 10 minutos a 4°C. Em sequência pode-se observar o RNA precipitado (*pellet*). O sobrenadante foi removido e o RNA lavado com 1 mL de Etanol 75%, por duas vezes. Após a segunda lavagem, o material foi centrifugado a 7500 g, por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o microtubo contendo o RNA foi colocado, com a tampa aberta, em Termobloco, por 10 minutos a 55°C, para a secagem do mesmo. O RNA foi redissolvido em 20 µL de água DEPC. Desta solução, utilizou-se 1,5 µL para a quantificação de RNA total em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) em comprimento de onda igual a 260 nm correspondente a 40 µg/ml sendo observada a razão entre as leituras de 260 e 280 nm, os quais devem estar dentro do intervalo de 1.9 e 2.0, indicando que o RNA é puro (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Posteriormente foi determinado o volume da solução de RNA total usado para iniciar a síntese de cDNA com 1 µg de RNA total; esse volume foi colocado em um microtubo para PCR (200 µL) e concentrado em centrífua à vácuo (Centrivap Concentrator, LABCONCO), a 35° por aproximadamente 7 minutos. Após isto, cada

amostra de RNA recebeu 1 μL de DNase livre de RNase (Promega; lote: 25308630) e 1 μL de Buffer (Promega; lote: 27464610). As amostras foram deixadas em banho maria, por 30 minutos a 37°C. Seguidamente, foi adicionado 1 μL de DNase Stop Solution (Promega; lote: 29051002) em cada amostra, e estas foram incubadas em termobloco, por 10 minutos a 65°C; os microtubos foram devidamente nomeados e reservados em -20° até o processo de síntese de cDNA.

3.4.2 Síntese de cDNA e ensaios de PCR para quantificação de níveis de transcritos

Para a síntese de cDNA, foram inseridos 1 μL de Oligo dT (*Integrated DNA Technologies*; catálogo: 91425090; lote: 52079371) e 1 μL de água DEPC em cada microtubo de 200 μL reservado, da etapa anterior, totalizando 5 μL . As amostras foram aquecidas no Termociclador (*Applied Biosystems*, Veriti 96 well – Thermal Cycler) por 5 minutos, a 70°C. Após isto, as amostras foram centrifugadas por cerca de 10 segundos, em uma minicentrífuga, e depois foram deixadas em gelo até a solução da transcriptase reversa estar pronta. Para isto, em um outro microtubo foram colocados 4 μL de Buffer 5x (Promega; catálogo: A500C; lote: 0000011619), 3 μL de MgCl_2 (Promega; catálogo: A351H; lote: 0000072386), 1 μL de Inibidor de Ribonuclease Recombinante (*Applied Biosystems*; catálogo: N808-0119; lote: P11862), 1 μL de DNTP mix (Promega; catálogo: ED-13-12122; lote: 1003-2), 1 μL de *Transcriptase Reverse* (Promega; catálogo: A501C; lote: 0000063510) e 5 μL de água DEPC. O conteúdo da reação com transcriptase reversa foi colocado no primeiro tubo, contendo o RNA. As amostras foram incubadas em termociclador, por 5 minutos a 25°C, para anelamento. A extensão da reação deu-se durante 50 minutos, a 42°C. A obtenção de cDNA deu-se após as amostras terem ficado por 15 minutos no termociclador a 70°C, para que ocorresse a inativação da reação.

As sequências dos *primers* foram obtidas por meio do trabalho de Bomtorim e colaboradores (2014). Com as sequências dos iniciadores já desenhadas, nossos *primers* (Tabela 1) foram adquiridos da *Integrated DNA Technologies* - IDT®. Antes de diluirmos os *primers*, estes foram centrifugados a 1500 g, por 2 minutos a 22°C para precipitação do conteúdo em pó, contido em cada microtubo com seu respectivo *primer*. Após isto, foram calculadas as quantidades de água de injeção– Q necessárias para as diluições de

cada primer para gerar uma solução stock de 100 μM . Posteriormente, as soluções foram agitadas em vórtex e submetidas a um “spin”. Para a elaboração da solução de uso (10 μM), 10 μL da solução mãe de cada primer foram colocados em microtubos de 1,5 mL contendo 90 μL de água de injeção.

Para os ensaios de PCR semiquantitativa, em cada microtubo para PCR (200 μL) foram adicionados 12,5 μL do reagente PCR Super Mix (Invitrogen; catálogo: 10572; lote: ENBB1), 9,5 μL de água DEPC, 1 μL do primer R, 1 μL do primer F e 1 μL de cDNA. As amostras foram colocadas em termociclador durante 40 ciclos, por cerca de uma hora e quarenta e cinco minutos. Para a elaboração do gel de agarose, em um béquer foram inseridos 1,5 gramas de agarose e 100 mL de Tampão SB (100 mM de tetraborato de sódio decahidratado diluído em 1000 mL de água destilada, com pH de 8,0). Essa solução era levada ao microondas e aquecida até completa homogeneização. A solução era esfriada em água corrente e colocada na cuba eletroforética até solidificar (gel de agarose).

Em cada microtubo obtido na PCR convencional (com produto de amplificação) foram adicionados 0,5 μL de SYBR Green I (Sigma. Lote: 090M1158) diluído em TBE, e 0,5 μL de Azul de Bromofenol. Em um outro microtubo para PCR foram inseridos 24 μL de TBE (1x), 1 μL de Ladder, 0,5 μL de SYBR Green I e 0,5 μL de Azul de Bromofenol, para correr o marcador de tamanho molecular (Ladder de 100 pb; Invitrogen; lote: 1000361), o qual permite uma estimativa visual do tamanho dos fragmentos de DNA obtidos por amplificação, durante a eletroforese. Seguidamente, as amostras foram inseridas nos poços do gel e corridas por 90 minutos, em 100V, 180 mA e 146W. Decorrido este tempo, o gel foi retirado da cuba eletroforética e colocado em Transiluminador (Bio America, *Bio – Imaging Systems*), para observação do padrão de bandas.

Tabela 1. Primers forward (F) e reverse (R) utilizados nos experimentos da sqPCR e qPCR. T° = temperatura.

Nome do primer	Sequência		Amplicon (pb)	T°
	Primer F	Primer R		
<i>fpps3</i>	5' - GGAAGACGAAGATCAATATCAC - 3'	5' - CATGCGACGAAATCAACCAAC - 3'	175	60
<i>mt</i>	5' - CCTTCACTGGTGCCAAAAC - 3'	5' - TGGCCTATATCGAGGATTCG - 3'	140	60
<i>jhe</i>	5' - GTTATCGCTTCTGATATGGCT - 3'	5' - GATGGGAAATAGGTACCGAC - 3'	121	60
<i>mfe</i>	5' - GGAATCATTTCTTGGGAGA - 3'	5' - GTTATGCGCGCTATGGAAAT - 3'	145	60
<i>actina</i>	5' - TGCCAACACTGTCTTTCTG - 3'	5' - AGAATTGACCCACCAATCCA - 3'	156	60

As análises definitivas dos níveis de transcrição dos genes *mfe*, *mt*, *jhe* e *fpps3* foram realizadas por meio de qPCR em Tempo Real utilizando-se SYBR® Green PCR Master Mix 2x (*Applied Biosystems*TM; catálogo: 4367659; lote: 1605525) no sistema 7500 Real Time PCR (*Applied Biosystems*TM). Ambos os tratamentos, grupo controle e grupo farnesol, tiveram suas amostras de cDNA de *pools* de *corpora allata* de operárias com três dias de idade analisadas. De cada tratamento foram analisadas 3 amostras biológicas em triplicata técnica (3 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas). Os níveis de transcrição do gene *actina* foram usados como referências endógenas. Os primers foram os mesmos que os utilizados nas RT-sqPCR (Tabela 1). As condições de reação foram as seguintes: em cada poço foram colocados 7,4 µL de água MilliQ estéril, 10 µL de SYBR® Green Real Time PCR Master Mix (*Applied Biosystems*TM, catálogo: 4367659; lote: 1605525), 0,8 µL de primer-F (10 µM), 0,8 µL de primer-R (10 µM) e 1 µL do cDNA da amostra do cérebro, totalizando 20 µL. A reação foi programada com os seguintes ciclos: 1 ciclo de 2 minutos a 50 °C, 1 ciclo de 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C e um ciclo final de 15 segundos a 95 °C.

3.5 Histologia com historesina

3.5.1 Dissecção e fixação dos tecidos

Oito pares de *corpora allata* de abelhas operárias com 72 h de vida, de cada tratamento (controle e farnesol), foram dissecados em água DEPC salina (NaCl 0,9%) esterilizada e fixados em solução de paraformaldeído 4%, por 24 horas. Após isto, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o paraformaldeído foi descartado e o material foi lavado três vezes com tampão fosfato de sódio (PBS) 1x. A etapa seguinte correspondeu à desidratação do material feito em série etanólica: os CA foram lavados com álcool a concentrações de 70%, 90% e 95%; cada troca de álcool ocorreu de 15 em 15 minutos e duas vezes a cada gradação.

3.5.2 Preparo de historesina

Após a desidratação seriada, os CA foram incubados em solução de pré-infiltração (1:1 álcool 95% e solução de infiltração) por 15 minutos. Com auxílio de uma pipeta Pasteur, a solução de pré-infiltração foi retirada e o material foi incubado com solução de infiltração, *overnight*. No dia seguinte, o material foi transferido para histomoldes, onde foram adicionados 400 µL de resina e 30 µL de polimerizador. O material foi colocado em uma estufa, livre de umidade, até completa polimerização.

Os CA incluídos em resina foram fixados em blocos de madeira para que fosse possível realizar cortes em micrótomo (Leica RM 2135). Os cortes foram seriados (4 µm) e feitos com uma navalha de vidro. As lâminas foram lavadas com detergente e álcool para que qualquer impureza fosse retirada. Padronizou-se colocar 6 cortes por lâmina. Depois, com os cortes já posicionados, as lâminas ficaram em estufa a 50°C por 2 horas, para que assim o corte tivesse maior adesão e fossem evitados enrugamentos.

3.5.3 Coloração de lâminas

Os cortes foram corados com azul de metileno. Para isto, foram preparados 110 mL de solução de azul de metileno [24 mL de azul de metileno (0,32 g de azul de metileno em 250 mL de água), 42 mL de borato de sódio (2,5 g de borato de sódio ou borax ou tetraborato de sódio em 250 mL de água, pH 9,5), e 30 mL de etanol absoluto] com 15 mL de fucsina básica (0,32 g de fucsina básica em 250 mL de água). As lâminas foram colocadas em uma rack para coloração contendo 110 mL de azul de metileno, e deixadas por 5 minutos, a temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com água corrente até a retirada do excesso de corante, e pós isto foram colocadas em estufa, a 40°C, por 3 horas. Após isto, 4 gotas de Enthellan foram colocadas sobre as lâminas e depois estas foram cobertas com lamínulas. As lâminas prontas foram deixadas em estufa, a 40°C, por 16 horas.

Depois de concluir todas estas etapas, as lâminas montadas com os cortes foram analisadas com o auxílio do microscópio Zeiss Axioscope A1 (Departamento de Patologia da UNIFAL-MG). Os cortes de CA foram examinados e as imagens capturadas por meio

do software Zeiss Axio Vision (magnificações de 10x, 20x e 40x, escala de 50 μm). Em seguida, utilizou-se o software ImageJ versão 1.49 para obter as áreas do CA de cada corte, de cada lâmina. Para medir o volume dos CA, foram somadas as áreas de cada corte, de cada CA, e multiplicadas pela espessura do corte (4 μm).

3.6 Citoquímica com DAPI

Oito pares de *corpora allata* de abelhas operárias *A. mellifera* com 72 h de vida, de cada tratamento (controle e farnesol), foram dissecados em solução PBS 1X e fixados em 1:1 N-Heptano/formaldeído 37%, por 24 horas, a 4°C. Os CA fixados foram lavados duas vezes, por 5 minutos, com PBST 0,5% (10 mL de PBS acrescido de 50 μL de Triton X-100) e incubados por 4 minutos com a solução contendo DAPI 1:2000 (Invitrogen; catálogo: D1306; lote: 1220644). Após a incubação, o material foi lavado três vezes, por 10 minutos cada lavagem, e as lâminas foram montadas com glicerol 80% (Sigma, Aldrich; catálogo: 1002056059; lote: 5HBG1754V). Após isto, as lâminas foram analisadas em um microscópio confocal (Confocal Nikon C2), com aumento óptico de 20x; e mensurados os tamanhos dos diâmetros e áreas dos CA e de seus núcleos.

3.7 Análise Estatística

As análises dos níveis de transcritos, feitas de acordo com a metodologia de $\Delta\Delta\text{Ct}$ comparativo (LIVAK, K.J & SCHMITTGEN, T.D.; PFAFFL, M.W., 2001), e os resultados obtidos nas análises de morfometria (histologia com historesina e citoquímica) foram analisados no software *GraphPad Prism* versão 5.0, utilizando um nível de significância para a rejeição da hipótese fixado em 95% ($p < 0,05$, teste *t*).

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos, após análise estatística dos dados coletados durante a execução do presente trabalho, são apresentados a seguir.

4.1 Padronização da concentração de farnesol e estudo comportamental

Para se determinar qual era a melhor concentração de farnesol no alimento fornecido às abelhas, foram testadas várias concentrações até chegar a 0,1 μg de farnesol por abelha. Primeiro, testamos a influência de 53 μL de farnesol 95% em 1 g de alimento, contendo mel e açúcar. Isto fornecia um total de 500 μg de farnesol por abelha, com um número de abelhas igual a 50. Para isto, 50 abelhas foram confinadas em uma caixa e receberam alimento contendo mel, açúcar e 53 μL do reagente farnesol, enquanto em outra caixa 50 abelhas receberam alimento contendo apenas mel, açúcar e 53 μL de óleo de canola. Após 18 h de tratamento observamos a mortalidade de 46 abelhas no grupo suplementado com farnesol, e nenhuma morte no grupo controle. As quatro abelhas vivas realizavam movimentos agitados dentro da caixa e batiam rapidamente suas asas, enquanto as 50 abelhas controle estavam aglutinadas em uma área da caixa, em formato de “cacho de uva”. 28 h após o início do tratamento, apenas uma abelha estava viva no grupo farnesol, enquanto no grupo controle, todas as abelhas estavam vivas e movimentavam-se pela caixa (Figura 6). Em ambos os tratamentos, houve consumo tanto de água quanto de alimento. Essa diferença entre as taxas de mortalidade de abelhas nos dois grupos possibilitou concluir que 53 μL de farnesol apresentam-se tóxicos às abelhas.

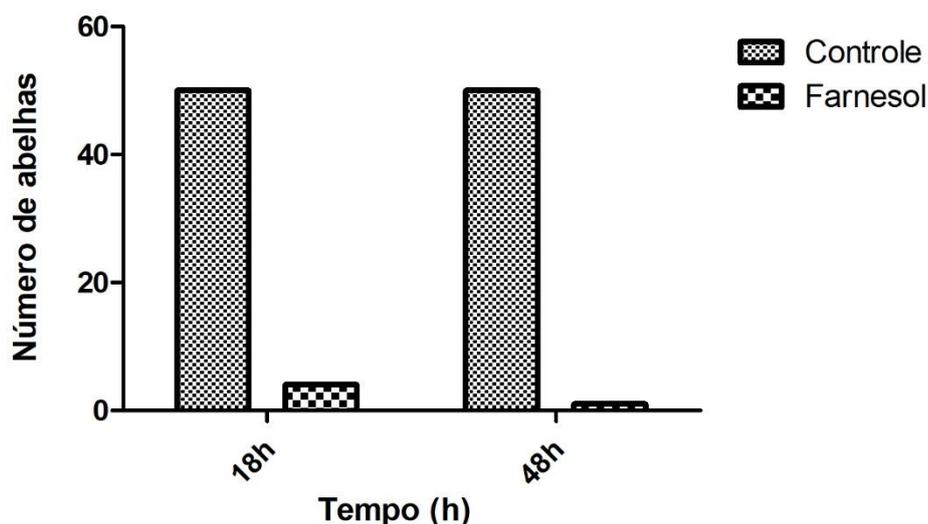


Figura 6. Mortalidade de abelhas operárias *A. mellifera* após 18 h e 28 h do início do experimento em um tratamento com 53 μL de farnesol em 1 g de alimento, contendo mel e açúcar e sem a dose de farnesol. As colunas maiores correspondem à sobrevivência de 100% das abelhas do grupo controle. As colunas em quadriculado representam a sobrevivência de abelhas alimentadas com farnesol, sendo em 18 h igual a 4 abelhas vivas e 48 h apenas uma abelha viva.

Fonte: Do autor.

Com a finalidade de diminuirmos o número de mortes no grupo tratado, diminuimos a concentração do farnesol em 1 g de alimento. Aqui, o experimento foi condicionado com 0,1 μg de farnesol por abelha/dia. Para isto, 1 μL de farnesol foi diluído em 999 μL de óleo de canola. Desta solução, 10 μl foram colocados em 1 g de alimento, contendo mel e açúcar; o grupo controle recebeu 10 μL de óleo de canola em 1 g de alimento/dia. Os alimentos e água foram trocados de 24 em 24 h, durante três dias, nas duas caixas que continham 50 abelhas operárias. Esse experimento foi condicionado três vezes, devido ao grupo trabalhar com triplicata biológica. Ao longo dos experimentos, foi possível observar que as abelhas que receberam alimento com farnesol apresentavam movimentos mais agitados em relação às do grupo controle (Figura 7), e algumas, ainda, tentavam voar dentro do confinamento (comportamento não observado no grupo controle). Essa diferença comportamental foi mais evidente no segundo dia do experimento, decorridas 48 h; no terceiro dia de confinamento, as abelhas controle e farnesol realizavam movimentos similares dentro dos seus confinadores. Após 72 h, as

abelhas foram retiradas do confinamento, anestesiadas em gelo e tiveram seus pares de *corpora allata* dissecados (Figura 8) e armazenados a -80°C até o processo de extração de RNA total, seguido por síntese de cDNA e PCRs semiquantitativa e quantitativa. Durante os experimentos foram observadas poucas mortes ou nenhuma, tanto no grupo tratado quanto no grupo controle. Assim, constatou-se que $0.1\ \mu\text{g}$ de farnesol podia ser uma quantidade apropriada para os ensaios.



Figura 7. Efeito do farnesol exógeno sobre o comportamento de abelhas operárias de 3 dias (caixas de confinamento). A) Comportamento de abelhas operárias após 48 h de início do tratamento; 1 g de alimento composto por açúcar, mel e óleo de canola. B) Comportamento de abelhas após 48 h de início do tratamento; 1 g de alimento composto por mel, açúcar e farnesol diluído em óleo de canola.

Fonte: Do autor.



Figura 8. *Corpora allata* de operárias *A. mellifera*.

Fonte: Do autor.

4.2 Análise da expressão gênica por RT-PCR e eletroforese em géis de agarose

Para determinar os níveis de transcrição dos genes *mfe*, *mt*, *jhe* e *fpps3* em CA de operárias *A. mellifera* com 72 h de idade, tanto para animais controle quanto tratados, testamos os respectivos *primers* mediante PCR convencional, com a temperatura de anelamento igual a 60°C e visualizamos os resultados após eletroforese em géis de agarose. A figura 9 mostra em sua primeira coluna o marcador de peso molecular e um padrão claro e único de bandas para o gene *mt*, tendo o tamanho do *amplicon* igual a 140 pb; o mesmo padrão de bandas, para as amostras analisadas, foi obtido para os genes *mfe* (145 pb) e *jhe* (121 pb) (Figuras 10 e 11, respectivamente). Em contrapartida, na figura 12, não observamos bandas para as amostras biológicas analisadas, em relação ao gene *fpps*; apenas uma banda referente ao gene constitutivo - *actina*. Este resultado mostra-nos que não há expressão deste gene (ou ela é indetectável por sqRT-PCR), da via do mevalonato, em pares de glândulas localizadas no trato retrocerebral de abelhas operárias *A. mellifera* de 72 h de vida.

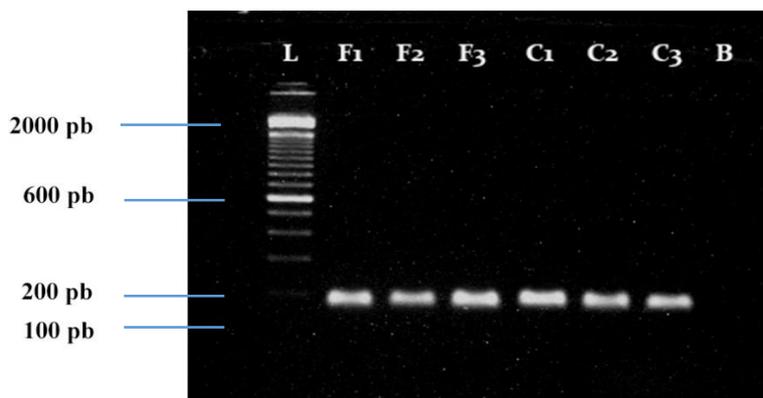


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de amplificação (40 ciclos) de fragmentos de cDNA de *mt* sintetizado a partir de RNA total de CA de operárias. L – Ladder; F1-F3 – *primer mt* para amostras 1, 2 e 3 de *corpora allata* com farnesol; C1-C3 - *primer mt* para amostras 1, 2 e 3 de *corpora allata* sem farnesol; B - solução controle contendo PCR Master Mix, água DEPC, *primer R* de *mt* e *primer F* de *mt*, sem cDNA. Número de ciclos igual a 40; Tempo de corrida igual a 90 minutos; Temperatura de anelamento igual a 60°C; Tempo de exposição da foto igual a 8.68 segundos; ganho igual a 2; ScanMode Fast; Brilho igual a zero; Quantidade de material colocado em cada poço igual a 21µl (amostras com 0.5µl SYBR Green I e 0.5µl Azul de bromofenol).

Fonte: Do autor.

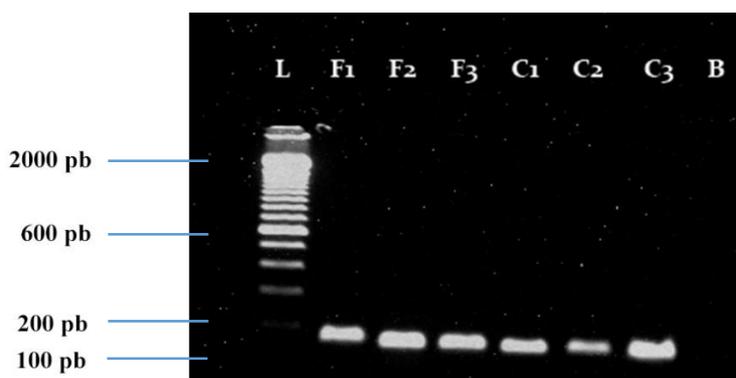


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de amplificação (40 ciclos) de fragmentos de cDNA de *mfe* sintetizado a partir de RNA total de CA de operárias. L – Ladder; F1-F3 – *primer mfe* para amostras 1, 2 e 3 de *corpora allata* com farnesol; C1-C3 - *primer mfe* para amostras 1, 2 e 3 de *corpora allata* sem farnesol; B - solução controle contendo PCR Master Mix, água DEPC, *primer R* de *mfe* e *primer F* de *mfe*, sem cDNA. Número de ciclos

igual a 40; Tempo de corrida igual a 90 minutos; Temperatura de anelamento igual a 60°C; Tempo de exposição da foto igual a 7.16 segundos; ganho igual a 1; ScanMode Fast; Brilho igual a zero; Quantidade de material colocado em cada poço igual a 21µl (amostras com 0.5µl SYBR Green I e 0.5µl Azul de bromofenol).

Fonte: Do autor

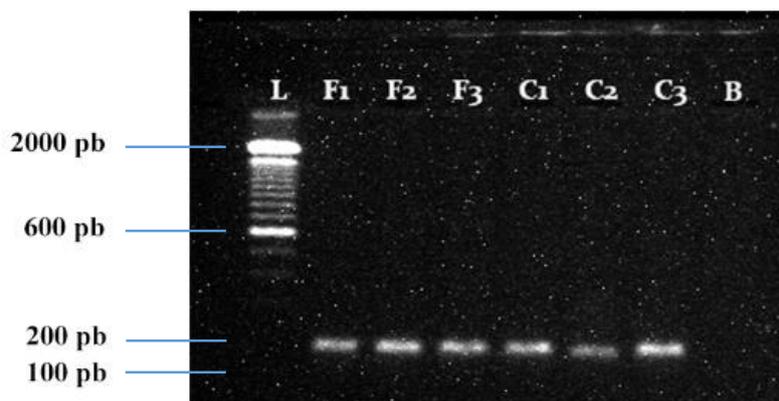


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de amplificação (40 ciclos) de fragmentos de cDNA de *jhe* sintetizado a partir de RNA total de CA de operárias. L – Ladder; F1-F3 – *primer jhe* para amostras 1, 2 e 3 de *corporata allata* com farnesol; C1-C3 - *primer jhe* para amostras 1, 2 e 3 de *corporata allata* sem farnesol; B - solução controle contendo PCR Master Mix, água DEPC, *primer R* de *jhe* e *primer F* de *jhe*, sem cDNA. Número de ciclos igual a 40; Tempo de corrida igual a 90 minutos; Temperatura de anelamento igual a 60°C; Tempo de exposição da foto igual a 9.28 segundos; ganho igual a 2; ScanMode Fast; Brilho igual a 1; Quantidade de material colocado em cada poço igual a 21µl (amostras com 0.5µl SYBR Green I e 0.5µl Azul de bromofenol).

Fonte: Do autor.

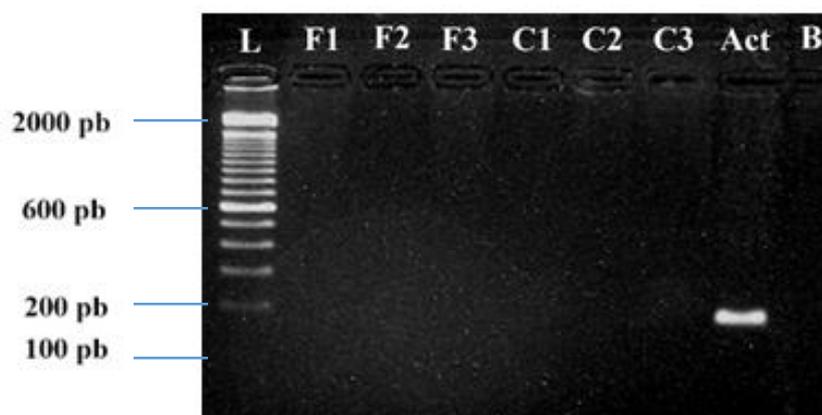


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de amplificação (40 ciclos) de fragmentos de cDNA de *fpps3* sintetizado a partir de RNA total de CA de operárias jovens. L – Ladder; F1-F3 – *primer fpps3* para amostras 1, 2 e 3 de *corpora allata* com farnesol; C1-C3 - *primer fpps3* para amostras 1, 2 e 3 de *corpora allata* sem farnesol; B - solução controle contendo PCR Master Mix, água DEPC, *primer R* de *fpps3* e *primer F* de *fpps3*, sem cDNA. Número de ciclos igual a 40; Tempo de corrida igual a 90 minutos; Temperatura de anelamento igual a 60°C; Tempo de exposição da foto igual a 7.16 segundos; ganho igual a 2; ScanMode Fast; Brilho igual a 1; Quantidade de material colocado em cada poço igual a 21µl (amostras com 0.5µl SYBR Green I e 0.5µl Azul de bromofenol).

Fonte: Do autor.

Para constatar a não expressão do gene *fpps3* em *corpora allata*, realizamos uma segunda reação em cadeia da polimerase, agora com temperaturas de anelamento a 56° e 58° (Figura 13) com as mesmas amostras, dos grupos controle e tratado, utilizadas nos experimentos anteriores. Após a análise da eletroforese mediante transiluminador, pudemos observar que não houve detecção de transcrição do gene de interesse em ambas as temperaturas, de 56° e 58°C. O gene constitutivo, de referência, teve sua expressão apenas em 58°C (Figura 13).

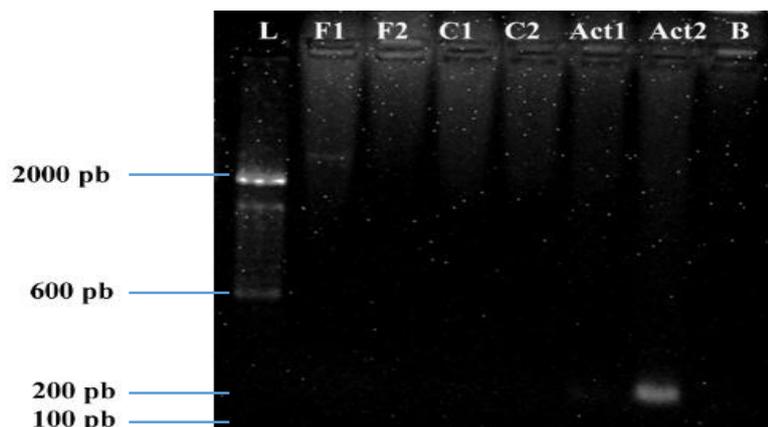


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de amplificação (40 ciclos) de fragmentos de cDNA de *fpps3* e *actina* sintetizados a partir de RNA total de CA de operárias jovens. L – Ladder; F1 – *primer fpps3*, com temperatura de anelamento igual a 56°C, para amostra de *corpora allata* com farnesol; F2 – *primer fpps3* com temperatura de anelamento igual a 58°C, para amostra de *corpora allata* com farnesol; C1 - *primer fpps3*, com temperatura de anelamento igual a 56°C, para amostra de *corpora allata* sem farnesol; C2 – *primer fpps3*, com temperatura de anelamento igual a 58°C, para amostra de *corpora allata* sem farnesol; Act1 - *primer actina*, com temperatura de anelamento igual a 56°C, para amostra de *corpora allata*; Act2 - *primer actina*, com temperatura de anelamento igual a 58°C, para amostra de *corpora allata*; B – solução controle contendo PCR Master Mix, água DEPC, *primer R* de *actina* e *primer F* de *actina*. Número de ciclos igual a 40; Tempo de corrida igual a 90 minutos; Tempo de exposição da foto igual a 6.16 segundos; ganho igual a 1; ScanMode Fast; Brilho igual a zero; Quantidade de material colocado em cada poço igual a 21µl (amostras com 0.3µl SYBR Green I e 0.5µl Azul de bromofenol).

Fonte: Do autor.

Testamos os *primers* do gene da via do mevalonato, o *fpps3*, para abelhas forrageiras, que possuem entre 20 a 25 dias de idade. Para isto, foram coletadas 50 abelhas, do apiário experimental do Grupo de Pesquisa Biologia da Socialidade da UNIFAL-MG, que possuíam pólen aderidos a suas corbículas, para termos certeza que estas abelhas realmente realizavam a tarefa de forrageamento. Os pares de *corpora allata*

foram dissecados, extraídos RNAs dos mesmos, feito síntese de cDNA e corrida PCR convencional seguida de eletroforese, para análise da expressão gênica. Pudemos constatar, por meio das bandas no gel de agarose, que o gene *farnesil difosfato sintase* é expresso em abelhas forrageiras, mas não em abelhas com 72 h de vida (Figura 14).

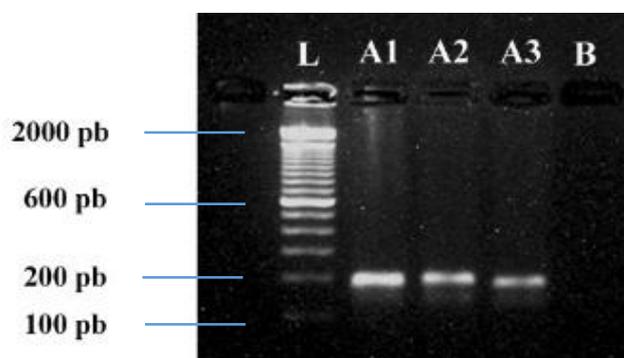


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de amplificação (40 ciclos) de fragmentos de cDNA de *fpps3* sintetizado a partir de RNA total de CA de operárias forrageiras. L – Ladder; A1-A3: *primer fpps3*, com temperatura de anelamento igual a 60°C, para amostras de *corpora allata* de abelhas forrageiras; B – solução controle contendo PCR Master Mix, água DEPC, *primer R* de *fpps3* e *primer F* de *fpps3*. Número de ciclos igual a 40; Tempo de corrida igual a 90 minutos; Tempo de exposição da foto igual a 7.16 segundos; ganho igual a 1; ScanMode Fast; Brilho igual a zero; Quantidade de material colocado em cada poço igual a 21µl (amostras com 0.3µl SYBR Green I e 0.5µl Azul de bromofenol).
Fonte: Do autor.

4.3 Comportamento transcricional de genes associados ao metabolismo do HJ em resposta a farnesol exógeno

Após os testes por meio de PCR semi-quantitativa e eletroforese, foram realizadas qPCRs, utilizando o método de análise de níveis de expressão por $\Delta\Delta Ct$ comparativo. As reações foram feitas em triplicata técnica, para cada tratamento, e foi tirada a média dos valores de Ct encontrados nas amostras. O valor numérico de Ct é inversamente proporcional à quantidade inicial do transcrito, ou seja, quanto menor valor de Ct, maior

é a expressão do gene de interesse (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A partir da diferença de Ct de cada gene em relação ao gene constitutivo (*actina*), os valores de ΔCt gerados foram transformados em $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a realização dos testes estatísticos (*t* de Student, duas amostras independentes), com nível de significância ≤ 0.05 , e para a construção de gráficos.

Os experimentos de RT-qPCR nos permitiram estimar os níveis de transcrição dos genes *mfe*, *mt* e *jhe* em *corpora allata* de abelhas operárias, tanto para o grupo controle quanto para o grupo tratado. Para todas as reações utilizando este sistema de detecção de transcritos, deve-se realizar a análise da curva de *melting* como controle de especificidade para o fragmento amplificado de acordo com o tamanho do fragmento (PAUDEL, D. et al., 2011). A análise de curva de *melting* permite a identificação dos fragmentos dos genes alvo amplificados através de uma temperatura específica (temperatura de *melting*, T_m), podendo também distinguir sequências de composições semelhantes com bases na diferença de suas temperaturas de dissociação. A T_m é a temperatura na qual metade das fitas de DNA está na forma de fitas simples e a outra metade na forma de dupla hélice. A T_m é dependente da composição do DNA, de modo que um aumento do conteúdo de G+C no DNA gera um incremento na T_m ocasionado pelo maior número de ligações de ponte de H (PAUDEL, D. et al; PÉREZ, L. J. et al., 2011).

A figura 15-A mostra-nos a Curva de *Melting* do gene *mt*, com temperatura de *melting* igual a 78°C. Observou-se um único pico na curva de Melt, indicando que somente um fragmento foi amplificado. A figura 15-B mostra-nos a Curva de *Melting* do gene *mfe*, com T_m igual a 77°C e a figura 15-C mostra-nos a Curva de *Melting* do gene *jhe*, com T_m igual a 74,5°C. A figura 15-D mostra-nos a Curva de *Melting* do gene constitutivo, *actina*, com T_m igual a 76°C. A figura 15-E mostra-nos a Curva de *Melting* do gene *fpps3*, onde não temos um padrão claro da curva, corroborando os achados da PCR semi-quantitativa que este gene não é expresso em operárias adultas com 72 h de vida.

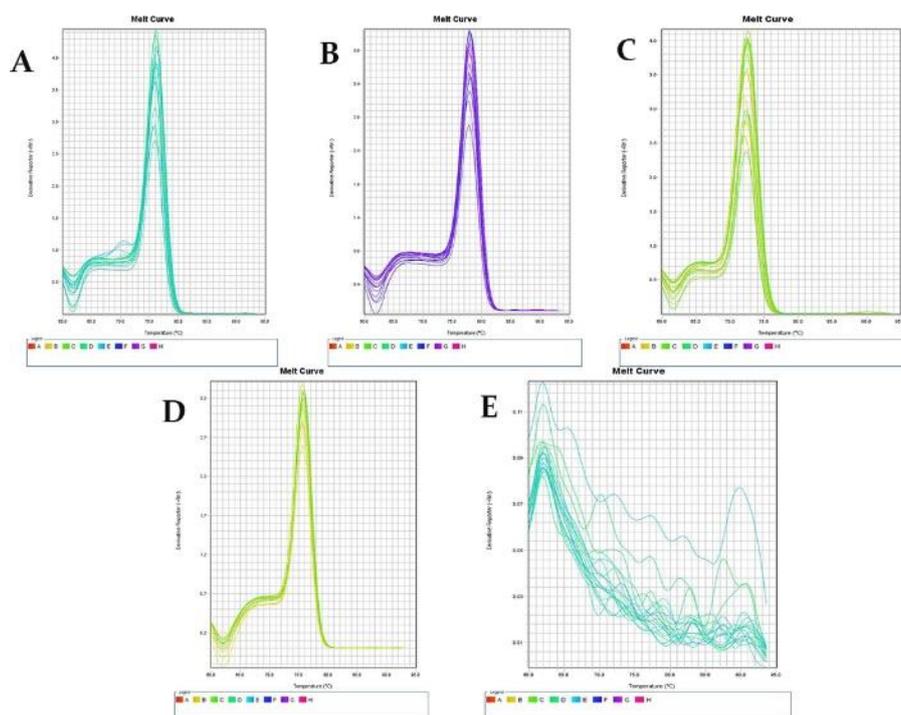


Figura 15. Curvas de *melting* dos genes codificadores de enzimas da via de síntese e degradação do HJ. A-E: Curvas de *melting*. A: gene *mt* com Tm igual a 78°C; B: gene *mfe* com Tm igual a 70°C C: gene *jhe* com Tm igual a 74.5°C; D: gene *actina* com Tm igual a 76°. E: Curva de *melting* do gene *fpps3*, onde não é possível determinar a temperatura de *melting*.

Fonte: Do autor.

Após análise das curvas de *Melting*, os dados foram exportados para uma planilha do Excel e a coluna Ct do alvo analisada. Foi feita a média e o desvio padrão das triplicatas biológicas. Com base no valor das médias do gene referência, calculou-se o ΔCt do alvo através da fórmula $\Delta Ct = \bar{X} t$ do gene alvo - $\bar{X} Ct$ do gene referência (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

A figura 16 mostra-nos o perfil de transcrição relativa dos genes envolvidos na via de síntese do HJ (*mt* e *mfe*) e na degradação do HJ (*jhe*). No eixo X, das figuras 16-A, 16-B e 16-C temos os três genes analisados (*jhe*, *mfe* e *mt*), para cada grupo de abelhas (controle e tratado com farnesol). No eixo Y temos a quantificação relativa de mRNA de cada gene. A figura 16-A mostra uma maior expressão de *jhe* em abelhas que tiveram sua alimentação suplementada com farnesol quando comparadas às abelhas controle, com diferença estatística significativa ($p < 0,001$). A figura 16-B mostra os níveis de transcrito do gene *mfe* que em abelhas suplementadas com farnesol é menor quando comparados às abelhas controle ($p = 0,034$). Em contrapartida, o gene mais próximo do farnesol, na via

de síntese do HJ, o *mt*, aparenta ser mais expresso em abelhas controle em relação a abelhas tratadas com farnesol (Figura 16-C), porém não obtivemos diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

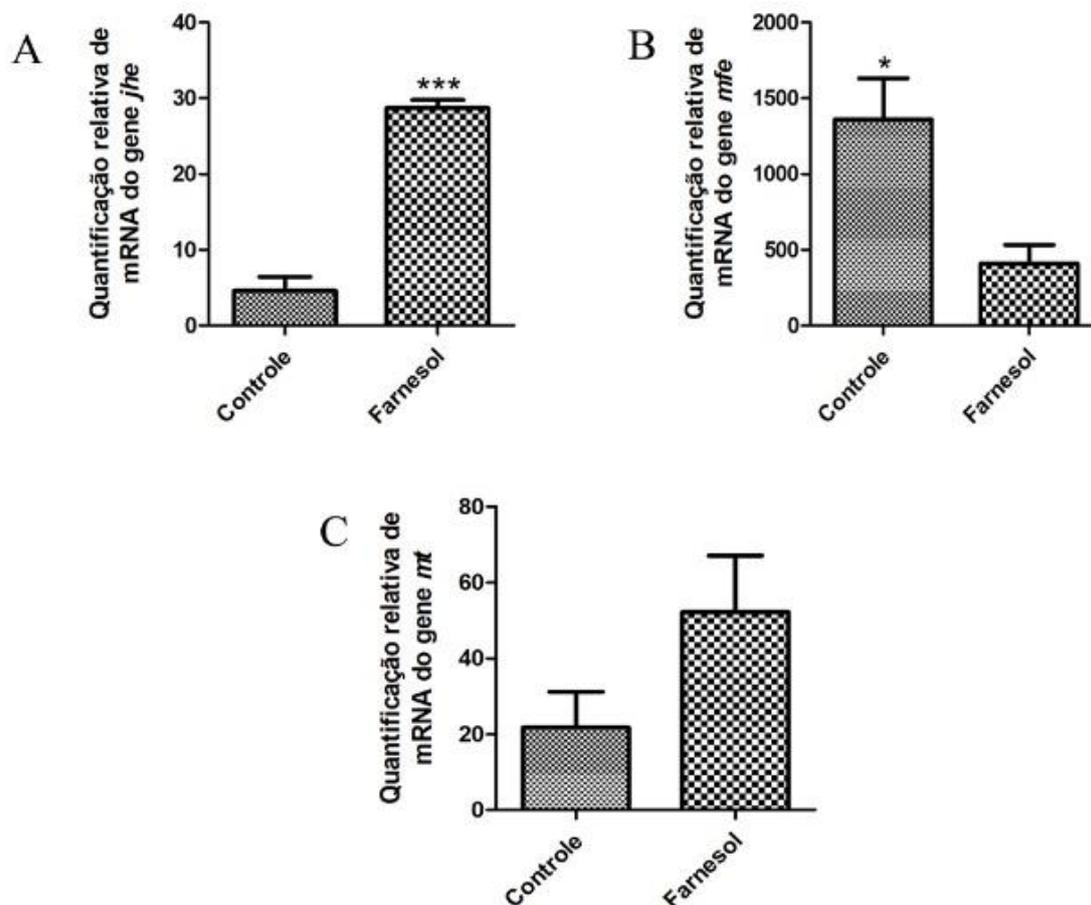


Figura 16. Níveis relativos de expressão de genes obtidos mediante PCR quantitativa em Tempo Real em corpora allata de *A. mellifera*. Os eixos X representam os tratamentos (controle e farnesol) para cada gene (A: *jhe*; B: *mfe*; e C: *mt*). Os eixos Y representa os níveis relativos de transcrição dos genes da via de síntese e de degradação do HJ (médias de 2 $(-\Delta\Delta Ct)$). O teste estatístico utilizado foi o teste *t* de Student, onde $p < 0,05$ está representado no gráfico por * e $p < 0,0001$ está representado por ***.

Fonte: Do autor.

4.4 O farnesol exógeno aumenta o volume de CA de abelhas jovens

Com a finalidade de avaliar uma eventual influência do farnesol exógeno sobre aspectos morfológicos dos CA de abelhas *A. mellifera*, realizamos cortes histológicos seriados dos pares de glândulas que sintetizam o HJ. Para isto, 8 pares de CA de abelhas melíferas, de cada grupo (controle e tratado com farnesol), foram dissecados e incluídos em historesina. Nossos resultados mostraram que a área e o volume medidos dos CA das abelhas tratadas com farnesol são maiores em relação às abelhas controle, com diferença estatística significativa, sendo o $p < 0,05$, pelo teste *t* de Student (Figura 17). A figura 18 mostra a diferença de tamanho existente entre os CA de ambos os tratamentos.

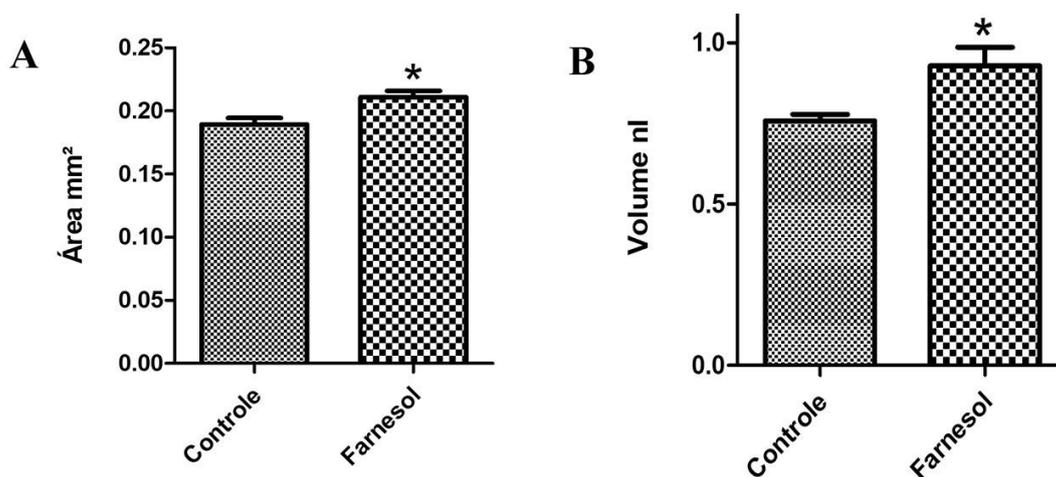


Figura 17. Influência do farnesol exógeno sobre a área (mm²) e o volume (nL) de CA de operárias de abelhas *A. mellifera*. No eixo X temos os grupos estudados, sendo o grupo controle composto por abelhas de 72h de vida que foram alimentadas com uma mistura de açúcar, mel e óleo de canola durante três dias; e o grupo Farnesol composto por abelhas suplementadas com farnesol exógeno em suas dietas. Nos eixos Y temos os valores das áreas em mm² (A) e do volume em nL (B) de ambos os grupos. O teste estatístico utilizado foi o teste *t* de Student, onde $p < 0,05$ está representado no gráfico por *.

Fonte: Do autor.

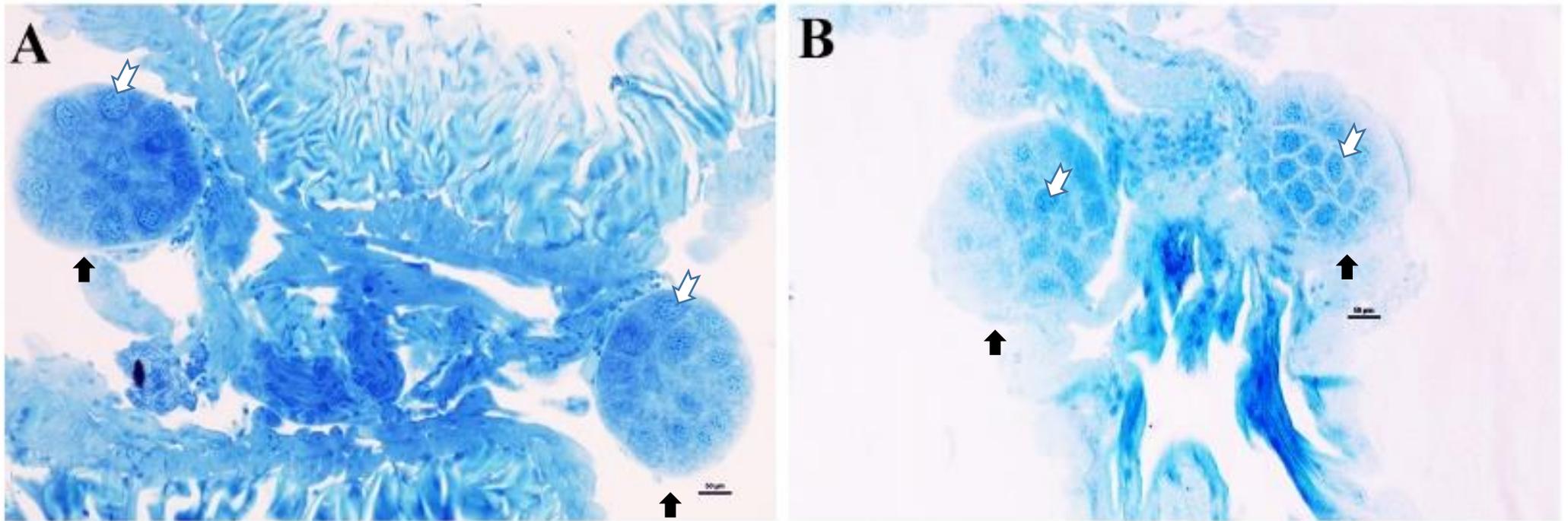


Figura 18. Exemplo de corte histológico em historesina de *corpora allata* localizadas no trato retrocerebral de abelhas *A. mellifera*. A: Par de glândulas endócrinas – CA - de abelhas do grupo controle; entre os CA tem-se parte do esôfago. B: par de glândulas endócrinas – CA - de abelhas do grupo tratado com farnesol. Entre os CA tem-se parte do esôfago. As setas pretas indicam os CA. As setas brancas indicam núcleos de células dos CA. Barra de escala: 50µm. Coloração: Azul de metileno.

Fonte: Do autor.

Utilizando microscopia confocal, analisamos lâminas contendo CA de operárias com 72 h de vida, com a finalidade de obter mais informação sobre a organização celular destas glândulas, em abelhas do grupo controle e do grupo tratado com farnesol. Para isto, 8 pares de CA de abelhas melíferas, de cada grupo, foram dissecados e marcados com DAPI. Mensuramos tanto o diâmetro quanto a área dos núcleos de CA para ambos os grupos, e ambas as medidas foram estatisticamente ($p < 0,001$ para diâmetro e $p = 0,032$ para área) maiores nas abelhas alimentadas com farnesol (Figura 19). Na figura 20, observa-se que os núcleos das abelhas tratadas com farnesol (D-F) são maiores, mais espessos e menos homogêneos em relação aos núcleos das abelhas controle (A-C).

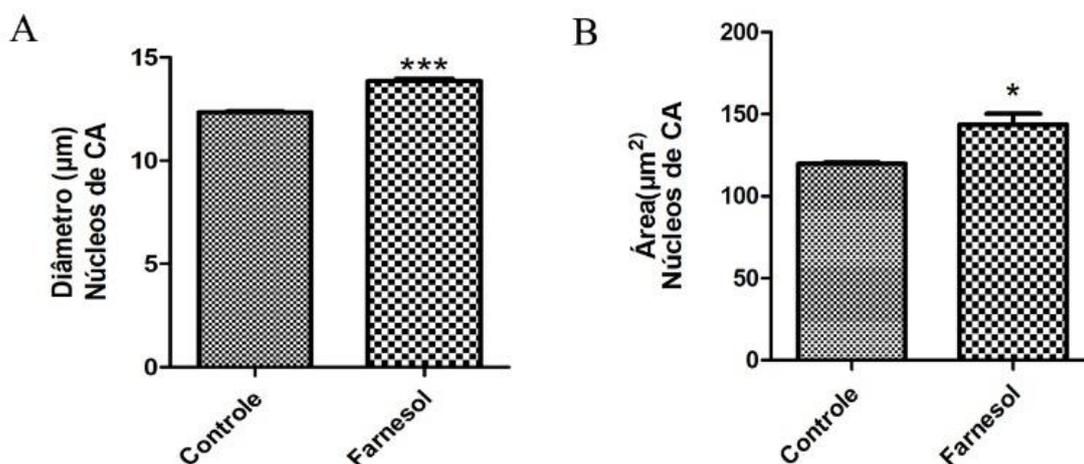


Figura 19. Influência do farnesol exógeno sobre o (A) diâmetro em μm e (B) a área em μm^2 de núcleos de CA de operárias de abelhas *A. mellifera*. No eixo X temos os grupos estudados, sendo o grupo Controle composto por abelhas de 72h de vida que foram alimentadas com uma mistura de açúcar, mel e óleo de canola durante três dias; e o grupo Farnesol composto por abelhas suplementadas com farnesol exógeno em suas dietas. Nos eixos Y temos as medições de diâmetro em μm (A) e área em μm^2 (B) em de ambos os grupos. O teste estatístico utilizado foi o teste t de Student, onde $p < 0,05$ está representado no gráfico por *.

Fonte: Do autor.

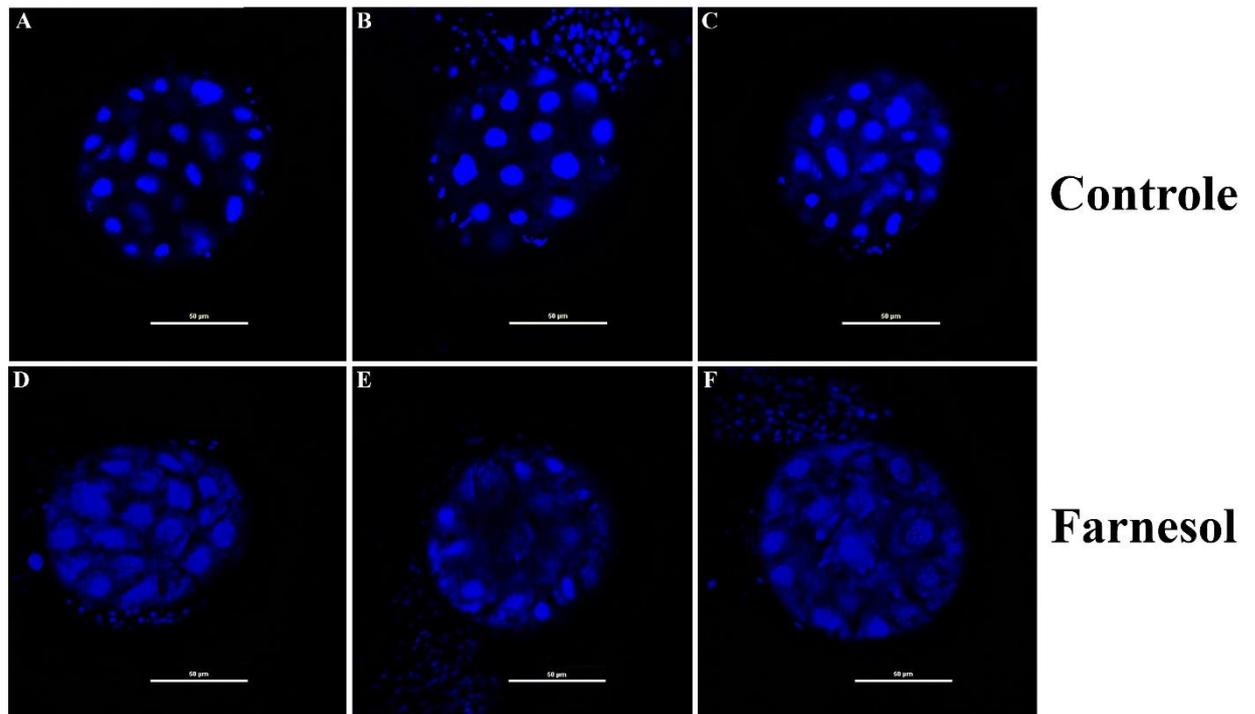


Figura 20. Influência do farnesol exógeno sobre a morfologia do núcleo de células de CA de *A. mellifera*. A-C: CA de abelhas do grupo controle. D-F: CA de abelhas do grupo tratado com farnesol. Marcação: DAPI. Barra de escala: 50μm.

Fonte: Do autor.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante a condução deste trabalho são discutidos abaixo com base na literatura científica.

5.1 O gene *fpps3* não parece expressar-se em *corpora allata* de abelhas jovens

As isoprenil difosfato sintases de cadeia curta são uma classe de preniltransferases que incluem a geranyl difosfato sintase (GPPS), farnesil difosfato sintase (FPPS) e geranylgeranyl difosfato sintase (GGPPS), que sintetizam geranyl difosfato (GPP) (C10), FPP (C15), e GGPP (C20), respectivamente. Embora a FPPS e a GGPPS sejam onipresentes por natureza, a GPPS é amplamente restrita a espécies de plantas (SOMMER et al., 1995; BURKE et al., 1999), mas também foi descrita em insetos (GILG et al., 2005). As farnesil difosfato sintases catalisam a condensação de dimetilalilo difosfato (DMAPP, C5) com duas moléculas de isopentenilo difosfato (IPP, C5) para formar farnesil difosfato (FPP) de cadeia C15 (SZKOPINSKA & PLOCHOCKA, 2005). A especificidade e razão de produtos gerados dependem das interações estabelecidas na bolsa catalítica entre substratos alílicos (IPP, DMAPP, GPP e FPP) e cofatores de metais divalentes (Co²⁺, Mg²⁺ ou Mn²⁺), com a reação prosseguindo e terminando precisamente em um comprimento de carbono específico (10, 15 ou 20) de acordo com a especificidade de comprimento da cadeia de produto da enzima (KELLOGG & POULTER, 1997). Em insetos, a FPP é usada para a síntese de ubiquinonas, dolicois, proteínas preniladas e hormônio juvenil (SCHOOLEY & BAKER, 1985).

Os genes codificadores da FPPS, presente na via do mevalonato, podem ser encontrados em diferentes reinos, desde arqueobactérias até plantas e animais. Há presença de pelo menos duas isoformas de FPPS em *Arabidopsis thaliana*, *Artemisia tridentata*, *Oriza sativa* e *Bombyx mori* (CUNILLERA et al., 1996a; SANMIYA et al., 1999; HEMMERLIN et al., 2003; KINJOH et al., 2007). Em insetos, a FPPS foi identificada em *Ipis pini*, localizada no genoma de *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* e *Bombyx mori* e clonada em *Agrotis ipsilon* (CASTILLO-GRACIA & COUILLAUD et al., 1999; KEELING et al., 2004).

Em *A. mellifera* existem sete loci gênicos (parálogos) de *fpps*, sendo *fpps3* mais expresso em *corpora allata* (BOMTORIN et al., 2014), codificador da enzima possivelmente envolvida diretamente na síntese de HJ em abelhas. Os genes de *fpps* (*fpps1*, *fpps2*, *fpps3*, *fpps4*, *fpps5*, *fpps6* e *fpps7*) não constituem caso único de duplicação gênica ou expansão de família de genes no genoma de abelhas, isto já foi ilustrado em outros 60 genes, e pode ser interpretado como possível assinatura na transição de abelhas solitárias a abelhas sociais (THE HONEY BEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006).

Nossos ensaios, tanto por PCR convencional quanto por PCR em tempo real, não detectaram transcritos de *fpps3* em *corpora allata* de abelhas operárias *A. mellifera* com 72 h de vida, mas sim em abelhas mais velhas (entre 20 a 25 dias de idade). Bomtorin e colaboradores (2014) mostraram haver expressão deste gene em cérebro, corpo gorduroso e *corpora allata* de operárias nutridoras (entre 7 e 10 dias de idade), forrageadoras (+20 dias de idade) e rainhas recém-emergidas, de abelhas *A. mellifera*. Torna-se provável que estímulos do Sistema Nervoso Central e fatores metabólicos controlem os níveis de expressão do gene *fpps3* em diferentes castas e idades de abelhas melíferas, de maneira a ocorrer um controle *on-off* dos *corpora allata* em momentos precisos. Assim, hipotetizamos que durante as primeiras horas de vida de uma abelha adulta haja um controle negativo atuando na via do mevalonato, que repercute em níveis basais de produção da enzima (FPPS3) e do respectivo HJ. Este resultado se corresponde bem com os dados hormonais, que mostram baixos títulos de HJ em abelhas jovens (ver Figura 1). Neste sentido ainda, os níveis de transcrição do gene *fpps3* não parecem ser alterados pela exposição das abelhas a farnesol exógeno, o que sugere que a síntese de HJ em abelhas jovens é regulada por fatores outros que a disponibilidade de um precursor. Isto cobra sentido se considerarmos que a respectiva enzima do *fpps3* é parte ainda da via do mevalonato, no início da via de síntese do HJ, e o farnesol é um precursor usado em etapas posteriores desta via (Figura 1). Desta forma, os níveis de transcrição de *fpps3* em CA de abelhas jovens nos servem como um controle negativo e nos permitirão interpretar os resultados relativos à transcrição dos outros membros da via estudados.

5.2 A expressão do gene *metiltransferase do hormônio juvenil (mt)* parece ser regulada positivamente por farnesol exógeno

Em insetos, tanto a O-metiltransferase do ácido farnesóico (FAMeT) quanto a O-metiltransferase do HJ ácido (JHAMT; chamada aqui de metiltransferase – MT) catalisam a metilação de ácido farnesóico em metil farnesoato com S-adenosil-L-metionina como um cofator. JHAMT teve sua primeira identificação e clonagem no bicho-da-seda, *Bombyx mori* (BmJHAMT), onde metila o grupo carboxila dos ácidos HJ I, II e III (JHAs) para gerar HJs hormonalmente ativos (SHINODA & ITOYAMA, 2003). O BmJHAMT também catalisa a metilação do FA ao MF, o precursor do HJ em crustáceos e em algumas espécies de insetos, incluindo a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (NIWA et al., 2008), o besouro *Tribolium castaneum* (MINAKUCHI et al., 2008), a mariposa *Samia cynthia ricini* (SHENG et al., 2008), o mosquito *Aedes aegypti* (MAYORAL et al., 2009), a abelha *Apis mellifera* (BOMTORIN et al., 2014) e o psílideo *Diaphorina citri* (van EKERT et al., 2015). O JHAMT tem sido reportado como expresso exclusivamente ou muito predominantemente em CA de insetos (SHINODA & ITOYAMA, 2003; NIWA et al., 2008; SHENG et al., 2008; MARCHAL et al., 2011; NOUZOVA et al., 2011; BOMTORIN et al., 2014; HUANG et al., 2015; LU et al., 2016), mas também é expresso em ovários de *Aedes aegypti*, onde a síntese de JH III ocorre a partir do JHA III (van EKERT et al., 2014), e em abelhas solitárias *Bombus terrestris* (JEDLICKA et al., 2016).

Estudos têm investigado alterações na expressão do gene que codifica a proteína JHAMT e a modulação de títulos de HJ, seja em relação ao desenvolvimento idade-específica, diferentes castas existentes ou influências de agrotóxicos organofosforados em insetos. Dominguez & Maestro (2017) estudaram o envolvimento da JHAMT na síntese de HJ III em *Blattella germanica*, tanto em fêmeas adultas quanto em fêmeas de penúltimo estágio de ninfa, e identificaram três isoformas para a BgJHAMT (A, B e C). Eles mostraram que uma depleção de BgJHAMT nessas fêmeas causa uma drástica redução da síntese de JH III pelos CA, e tal resultado foi concomitante com uma diminuição na produção de vitelogenina nos corpos gordurosos e no desenvolvimento do folículo basal de ovários. Estes dados sugerem que em *B. germanica* a expressão do gene BgJHAMT modula a produção de JH III. O mesmo resultado foi observado em experimentos de *knockdown* de genes JHAMT em *S. gregaria* (MARCHAL et al., 2011) e *D. punctata* (HUANG et al., 2015).

Com a finalidade de identificar qual gene codifica atividade metiltransferase funcional em CA de insetos, foram realizadas quantificações da expressão das proteínas FAMeT e JHAMT em insetos. Em *D. melanogaster*, uma FAMeT recombinante

(rFAMeT) foi clonada, expressa e um anti-soro específico foi gerado. Experimentos de imunohistoquímica em *D. melanogaster* mostraram expressão de FAMeT em CA, mas o FAMeT recombinante clonado (rFAMeT) não apresentou atividade enzimática em ensaios radioquímicos, sugerindo que FAMeT em *D. melanogaster* tem baixo ou nenhum papel na biossíntese de sesquiterpenóides. Já JHAMT de *D. melanogaster* (DmJHAMT) mostrou ser altamente expresso em CA e sua proteína recombinante é capaz de catalisar a metilação/esterificação do ácido JH-III ou ácido farnesóico na presença de S-adenosil-L-metionina (SHINODA, T. & ITOYAMA, K., 2003; BURTENSHAW et al., 2008). Em consonância com estes dados, Marchal e colaboradores (2011) mostraram que JHAMT, e não FAMeT, de *Schistocerca gregaria* está envolvida na síntese de HJ. Bomtorin e colaboradores (2014) encontraram ortólogos dos genes *famet* e *mt* em abelhas *A. mellifera* e relataram, através de experimentos de reação em cadeia da polimerase, que os transcritos foram especificamente expressos em CA; sendo o *famet* expresso de forma mais onipresente, como é o caso de abelhas sem ferrão *Melipona quadrifasciata*. Com isto, inferiu-se que *mt* e não *famet* é o gene codificador da atividade metiltransferase em CA de abelhas.

Nossos ensaios sugerem uma expressão maior de *mt* em abelhas tratadas com farnesol em relação a abelhas controle. Se esta tendência for real, quanto mais farnesol exógeno uma abelha consumir, maior será a síntese de MT em seu CA, por um possível mecanismo de *feedback* positivo. Todavia, este achado não indica se há ou não uma relação direta entre a expressão do gene *mt* com o título de HJ em abelhas. Como proposto no projeto inicial, os resultados de análise da expressão dos genes da via de síntese de HJ serão testados mediante experimentos de radioimunoensaio para a medição de HJ nas hemolinhas de abelhas. Bomtorin e colaboradores (2014) analisaram a expressão de *mt* em larvas L4 e L5 de rainhas e operárias e compararam os títulos de HJ nesses instares. De acordo com seus resultados, a transcrição relativa de *mt* não segue a modulação do HJ; durante o quarto instar larval, a baixa expressão de *mt* ocorre com altos títulos de HJ, enquanto no quinto instar larval este quadro é invertido.

Nos últimos anos, cresceu o número de estudos sobre a influência de EDCs, como inseticidas e praguicidas, na via de síntese de HJ de insetos. O composto clorantraniliprole mostrou ter atividade inseticida muito alta e exibe efeitos subletais adversos sobre a aptidão dos insetos. Por exemplo, o clorantraniliprole a doses de LC30 e LC50 em *Spodoptera exigua* aumenta a duração do período larval deste inseto (XU et al., 2017). Em *Plutella xylostella*, efeitos subletais de clorantraniliprole indicaram redução de taxas

pupais, peso pupal e taxa de emergência bem como declínio de fecundidade (HAN et al., 2012). O clorotraniliprole em concentrações subletais reduziu significativamente a massa corporal larval, a taxa de emergência, a longevidade de adultos e a taxa de eclosão de ovos, tanto nas gerações parentais como nos descendentes de *Helicoverpa armigera* (ZHANG et al., 2013). Assim, observa-se que compostos exógenos, como o farnesol, podem afetar a modulação dos títulos de HJ em insetos, alterando a expressão gênica de agentes envolvidos na via do mevalonato ou dos precursores diretos de HJ e provocar alterações comportamentais decorrentes das variações “artificiais” nos títulos hormonais.

5.3 O farnesol exógeno reprime a expressão do gene *metil farnesoato epoxidase* (*mfe*)

A última etapa da via de síntese do HJ consiste na epoxidação de metil-farnesoato (MF), um dos produtos da metilação de JHAMT, em JH III (GOODMAN & CUSSON, 2012). Esta epoxidação dá-se através da metil farnesoato epoxidase (MFE), que foi inicialmente identificada como uma enzima microsossomal do citocromo P450, em *Diptera punctata* (HELVIG et al., 2004). Desde então, a MFE tem sido amplamente estudada por ser responsável direta pela síntese de HJ, em insetos e outros artrópodes.

Cardoso-Júnior e colaboradores (2017) analisaram níveis de transcrito do gene *mfe* em abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris*, por meio de RT-PCR, em diferentes estágios do ciclo de vida de rainhas e operárias e compararam com os títulos de HJ mensurados por radioensaio. Segundo seus dados, a transcrição de *mfe* em abelhas está correlacionada com os títulos de HJ. Os títulos caem quando as larvas adentram no último instar larval e aumentam quando estas se preparam para a metamorfose. Em pupas, tanto de rainhas quanto operárias, a expressão de *mfe* é elevada no início do desenvolvimento pupal e posteriormente decai, mas este fator não se reflete na modulação dos níveis de HJ, que permanece basal durante este estágio do desenvolvimento. Em adultos, a expressão de *mfe* e os títulos de HJ são maiores em rainhas em relação a operárias, fator este que pode ser explicado pelo potencial reprodutivo das rainhas. Quanto às operárias adultas, de *M. scutellaris*, os títulos de HJ são maiores em abelhas recém-emergidas comparadas às forrageadoras, o que é oposto que ocorre em abelhas com ferrão, como *A. mellifera* (HUANG et al., 1994; ROBINSON et al., 1989).

Com o intuito de entender como se dá a modulação dos títulos de HJ em *A. mellifera* e quais são os fatores envolvidos neste processo, Bomtorin e colaboradores (2014) estudaram a participação de genes codificadores de enzimas precursoras do HJ, sintetizado pelo CA, em larvas e abelhas adultas de rainhas e operárias. Um destes genes é o *mfe*, que teve taxas de expressão gênica baixas em larvas de rainhas e menores ou quase inexistente em larvas de operárias. Em adultos, abelhas forrageiras (+ 20 dias de idade) tiveram expressão muito maior de *mfe* quando comparadas às nutridoras (entre 7 a 10 dias de idade), o que condiz com a modulação de títulos de HJ durante o período adulto e está em consonância com estudos anteriores (HUANG et al.; ROBINSON et al., 1991; AMDAM et al., 2004; 2007). Estes pesquisadores realizaram *knockdown* do gene *mfe*, por meio de RNA de interferência e constataram que os títulos de HJ caíram drasticamente. Assim, teve-se que o último gene da via de síntese do HJ está diretamente relacionado com a modulação do mesmo em abelhas melíferas. De maneira similar, Rachinsky e colaboradores (2000) estudaram a participação do *mfe* no quinto estágio larval, de abelhas *A. mellifera*, etapa esta em que há uma menor síntese natural de HJ por CA. Eles observaram que o perfil de expressão desse gene da via de síntese do HJ acompanha os títulos de HJ.

Nossos experimentos demonstram que abelhas suplementadas com farnesol possuem taxas de transcrição relativa de *mfe* menores quando comparadas às abelhas controles. Hipotetizamos que a suplementação adicional de farnesol em abelhas melíferas aumenta a disponibilidade de substrato, porém por uma alça de *feedback* negativo, promove uma menor expressão de *mfe*, regulando assim mesmo de maneira positiva os níveis de síntese de HJ, que por sua vez, podem modular o comportamento e fisiologia das abelhas. Complementar a estes achados, nossos dados apontam uma expressão maior de JHE - que está relacionada à retirada de HJ de circulação na hemolinfa de abelhas (HINTON & HAMMOCK, 2001) - em operárias tratadas com farnesol em relação às abelhas controle. Hipotetiza-se que quanto maiores os níveis de expressão de *mfe*, menor é a expressão do gene *jhe*; esse quadro dá-se devido às atividades antagonistas destes genes (síntese e degradação de HJ, respectivamente). Em consonância com nossos achados, Bomtorin e colaboradores (2014) demonstram que transcritos de *jhe* possuem valores elevados quando os níveis de HJ na hemolinfa estão reduzidos. Em outros insetos, padrões semelhantes foram encontrados, tanto em período larval quanto pupal. Kinjoh e colaboradores (2007) estudaram esse mesmo efeito em pupas de *B. mori* e concluíram que os níveis de HJ na hemolinfa são controlados graças ao balanço existente entre a taxa

de síntese de HJ por CA e a taxa de degradação pela *jhe*. Assim, esse balanço contribui para a metamorfose e plasticidade fenotípica de insetos. De modo interessante, em outras espécies de insetos, o gene *mfe* é encontrado tanto em CA quanto em outros tecidos, como ovários, discos imaginais e gônadas (JINDRA et al., 2013). Jedlickal e colaboradores (2016) encontraram altos níveis de transcrição do gene *mfe* em ovários de operárias e rainhas reprodutivas de *Bombus terrestris*. Segundo os pesquisadores, a capacidade de rainhas e operárias produzirem HJ em ovários não implica presença de todas as enzimas presentes na via de síntese do HJ nesse tecido.

Os genes codificadores de enzimas relacionadas à última etapa na via de síntese do HJ, como *mt* e *mfe*, também podem participar da síntese de compostos orgânicos envolvidos em outros processos biológicos em insetos. É o caso da síntese de cantharidina – toxina defensiva sintetizada por besouros. A Cantharidina tem sido investigada em vários campos de estudos devido a seus efeitos no tratamento de tumores, controle de pestes e atividades antibacterianas. Membros da família Meloidae produzem cantharidina e são utilizados como fonte para preparos medicinais. Também se tem relatado que a cantharidina serve como feromônio para acasalamento em insetos (MATSUZAWA, M., GRAZIANO, M. J. & CASIDA, J. E., 1987; WANG et al., 2015; KHAN et al., 2013; LIN et al.; YANG et al., 2016). Lu e colaboradores (2016) estudaram a cantharidina no besouro *Epicauta chinensis* e constataram que a biossíntese deste composto é dada pela via do mevalonato (a mesma via que precede as etapas finais da síntese de HJ em insetos). Em 2017, o mesmo grupo de pesquisadores estudou a participação de *jhamt*, *mfe* e *jheh* em machos desses insetos e observaram que os níveis de EcMFE e EcJHEH foram altos no primeiro estágio larval de *E. chinensis*, com os transcritos de EcJHEH mais expressos durante o quinto estágio larval; e o nível de transcrição de EcJHAMT foi maior durante o segundo e o terceiro estágio larval. A transcrição destes três genes mostrou uma tendência similar com a produção de cantharidina em machos de *E. chinensis*. De maneira interessante, estudos demonstraram que o farnesol pode atuar como um intermediário na biossíntese de cantharidina, por meio da quebra de esqueletos de carbono de farnesol entre C(1)-C(2), C(4)-C(5) e C(6)-C(7), e por uma conversão intramolecular de incorporação de cantharidina (PETER et al.; PETER, M., WOGGON, W. & SCHMID, H., 1977). Assim, insetos que entram em contato com plantas que possuem em suas resinas vegetais o farnesol podem ter suas rotas metabólicas alteradas, bem como os comportamentos sociais, de cortejo e de defesa contra predadores; esses fatos suportam nossa hipótese inicial que agentes exógenos interferem na fisiologia e comportamento de abelhas *A.*

mellifera.

5.4 O farnesol exógeno altera a transcrição de genes da via de síntese e degradação do HJ, a morfologia de CA e o comportamento de operárias jovens

Os resultados relativos às alterações nos níveis de transcrição dos genes codificadores das enzimas envolvidas na produção e degradação do HJ em resposta ao farnesol exógeno explicam as alterações comportamentais observadas nas abelhas. O tratamento com farnesol teve o efeito que normalmente tem o HJ sobre a evolução comportamental das operárias adultas. Os títulos de HJ aumentam de acordo com a idade das abelhas operárias; quanto mais velha uma abelha, maior a síntese de HJ pelo CA. Altos títulos de HJ estão relacionados com uma melhor cognição desses insetos, maior aprendizado, reconhecimento do ambiente em torno da colmeia e demais tarefas extranidais (ROE & VENKATESH, 1990; DE KORT E GRANGER, 1996; HAMMOCK, 1985). As abelhas recém-emergidas apresentam baixos níveis de hormônio juvenil. Segundo Robinson e colaboradores (1987), a transição de tarefas ao longo do envelhecimento de um organismo, polietismo etário, é um processo probabilístico, determinado por dois fatores: (I) condições ambientais e coloniais, que determinam a probabilidade de serem "expostas" à tarefa e (II) o limite de resposta da abelha aos estímulos associados a cada tarefa, ou seja, a probabilidade de resposta, dada a "exposição" à tarefa. Fatores ambientais e EDCs podem modular a dinâmica populacional e trabalhos intra e extranidais de uma colmeia, bem como interferir nos títulos de HJ. (TASEI, 2001; THOMPSON et al., 2005, 2007; FOURRIER et al., 2015). Abelhas forrageadoras entram em contato com diversos vegetais, que possuem diferentes compostos químicos. Determinados compostos, como o farnesol, por exemplo, participam da via de síntese do HJ. Logo, ao coletar resinas vegetais de uma planta que possua precursores de HJ, pode haver uma mudança fisiológica nessas abelhas. Vários estudos (por exemplo, RANKIN & RIDDIFORD 1978; TAUBER et al., 1986) mostram que fatores ambientais, como temperatura, umidade, disponibilidade e variedade

alimentícia interferem nos títulos de hormônio juvenil em diferentes insetos.

Nosso trabalho demonstrou que abelhas com dieta suplementada com farnesol tiveram aumento significativo ($p < 0.05$) tanto da área (mm^2) quanto do volume (nl) de seus CA em relação às abelhas controles (ver figura 16). Além disso, a marcação de núcleos de CA, com DAPI, mostrou que os núcleos de abelhas suplementadas com farnesol são maiores (diâmetro com $p < 0,001$ e área com $p = 0,032$) e encontram-se mais disformes quando comparados aos núcleos de abelhas controles. Esse aumento do tamanho dos núcleos pode indicar um aumento na transcrição de genes envolvidos tanto na síntese quanto na degradação do HJ, nos CA. Ademais, nossos dados mostram que abelhas alimentadas com dieta suplementada com farnesol apresentam comportamentos mais eufóricos em relação às abelhas controle, como: agitação dentro dos confinadores, aumento da frequência de voo e hiperatividade. Essa diferença comportamental foi mais claramente observada após 48h de início dos experimentos, o que nos leva a acreditar que a modulação de títulos do HJ pelo controle *on-off* da atividade dos CA ocorra nas primeiras horas de vida de abelhas adultas melíferas. Concomitantemente a este trabalho, e de maneira corroborativa, nosso grupo de pesquisa estudou a influência do farnesol exógeno na taxa de alimentação e agressividade de abelhas melíferas. De Matos Júnior (comunicação pessoal, 2018) encontrou diferença significativa ($p < 0,0001$) no consumo de alimentos de abelhas tratadas e não tratadas com farnesol, sendo que as abelhas tratadas consumiam maior quantidade do alimento fornecido. Além disso, em seu estudo, De Matos Júnior encontrou diferença significativa ($p < 0,05$), favorecendo as abelhas tratadas, na taxa de *lunging* (capacidade de voo) das abelhas melíferas. Juntamente com testes de *allogrooming* (antenação) e de ataques, o autor aponta que o aumento do consumo de alimento contendo farnesol altera o comportamento das abelhas, o que entra em consonância com os dados apresentados neste trabalho. Esses achados, do presente trabalho e da literatura, reforçam nossa hipótese: quando uma abelha entra em contato com plantas, que possuem farnesol em suas resinas vegetais, pode ter sua fisiologia, metabolismo e comportamento alterados, podendo, então, repercutir em seu ciclo de vida e sua relação com outros indivíduos da mesma espécie, bem como desenvolvimento de atividades nas colônias. Entender o controle *on-off* dos CA, estudar os genes codificadores de enzimas presentes na vida de síntese e de degradação do HJ e as alterações morfológicas nos pares de glândulas endócrinas, em diferentes tratamentos, torna-se crucial para compreender a biologia das abelhas melíferas e suas relações com o meio.

6 CONCLUSÃO

O esquema da figura 21 demonstra resumidamente nossos achados. Abelhas *A. mellifera* com dieta suplementada com farnesol exógeno têm seus níveis de transcrição de mRNAs dos genes *esterase do hormônio juvenil* e *metil transferase* maiores quando comparados aos de abelhas que não foram expostas a este composto. Porém, quando analisamos o nível de transcrição do gene *metil farnesoato epoxidase* temos um cenário inverso. E, quanto maior o consumo de alimento com farnesol, maiores são os valores da área e volume dos CA, bem como área e diâmetro dos núcleos do CA. Desse modo, pode-se concluir que abelhas que consomem mais farnesol têm alterações na morfologia de seus CA e na síntese de genes da via de síntese e degradação do HJ, o que repercute em mudanças no comportamento do animal, que, por sua vez, pode ter implicações diretas e indiretas na comunicação entre os indivíduos de uma colônia, no aprendizado e na capacidade de desenvolver atividades extra e intranidais.

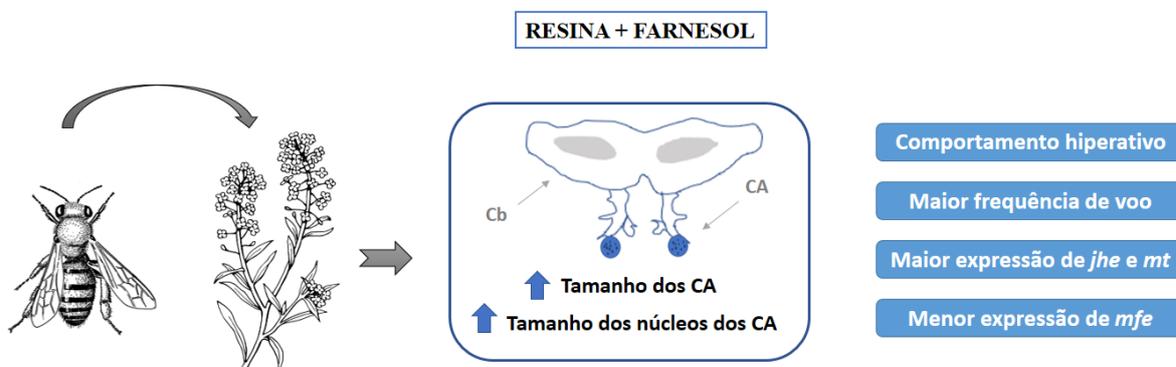


Figura 21. Esquema dos principais achados sobre a influência do farnesol exógeno sobre aspectos fisiológicos de abelhas *A. mellifera*. CA = *corpora allata*; Cb = cérebro.

Fonte: Do autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, S. M. D. et al. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.

AMDAM, G. V., Norberg, K., Hagen, A. and Omholt, S. W. Social exploitation of vitellogenin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 100, 1799-1802, 2003.

AMDAM, G. V., Simões, Z. L. P., Hagen, A., Norberg, K., Schröder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T. B. and Omholt, S. W. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. **Exp. Gerontol.** 39, 767-773, 2004a.

AMDAM, G. V, Page RE. The making of a social insect: developmental architectures of social design. **BioEssays** 29:334–343, 2007.

BAKER, F.C.; REUTER, C.C.; TSAI, L.W.; BRINDLE, P.A.; RICHARD, D.S. Use of microderivatization techniques in combination with thin-layer chromatography, liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for investigation of juvenile hormones and related compounds. *In: Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones*, ed. AR McCAFFERY, ID Wilson, pp. 19-31. New York: Plenum. 1990.

BEETSMA, J. The process of queen-worker differentiation in the honeybee. **Bee World**, 60: 24-39. 1979.

BELLÉS, X.; MARTÍN, D.; PIULACHS, M. D. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. **Annu Rev Entomol**, v. 50, p. 181-99, 2005.

BOMTORIN, A. D. et al. Juvenile hormone biosynthesis gene expression in the corpora allata of honey bee (*Apis mellifera* L.) female castes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

BURTENSHAW, S. M. et al. A putative farnesoic acid O -methyltransferase (FAMeT) orthologue in *Drosophila melanogaster* (CG10527): Relationship to juvenile hormone biosynthesis ? v. 29, p. 242–251, 2008

BURKE CC, WILDUNG MR, CROTEAU R. Geranyl diphosphate synthases: Cloning, expression and characterization of this prenyltransferases as a heterodimer. **PNAS**. 96:13062–13067, 1999.

CASTILLO-GRACIA M & OUILLAUD F. Molecular cloning and tissue expression of an insect farnesyl diphosphate synthase. **Eur J Biochem** 262:365–370, 1999.

CARDOSO-JÚNIOR CAM, FUJIMURA PT, SANTOS-JÚNIOR CD, BORGES NA, UEIRA-VIEIRA C, HARTFELDER K, GOULART LR, BONETTI AM. Epigenetic modifications and their relation to caste and sex determination and adult division of labor in the stingless bee *Melipona scutellaris*. **Genet Mol Biol**. v. 68, p. 61–68, 2017.

COLLINS, M. D.; MAO, G. E. Teratology of Retinoids. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 399–430, 1999.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Courier Companies, Rockville, 1250-1318, 2000.

CULLINEY, T.W. Origin and evolutionary history of honeybees. **Apis. Bee World**, 64: 29 – 37. 1983.

CUNILLERA N, ARRO M, DELOURME D, KARST F, BORONAT A, FERRER A. *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. **J Biol Chem** 271: 7774–7780, 1996.

DE KORT, C.A.D.; KOOPMANSCHAP, A.B. High molecular weight transport proteins for JH-III in insect hemolymph. **Experientia**, 42: 834-836. 1986.

DE KORT, C.A.D.; KOOPMANSCHAP, A.B. Specificity of binding of juvenile hormone III to hemolymph proteins of *Leptinotarsa decemlineata* and *Locusta migratoria*. **Experientia**, 43: 904-905. 1987.

DE KORT, C.A.D.; KOOPMANSCHAP, A.B. Binding of juvenile hormone III to lipophorin from the American cockroach, *Periplaneta Americana*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 11: 159-172. 1989.

- DE KORT, C. A. D.; GRANGER, N. A. Regulation of JH titers: The relevance of degradative enzymes and binding proteins. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 33, n. 1, p. 26, 1996.
- DOMINGUEZ, C. V. & MAESTRO, J. L. Expression of juvenile hormone acid Omethyltransferase and juvenile hormone synthesis in *Blattella germanica*. **Insect Sci.** p. 1–10, 2017.
- ELEKONICH, M. M. & ROBERTS, S. P. Honey bees as a model for understanding mechanisms of life history transitions. **Comparative Biochemistry and Physiology** 141: 362-371. 2005.
- EVANS, D. et al. A possible link between pyriproxyfen and microcephaly. **PeerJ Preprints**. 4:e1959v1, 2016.
- FLATT, T. et al. Comparing thyroid and insect hormone signaling. **Integrative and Comparative Biology**, v. 46, n. 6, p. 777–794, 2006.
- FITZPATRICK, A. H. et al. Roles for farnesol and ABA in Arabidopsis flower development. **Plant Signaling & Behaviour**, v. 6, n. 8, p. 3, 2011.
- FOURRIER, J. et al. Larval exposure to the juvenile hormone analog pyriproxyfen disrupts acceptance of and social behavior performance in adult honey bees. **PLoS One** 10, e0132985, 2015.
- GILBERT, L.I.; GRANGER, N.A.; ROE, R.M. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 30:617-644. 2000.
- GILG, Anna B. et al. Isolation and functional expression of an animal geranyl diphosphate synthase and its role in bark beetle pheromone biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 28, p. 9760-9765, 2005.
- GOODMAN, WG.; CUSSON, M. The juvenile hormones. In: Gilbert, LI., editor. **Insect Endocrinology**. Academic Press. p. 310-365, 2012.
- HAMMOCK, B. D. Regulation of Juvenile Hormone titre: degradation. In: KERKUT, G. A. e GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, v.7, p.431-472. 1985.

HAN WS, ZHANG SF, SHEN FY, LIU M, REN CC & GAO XW. Residual toxicity and sublethal effects of chlorantraniliprole on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Pest Manag Sci** 68: 1184–1190 (2012).

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. **Curr Top Dev Biol**, v. 40, p. 45-77. 1998.

HARMON, M. A et al. Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 13, p. 6157–6160, 1995.

HELVIG, C. et al. CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach *corpura allata*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 12, p. 4024-4029, 2004.

HINTON, A. C.; HAMMOCK, B. D. Juvenile hormone esterase (JHE) from *Tenebrio molitor*: full-length cDNA sequence, in vitro expression, and characterization of the recombinant protein. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, n. 5, p. 477-487, 2003.

HUANG, Z-Y. & ROBINSON, G. E. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 39, 147-158. 1996.

HUANG, J., MARCHAL, E., HULT, E.F. & TOBE, S.S. Characterization of the juvenile hormone pathway in the viviparous cockroach, *Diploptera punctata*. **PLoS ONE**, 10, e0117291. 2015.

HEMMERLIN A, RIVERA SB, ERICKSON HK, POULTER CD. Enzymes encoded by the farnesyl diphosphate synthase gene family in the big sagebrush *Artemisia tridentata* ssp. *spiciformis*. **J Biol Chem** 278: 32132– 32140, 2003.

HOJO, M., MATSUMOTO, T. & MIURA, T. Cloning and expression of a geranylgeranyl diphosphate synthase gene: insights into the synthesis of termite defence secretion. **Insect Mol Biol** 16, 121–131, 2007.

JANOŠEK J, HILSCHEŘOVÁ K, BLÁHA L, HOLOUBEK I. Environmental xenobiotics and nuclear receptors-interactions, effects and in vitro assessment. **Toxicol Vitro**, 20:18-37. 2006.

JINDRA, M., PALLI, S. R., & RIDDIFORD, L. M. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. **Annu. Rev. Entomol.** 58, 181–204, 2013.

JONES, G. Molecular Mechanisms of Action of Juvenile Hormone. **Annual review of entomology**, v. 40, p. 147–169, 1995.

JUNG-HOFFMANN, L. Die Determination von Königin und Arbeiterin der Honigbiene. **Z. Bienenforsch**, v. 8, p. 296-322, 1966.

KAZUTSUKA SANMIYA, OSAMU UENO, MAKOTO MATSUOKA & NAOKI YAMAMOTO. Localization of Farnesyl Diphosphate Synthase in Chloroplasts. **Plant Cell Physiol.** 40(3): 348-354,1999.

KHAN, R. A., LIU, J. Y., RASHID, M., WANG, D. & ZHANG, Y. L. Cantharidin impedes activity of glutathione S-transferase in the midgut of *Helicoverpa armigera* Hubner. **Int J Mol Sci** 14, 5482–5500, 2013.

KEELING CI, BLOMQUIST GJ & TITTIGER C. 2004. Coordinated gene expression for pheromone biosynthesis in the pine engraver beetle, *Ips pini* (Coleoptera: Scolytidae). **Naturwissenschaften.** 91:324-328, 2004.

KEVAN, P.G. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. **Agric. Ecosyst. Environ.** 74, 373–393, 1999.

KELLOGG BA, POULTER CD. Chain elongation in the isoprenoid biosynthetic pathway. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 1:570–578, 1997.

KINJOH, T., KANEKO, Y., ITOYAMA, K., MITA, K., HIRUMA, K., SHINODA, T. Control of juvenile hormone biosynthesis in *Bombyx mori*: cloning of the enzymes in the mevalonate pathway and assessment of their developmental expression in the corpora allata. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.** 37, 808– 818. 2007.

KLEIN, R. Phytoecdysteroids. **Journal of the American Herbalist Guild**, 7: 10-20, 2004.

KLEIN, A. M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proc Biol Sci** 274:303–313, 2007.

KRAMER, K. J. et al. Interaction of juvenile hormone with binding proteins in insect hemolymph. In: **The Juvenile Hormones**. Springer, Boston, MA, 1976. p. 327-341

KUROPATNICKI, A. K.; SZLISZKA, E.; KROL, W. Historical aspects of Propolis Research in Modern Times. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

LERANTH C, HAJSZAN T, SZIGETI-BUCK K, BOBER J, MACCLUSKY NJ. Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates. **Proc Natl Acad Sci USA**, 105:14187-91, 2008.

LINDSAY, A. K. et al. Farnesol and cyclic AMP signaling effects on the hypha-to-yeast transition in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 10, p. 1219-25, 2012.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** 25(4):402-408, 2001.

LIN, Y. S. *et al.* Cantharidin content determination and its inhibitory effect on human hepatoma HepG2 cells. **Biomed Res-India** 27, 533–536, 2016.

LU, K., CHEN, X., LIU, W.T., ZHANG, X.Y., CHEN, M.X. & ZHOU, Q. Nutritional signaling regulates vitellogenin synthesis and egg development through juvenile hormone in *Nilaparvata lugens* (Stal). ° **International Journal of Molecular Sciences**, 17, 269, 2016.

MATSUZAWA, M., GRAZIANO, M. J. & CASIDA, J. E. Endothal and cantharidin analogues: relation of structure to herbicidal activity and mammalian toxicity. **J Agric Food Chem** 35, 823–829, 1987.

MARCHAL, E., ZHANG, J., BADISCO, L., VERLINDEN, H., HULT, E.F., VAN WIELENDAELE, P., et al. Final steps in juvenile hormone biosynthesis in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 41, 219–227, 2011.

MARTINEZ, S., DOLGHIH, E., et al. Molecular and functional characterization of a juvenile hormone acid methyltransferase expressed in the *corpora allata* of mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 39, 31–37, 2009.

- MAXWELL, R. A.; WELEH, W. H.; SCHOOLEY, D. A. Juvenile hormone kinase I. Purification, characterization, and substrate specificity of juvenile hormone-selective diol kinase from *Manduca sexta*. **J. Biol. Chem.**, 277: 21874–21881, 2002a.
- MAXWELL, R. A.; WELEH, W. H.; HORODYSKI, F. M.; SCHEGG, K. M.; SCHOOLEY, D. A. Juvenile hormone kinase II. Sequencing, cloning, and molecular modeling of juvenile hormone-selective diol kinase from *Manduca sexta*. **J. Biol. Chem.**, 277: 21882–21890, 2002b.
- MINAKUCHI C, NAMIKI T, YOSHIYAMA M, SHINODA T. RNAi-mediated knockdown of juvenile hormone acid O-methyltransferase gene causes precocious metamorphosis in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **FEBS J.** v. 275, p. 2919–2931, 2008.
- NACHTSHEIM H. Zytologische Studien über die Geschlechtsbestimmung bei der Honigbiene (*Apis mellifera*). **Arch Zellforsch** 11:169–241, 1916.
- NILSEN, K. A., Ihle, K. E., Frederick, K., Fondrk, M. K., Smedal, B., Hartfelder, K. and Amdam, G. V. Insulin-like peptide genes in honey bee fat body respond differently to manipulation of social behavioral physiology. **J. Exp. Biol.** 214, 1488–1497, 2011.
- NIJHOUT, H. F. & WHEELER, D. E. Juvenile hormone and physiological basis of insect polymorphism. **Quarterly Review Biol.**, 57: 109–133, 1982.
- NIWA R, NIIMI T, HONDA N, YOSHIYAMA M, ITOYAMA K, KATAOKA H, SHINODA T. Juvenile hormone acid o-methyl transferase in *Drosophila melanogaster*. **Insect Biochem Mol Biol.** v. 38, p. 714–720, 2008.
- NOUZOVA, M., EDWARDS, M.J., MAYORAL, J.G. AND NORIEGA, F.G. A coordinated expression of biosynthetic enzymes controls the flux of juvenile hormone precursors in the corpora allata of mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 41, 660–669. 2011.
- PALLI, S. R.; RIDDIFORD, L. M.; HIRUMA, K. Juvenile hormone and “retinoic acid” receptors in *Manduca* epidermis. **Insect Biochemistry**, v. 21, n. 1, p. 7–15, 1991.
- PASQUALI R, VICENNATI V. Steroids and the metabolic syndrome. **J Steroid Biochem**, 109:258–65, 2008.
- PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-

PCR. **Nucleic acids res.** 29(9):e45. 2001.

PETER, M., WAESPE, H., WOGGON, W. & SCHMID, H. Incorporation experiments with (3H and 14C) doubly labelled farnesols into cantharidin. **Helv Chim Acta** 60, 1262–72, 1977.

PETER, M., WOGGON, W. & SCHMID, H. Identification of farnesol as an intermediate in the biosynthesis of cantharidin from mevalonolactone. **Helv Chim Acta** 60, 2756–2762, 1977.

RACHINSKY, A., FELDLAUFER, M. F. Responsiveness of honey bee (*Apis mellifera* L.) corpora allata to alltoregulatory peptides from four insect species. **J. Insect Physiol.** 46: 41-46, 2000.

RANKIN, M. A., RIDDIFORD, L. M. Significance of haemolymph juvenile hormone titer changes in timing of migration and reproduction in adult *Oncopeltus fasciatus*. **J. Insect Physiol.** v.24, p. 31-38, 1978.

REMBOLD, H.; LACKNER, B.; GEISTBECK, I. The chemical basis of honeybee, *Apis mellifera*, caste formation. Partial purification of queen bee determinant from royal jelly. **Journal of Insect Physiology**, v. 20, p. 307-314, 1974.

RIDDIFORD, L. M. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? **General and Comparative Endocrinology**, v. 179, n. 3, p. 477–484, 2012.

ROBINSON, G. E. Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. **Behav. Ecol. Sociobiol.** 20, 329-338. 1987.

ROBINSON, G. E. Regulation of division of labor in insect societies. **Annual Review of Entomology**, 37, 637-665. 1992.

ROE, R. M.; VENKATESH, K. Metabolism of juvenile hormones: degradation and titer regulation. In: GUPTA, A. P. (Ed.). *Morphogenetic Hormones of Arthropods*. New Brunswick: Rutgers University Press, v.1, p.600, 1990.

SANTOS, A. M. **Biologia Molecular de Genes Envolvidos no Metabolismo do Hormônio Juvenil em *Apis mellifera***. 2008. 175 (PhD). Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SCHOOLEY DA, BAKER F. Juvenile hormone biosynthesis. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Pergamon Press, Oxford, p 363–389, 1985.

SEELEY, T. D. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 11, 287-293, 1982.

SEELEY, T. D. The wisdom of the hive - the social physiology of honey bee colonies. **Cambridge, London: Harvard University Press**. 295p. 1995.

SHENG, Z., MA, L., CAO, M.X., JIANG, R.J. & LI, S. Juvenile hormone acid methyl transferase is a key regulatory enzyme for juvenile hormone synthesis in the Eri silkworm, *Samia cynthia ricini*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 69, 143–154, 2008.

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

SOMMER S, SEVERIN K, CAMARA B, HEIDE L. Intracellular localization of geranylpyrophosphate synthase from cell cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. **Phytochemistry**. 38:623–627, 1995.

SUN, J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, 2002.

SZKOPINSKA, A & PLOCHOCKA, D. Farnesyl diphosphate synthase of product specificity. **Acta Biochimica Polonica** 52:45-55, 2005.

Tantibanchachai, C. Retinoids as teratogens. **The Embryo Project Encyclopedia** ISSN: 1940-5030, 2014.

TARPY, D. R. & PAGE, J. R. No Behavioral Control over Mating Frequency in Queen Honey Bees (*Apis mellifera* L.): Implications for the Evolution of Extreme Polyandry. **The American Naturalist**, v. 155, n. 6, p. 820-827. 2000.

TASEI, J.N. Effects of insect growth regulators on honey bees and non-*Apis* bees. A review. **Apidologie** 32, 527–545, 2001.

TAUBER, M.J., TAUBER, C.A., MASAKI, S. Seasonal Adaptations of Insects. **Oxford University Press**, New York, 1986.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Atmed. 719p, 2004.

TEIXEIRA, E. W. et al. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2, n. 1, p. 85-92, 2005.

TOUHARA, K.; PRESTWICH, G.D. Role of juvenile hormone binding protein in modulating function of JH epoxide hydrolase in eggs of *Manduca sexta*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 24:641-646, 1994.

THOMPSON, H. M. et al. The effects of four insect growth-regulating (IGR) insecticides on honey bee (*Apis mellifera* L.) colony development, queen rearing and drone sperm production. **Ecotoxicology** 14, 757–769, 2005.

THOMPSON, H.M. et al. Modelling long-term effects of IGRs on honey bee colonies. **Pest Manag. Sci.** 63, 1081–1084, 2007.

UENO, T., KAWASAKI, K., KUBO, T. Preparation of Single-cohort Colonies and Hormone Treatment of Worker Honeybees to Analyze Physiology Associated with Role and/or Endocrine System. **Journal of Visualized Experiments**. v. 115, p. 1-10, 2016.

UNSWORTH, B. et al. Teratogenic evaluation of terpenoid derivatives, *Life Sciences* 15(9):1649-1655, 1974.

van EKERT, E., POWELL, C.A., SHATTERS, R.G. & BOROVSKY, D. Control of larval and egg development in *Aedes aegypti* with RNA interference against juvenile hormone acid methyl transferase. **Journal of Insect Physiology**, 70, 143– 150, 2014.

van EKERT, E., SHATTERS, R.G., ROUGE, P., POWELL, C.A., SMAGGHE, G. & BOROVSKY, D. Cloning and expressing a highly functional and substrate specific farnesoic acid Omethyltransferase from the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). **FEBS Open Biotoggle**, 5, 264–275, 2015.

VIEIRA, M.I. **Criar abelhas é lucro certo**: manual prático. São Paulo: Editora e Distribuidora Prata, 179p, 1989.

WAGNER M, OEHLMANN J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total

estrogenic burden and migration from plastic bottles. **Environ Sci Pollut R**, 16:278-86, 2009.

WANG, Y., BRENT, C. S., FENNEM, E. and AMDAM, G. V. Gustatory perception and fat body energy metabolism are jointly affected by vitellogenin and juvenile hormone in honey bees. **PLoS Genet**. v. 8, n. 6, 2012.

WANG, Y., SUN, W. B., ZHA, S. Q., WANG, H. & ZHANG, Y. L. Synthesis and biological evaluation of norcantharidin derivatives possessing an aromatic amine moiety as antifungal agents. **Molecules** 20, 21464–21480, 2015.

WEIRICH, G.; WREN, J.; SIDALL, J.B. Developmental changes of the juvenile hormone esterase activity in haemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Insect Biochem.**,3: 397-407, 1973.

WHEELER, D. E.; NIJHOUT, H. F. A perspective for understanding the modes of juvenile hormone action as a lipid signaling system. **BioEssays**, v. 25, n. 10, p. 994–1001, 2003.

WILSON. The insect societies. **Harvard University Press**, 1971.

XU, B. et al. Sublethal effects of chlorantraniliprole on juvenile hormone levels and mRNA expression of JHAMT and FPPS genes in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. **Pest Manag Sci**, 2017.

YANG, E.C. et al. **Effect of sub-lethal dosages of insecticides on honey bee behavior and physiology**. Proceedings of International Seminar on Enhancement of Functional Biodiversity Relevant to Sustainable Food Production in ASPAC, Tsukuba, Japan, 2010.

YANG, Y. C., LI, Y., GUO, M. T. & ZHAO, J. M. Cantharidin exhibits promising inhibitory effect on cell viability in oral cancer cells through mitochondrial pathway. **Int J Clin Exp Patho** 9, 4117–4122, 2016.

ZHANG RM, DONG JF, CHEN JH, JI QE & CUI JJ. The sublethal effects of chlorantraniliprole on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **J IntegrAgric** 12: 457–466, 2013.