Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Caracterização da região codificadora e análise de expressão de
Hexamerinas durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*

JULIANA RAMOS MARTINS

Ribeirão Preto, SP
2008

JULIANA RAMOS MARTINS

Caracterização da região codificadora e análise de expressão de
Hexamerinas durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: GENÉTICA
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Maria
Gentile Bitondi

Ribeirão Preto, SP
2008

Autorizo a reprodução ou divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Martins, Juliana Ramos

Caracterização da região codificadora e análise de expressão de Hexamerinas durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*. Ribeirão Preto, 2008.

122 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador(a): Bitondi, Márcia Maria Gentile.

1. *Apis mellifera* 2. Hexamerinas 3. Reprodução 4. Castas 5. Sexos

Parecer da Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____
Instituição: _____
Parecer: _____
Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____
Instituição: _____
Parecer: _____
Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____
Instituição: _____
Parecer: _____
Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 2008.

Dedicatória

Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... A vida é muita para ser insignificante (Charles Chaplin).

Aos meus **pais**, Rubens e Marlene, aos meus **irmãos**, Rubens Filho e Janaína, e aos meus **grandes amigos**, dedico.

Agradecimentos

“Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos! A alguns deles não procuro, basta saber que eles existem. Esta mera condição me encoraja a seguir em frente pela vida... mas é delicioso que eu saiba e sinta que eu os adoro, embora não declare e os procure sempre...” (Vinícius de Moraes)

Agradeço à minha orientadora, **Prof^ª. Dr^a. Márcia Maria Gentile Bitondi**, a quem carinhosamente chamo de *teacher*, pela dedicação, apoio, amizade e confiança. Agradeço também pela referência de excelente profissional e pessoa que se tornou em minha vida.

À **Prof^ª. Dr^a. Zilá Luz Paulino Simões**, pela convivência sadia e carinho.

Ao **Francis Nunes**, colaborador deste trabalho, grande amigo, daquele que faz o coração sorrir, que sempre esteve junto, mesmo nos meus momentos de estresse, e que sempre dizia: “Mega Julis, eu não vou brigar com você”. Que me aconselhou em todos os momentos e, quando percebia meu desespero, perguntava: “Quer que eu te ajude”? Muitas vezes parecia cair do céu, com um olhar carinhoso ou um abraço reconfortante, conseguindo ultrapassar o impossível a grande amizade, sendo meu professor e co-orientador. Chegou ao ponto de nos entendermos pelo olhar, sem precisar de explicação. Não é à toa que se tornou uma dessas pessoas importantes da minha vida, que guardo numa caixinha dentro do coração.

À **Anete Lourenço**, amiga do peito, parceira de todas as horas, desde a confidência de segredos até o compartilhar de novos projetos, sempre dizendo: “Ju, tive uma idéia”! Mestre e

amiga, em todos os tempos e de todas as formas. Parceira para os sorvetes depois do almoço ou depois do trabalho. Não há como agradecer tanto carinho, pois “Fácil é ser colega, fazer companhia a alguém, dizer o que ele deseja ouvir. Difícil é ser amigo para todas as horas e dizer sempre a verdade quando for preciso. E com confiança no que diz” (Carlos Drummond de Andrade).

A todos do **Laboratório de Genética** - Bloco A, o meu MUITO OBRIGADA!!!!

Aos técnicos **Vera Figueiredo** e **Luiz Aguiar**, pela coleta das abelhas e apoio técnico-científico na execução dos trabalhos, pelos socorros aos finais de semana e pelo carinho que sempre demonstraram.

À **Fapesp**, pelo apoio financeiro.

Ao **Departamento de Genética**, ao qual pertenço como aluna de pós-graduação.

Aos meus amigos fiéis e companheiros, **Priscila Bispo Okano** (*Dear of my heart*), **André Ditondo Micas**, **Fátima Okano**, **Nelson Bispo Okano**, por me apoiarem em todos os momentos e por tornarem minha vida mais cheia de amor, carinho, amizade e felicidade.

Resumo

Martins JR. Caracterização da região codificadora e análise de expressão de Hexamerinas durante o desenvolvimento de *Apis mellifera* 2008. 122p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Os cDNAs dos genes codificadores das hexamerinas HEX 70a, HEX 70c e HEX 110 de *Apis mellifera* foram sintetizados a partir de RNA total, clonados e suas regiões codificadoras foram totalmente seqüenciadas. As análises *in silico* dos produtos de tradução mostraram que as respectivas subunidades protéicas contêm os domínios conservados N, M e C, típicos de hemocianinas, e que em HEX 110, mas não nas outras subunidades, o domínio C foi interrompido pela inserção de uma seqüência repetitiva de aminoácidos. Análises de similaridade indicaram que os genes codificadores de hexamerinas derivaram de eventos de duplicação e diversificação a partir de um gene ancestral, resultando em múltiplos parálogos. Nossas análises também evidenciaram que HEX 110 é uma proteína rica em glutamina/ácido glutâmico e que HEX 70a e HEX 70c são compostas por mais de 15% de aminoácidos aromáticos e, portanto, integram a classe das arilforinas. A expressão temporal destes genes, e também do gene codificador de outra hexamerina de *A. mellifera*, *hex 70b*, previamente caracterizado, foi analisada qualitativa e quantitativamente durante o desenvolvimento de operárias, rainhas e zangões. Concomitantemente, a abundância dos respectivos polipeptídeos no corpo gorduroso ou hemolinfa foi examinada por SDS-PAGE ou *Western Blot*. Os quatro genes de hexamerinas se expressam no corpo gorduroso de operárias, rainhas e zangões principalmente durante o estágio larval. A modulação da expressão destes genes mostra semelhanças durante a transição larval-pupal de operárias, rainhas e zangões, com altos níveis de transcritos no último estágio larval e baixos níveis no início da fase pupal. No entanto, a quantidade relativa de transcritos de *hex 70a*, *hex 70b* e *hex 110* na fase de alimentação do último estágio larval (L₅F) é significativamente menor nas rainhas que nas operárias, o que

sugere participação das respectivas proteínas no processo de diferenciação de castas. Durante o estágio larval, as quatro diferentes subunidades de hexamerinas são armazenadas na hemolinfa onde, aparentemente, cumprem a função de proteínas de estocagem e, portanto, constituem fonte de aminoácidos para utilização em processos inerentes ao desenvolvimento pupal. No entanto, a expressão de *hex 70a* se estende até ao estágio adulto de operárias, rainhas e zangões, e neste estágio, as fêmeas e os zangões exibem perfis distintos de expressão. No corpo gorduroso de operárias, mas não no de rainhas e zangões, a expressão de *hex 110* também ocorre durante o estágio adulto. A expressão de *hex 70a* e *hex 110* no corpo gorduroso mostrou-se limitada pela disponibilidade de nutrientes: operárias alimentadas com uma dieta protéica apresentaram níveis significativamente maiores de ambos transcritos que aquelas que receberam dieta desprovida de proteínas, assim evidenciando que os processos de transcrição e tradução são nutricionalmente regulados. Além disto, os níveis de transcritos de *hex 70a* e *hex 110* aumentam no corpo gorduroso de abelhas operárias portadoras de ovários ativos, sugerindo que estes genes têm função associada à reprodução. Em *A. mellifera*, o corpo gorduroso não é o único sítio de expressão dos genes de hexamerinas. Transcritos de *hex 70a*, *hex 70b* e *hex 110* foram detectados também nas gônadas em desenvolvimento de operárias, rainhas e zangões, sugerindo uma função na diferenciação dos ovários e maturação dos testículos. Nossos resultados indicam que as hexamerinas codificadas por estes genes têm funções alternativas no ciclo de vida de abelhas *A. mellifera*, além de servir como fonte de aminoácidos para a metamorfose.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, Hexamerinas, Reprodução, Castas, Sexos

Abstract

Martins JR. Coding region characterization and hexamerins expression during *Apis mellifera* development 2008. 122 pp. MSc Dissertation – Genetics Department, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The cDNAs encoding the hexamerins HEX 70a, HEX 70c and HEX 110 of *Apis mellifera* were synthesized from total RNA isolated, cloned and their coding region were completely sequenced. *In silico* analyses of the translation products showed that the respective protein subunits contain the conserved domains N, M and C, typical of hemocyanins, and that in HEX 110, but not in the other subunits, the C domain is interrupted by a repetitive amino acid sequence. Analyses of similarity suggested that in the honey bee, the four hexamerin genes derived by duplication events and diversification from an ancestral gene, resulting in multiple paralogs. Our analyses also showed that HEX 110 is rich in glutamine/glutamic acid and that HEX 70a and HEX 70c are composed by more than 15% of aromatic amino acids and, therefore, integrate the arylphorin class of hexamerins. The temporal expression of these genes, and also of the gene encoding a previously characterized hexamerin of *A. mellifera*, *hex 70b*, was analyzed qualitatively and quantitatively during the development of worker bees, queens and drones. Concomitantly, the abundance of the respective polypeptides in the fat body or hemolymph was examined by SDS-PAGE or *Western Blot*. The four hexamerin genes are expressed in the fat body mainly during larval stage. The modulation of the expression of these genes shows similarities during the larval-pupal transition of worker bees, queens and drones, with high levels of transcripts in the last larval instar and low levels in newly ecdysed pupae. However, the relative quantity of transcripts of *hex 70a*, *hex 70b* and *hex 110* in the feeding phase of the last larval instar (L₅F) is significantly lower in queens than in worker bees, suggesting the participation of the respective proteins in the process of caste differentiation. During the larval stage, the four different hexamerin subunits are stored in the hemolymph where, seemingly, they perform the function of storage proteins and hence,

constitute source of amino acids for pupal development. Nevertheless, the expression of *hex 70a* is extended until the adult stage of worker bees, queens and drones and, in this stage, the female bees and the drones show distinct expression profiles. In the fat body of worker bees, but not in queens and drones, the expression of *hex 110* also occurs during the adult stage. The expression of *hex 70a* and *hex 110* in the adult fat body was proven to be limited by the availability of nutrients: worker bees fed with a protein diet showed significantly higher levels of both transcripts than the ones that received a diet which was poor in protein, thus evidencing that the transcription and translation processes are nutritionally-regulated. Additionally, the transcripts level of *hex 70a* and of *hex 110* increase in the fat body of worker bees with active ovaries, suggesting that these genes have function associated with reproduction. In *A. mellifera*, the fat body is not the only site of expression of hexamerins genes. Transcripts of *hex 70a*, *hex 70b* and *hex 110* were detected also in developing gonads of worker bees, queens and drones, suggesting that they have a function in ovary differentiation and testis maturation. Our results indicated that the hexamerins encoded by these genes have alternate functions in the life cycle of *A. mellifera* honey bees, besides serving as a source of amino acids to metamorphosis.

Key-words: *Apis mellifera*, Hexamerins, Reproduction, Castes, Sexes

Lista de Figuras

Figura 1.....20

Figura 2.....21

Figura 3.....22

Figura 4.....23

Figura 5.....24

Figura 6.....25

Figura 7.....25

Figura 8.....27

Figura 9.....49

Figura 10.....51

Figura 11.....53

Figura 12.....55

Figura 13.....56

Figura 14.....58

Figura 15.....59

Figura 16.....60

Figura 17.....61

Figura 18.....63

Figura 19.....64

Figura 20.....65

Figura 21.....66

Figura 22.....67

Figura 23.....68

Figura 24.....	69
Figura 25.....	70
Figura 26.....	71
Figura 27.....	72
Figura 28.....	78
Figura 29.....	82

Lista de Tabelas

Tabela I: 106

Tabela II: 107

Tabela III: 108

Tabela IV: 109

Tabela V: 110

Tabela VI: 111

Tabela VII:50

Lista de abreviaturas e símbolos

APS – persulfato de sódio

°C – graus Celsius

cDNA – ácido desoxiribonucleico

complementar

CDS – sequência codificadora

Cu²⁺ - íon cobre

d - dias

HEX – subunidade hexamerina

hex – gene codificador de hexamerina

kDa – kilodalton(s)

L₄ – 4º estágio larval

L₅ – 5º estágio larval

L₅F – 5º estágio larval em fase de alimentação

L₅S – 5º estágio larval em fase de tecelagem do casulo

M – molar

mg – miligrama(s)

min – minuto(s)

mL – mililitro(s)

mM – milimolar(es)

nm – nanômetro(s)

Ov - ovipositora

P - pupa

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

pb – par(es) de base(s)

Pb – pupa de olho marrom

Pbl – pupa de olho marrom e pigmentação corporal leve

Pbm – pupa de olho marrom e pigmentação corporal intermediária

Pbd – pupa de olho marrom e pigmentação corporal escura

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

Pdp – pupa de olho rosa escuro

pI – ponto isoelétrico

Pp – pupa de olho rosa claro

PP – prepupa

Pw – pupa de olho branco

RN – recém-nascido

rpm – rotações por minuto

RT – transcrição reversa

s – segundo(s)

SDS – dodecil sulfato de sódio

TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

U – unidade(s)

µg – micrograma(s)

µL – microlitro(s)

µM – micromolar(es)**RNA** – ácido ribonucleico

v – versão

xg – força centrífuga relativa

Sumário

INTRODUÇÃO	19
1. Biologia de <i>Apis mellifera</i>	20
1.1 Desenvolvimento Holometábolo	20
1.2 Diferenciação das castas e dos sexos.....	21
2. Hexamerinas	24
2.1 Hexamerinas de <i>Apis mellifera</i>	27
OBJETIVOS	30
MATERIAL E MÉTODOS	32
1. Material biológico	33
1.1. Obtenção de operárias e rainhas em diferentes estágios e fases da ontogênese	33
1.2. Obtenção de zangões em diferentes estágios e fases da ontogênese	34
1.3. Identificação das diferentes fases da ontogênese de rainhas, operárias e zangões	34
1.4. Obtenção de rainhas, operárias e zangões adultos com idades conhecidas.....	34
1.5. Obtenção de operárias órfãs	35
1.6. Coleta de operárias para os experimentos de manipulação da dieta alimentar	35
2. Seqüenciamento completo da região codificadora	36
2.1. Caracterização <i>in silico</i>	36
2.2. Purificação dos cDNAs amplificados por PCR.....	36
2.3. Preparo de células eletrocompetentes - <i>Escherichia coli</i> linhagem DH5 α	37
2.4. Clonagem.....	37
2.5. Seqüenciamento e análise das seqüências	38
2.6. Análise de similaridade	39
3. Estudo da expressão dos genes <i>hex 70a</i>, <i>hex 70b</i>, <i>hex 70c</i> e <i>hex 110</i>.....	39

3.1. Extração do RNA total e síntese do cDNA	39
3.2. PCR e análise por eletroforese	40
3.3. RT-PCR em Tempo Real.....	41
3.4. Análise estatística	42
4. Localização das proteínas	42
4.1. Coleta do material.....	42
4.2. SDS-PAGE	43
4.3. Preparo das amostras	43
4.4. <i>Western blot</i>	44
RESULTADOS	47
1. Sequenciamento e análise dos genes codificadores de hexamerinas	48
2. Expressão dos genes codificadores de hexamerinas durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	53
2.1. Operárias.....	53
2.2. Rainhas	56
2.3. Zangões.....	59
2.4. Análises quantitativas	61
3. Níveis de expressão de <i>hex 70a</i> no corpo gorduroso de operárias órfãs.....	64
4. Expressão de genes codificadores de hexamerinas associada ao desenvolvimento das gônadas e reprodução.....	65
5. Síntese de hexamerinas dependente da dieta alimentar	71
DISCUSSÃO	73
- Estrutura e organização dos genes de hexamerinas de <i>Apis mellifera</i>	74
- Expressão dos genes codificadores de hexamerinas durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	76

- Expressão de genes codificadores de hexamerinas associada ao desenvolvimento das gônadas e reprodução.....	80
- Síntese de hexamerinas dependente da dieta alimentar	83
CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXO.....	89

INTRODUÇÃO

1. Biologia de *Apis mellifera*

1.1 Desenvolvimento Holometábolo

As abelhas são insetos caracterizados por possuírem metamorfose completa apresentando quatro estágios distintos de desenvolvimento: embrionário, larval, pupal e adulto (**Fig. 1**). Os ovos iniciam o

desenvolvimento embrionário quando depositados nos alvéolos de cera construídos pelas abelhas operárias (células de cria). Após três dias, larvas eclodem iniciando o período

de intensa alimentação, marcado pelo crescimento corporal, que envolve uma série de mudas, ou seja, periodicamente o velho

exoesqueleto esclerotizado (ou cutícula) dá lugar a um novo. Quando a larva pára de se alimentar, ela tece o casulo e o alvéolo é fechado pelas operárias. Nesse momento, o intestino começa a ser esvaziado, iniciando a muda metamórfica.

Em contraste com as mudas larvais que resultam em aumento do tamanho corporal, a muda metamórfica é marcada por uma completa modificação da forma. Uma parte dos órgãos larvais degenera por morte celular programada e as novas estruturas do adulto começam se desenvolver. A diferenciação final da forma adulta ocorre sob o exoesqueleto pupal, parcialmente separado do corpo por um processo denominado apólise. Quando o exoesqueleto pupal é descartado o adulto emerge do alvéolo do favo (Winston 1991).

Figura 1: Desenvolvimento holometábolo de abelhas *A. mellifera*.

Fonte: **modificado** **de**
dylan1111.com/beekeeping/development.html

1.2 Diferenciação das castas e dos sexos

O sistema de determinação de sexo, em abelhas, é haplodiplóide. Os ovos fertilizados

Figura 2: Esquema de diferenciação de castas em *A. mellifera*.

Fonte: modificado de

http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SP_Mel/organizacao.htm

(diplóides) originarão fêmeas e ovos não fertilizados (haplóides) se desenvolverão, por partenogênese, em zangões (**Fig. 2**). Os ovos diplóides poderão originar dois fenótipos alternativos: rainhas e operárias, dependendo da alimentação diferencial

oferecida às larvas (**Fig. 2**). Larvas alimentadas com grandes quantidades de geléia real durante todo o estágio larval

tornam-se rainhas, enquanto as que recebem uma dieta composta por mel, pólen e geléia real a partir do terceiro estágio larval, em substituição à geléia real pura, tornam-se operárias (Haydak 1970). A dieta diferencial atua sobre o sistema neuro-endócrino, que gera sinais casta-específicos que resultam em títulos distintos de hormônio juvenil e ecdisteróides (Rachinsky *et al.* 1990; Hartfelder e Engels 1998) e em diferentes perfis de expressão gênica (Evans e Wheeler 1999; Cristino *et al.* 2006; Barchuk *et al.* 2007).

Uma diferença marcante entre rainhas e operárias adultas reside no sistema reprodutivo. Uma rainha tem cerca de 200 ovários por ovário (**Fig. 3C**) e é capaz de produzir centenas de ovos por dia, ao passo que as operárias têm entre dois e 12 ovários por ovário (**Fig. 3A**), geralmente inativos. Tais diferenças têm origem durante o desenvolvimento larval, quando cerca de 95% dos primórdios de ovários das larvas destinadas a serem operárias sofrem degeneração por eventos de morte celular programada (Schmidt-Capella e Hartfelder 1998). Quando as larvas param de se alimentar, em preparação para a muda

metamórfica, os caracteres casta-específicos já estão bem estabelecidos (Hartfelder e Engels 1998).

Em uma colônia de *A. mellifera*, poucas operárias (aproximadamente 0,01%) apresentam ovos totalmente desenvolvidos em seus ovários (**Fig. 3B**). Muitos dos ovos postos por essas operárias poedeiras são, normalmente, removidos dos alvéolos dos favos por outras operárias (Visscher 1989; Ratnieks 1993). A repressão da reprodução das operárias, então, envolve dois mecanismos: supressão mediada pela rainha, via feromônios (Velthuis *et al.* 1990; Hoover *et al.* 2003) e policiamento, pelas próprias operárias (Ratnieks 1993).

Em caso de morte da rainha, diversas operárias são capazes de ativar seus ovários e se tornarem poedeiras (Velthuis 1970). O período de latência entre a perda da rainha e o início da reprodução das operárias pode diferir significativamente entre subespécies (Ruttner e Hesse 1981) e até entre operárias de uma única colônia (Makert *et al.* 2006).

Além do contexto social e da ação de feromônios, o desenvolvimento ovariano em operárias de *A. mellifera* é influenciado pela qualidade e disponibilidade de alimento (Wheeler 1996; Hoover *et al.* 2006). Em termos nutricionais, proteínas são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento normais das abelhas (Moritz e Crailsheim 1987; Schmidt *et al.* 1995). Sabe-se, também, que uma dieta rica em proteínas é necessária para o desenvolvimento ovariano e a produção de ovos pelas abelhas operárias (Lin e Winston 1998; Pernal e Currie 2000; Hoover *et al.* 2006; Schafer *et al.* 2006). Uma das principais fontes de proteínas para as abelhas é o pólen (Grogan e Hunt 1979; Pernal e Currie 2000).

Figura 3: Ovários de operárias e rainhas de *A. mellifera*. A) Ovário inativo de operária. B) Ovário ativo de operária. C) Ovário de rainha.

Fonte: modificado de Winston, 1991.

O papel dos zangões de *A. mellifera* está fundamentalmente relacionado ao acasalamento e fecundação da rainha. O sistema reprodutivo dos zangões (**Fig. 4**) inclui os testículos, as vesículas seminais formadas pelo alargamento dos respectivos ductos deferentes e as glândulas acessórias ou de muco (Snodgrass 1956). As unidades estruturais dos testículos, os testíolos, são formadas no terceiro estágio larval e os agrupamentos de células

Figura 4: Sistema reprodutivo dos zangões de *A. mellifera*.

Fonte: modificado de Winston 1991.

germinativas em seu interior são observados no quarto estágio larval (Tozetto 1997). O início da espermatogênese ocorre no terceiro estágio larval (Louveaux 1977). Durante o estágio pupal, as células germinativas sofrem meiose e tem início a espermiogênese, coincidindo com o máximo desenvolvimento dos testículos. O final do processo de espermiogênese ocorre antes da emergência do zangão adulto (Bishop 1920; Silveira 1972; Kerr e Silveira 1974; Louveaux 1977; Tozetto 1997). Neste momento, tem início a migração dos espermatozoides para a porção pré-ventricular dos ductos deferentes e para as vesículas seminais, onde estes são temporariamente armazenados. Após a migração dos espermatozoides, os testículos começam a degenerar (Snodgrass 1956).

As altas taxas de ecdisteróides na hemolinfa de zangões em início de estágio pupal coincidem com a meiose das células germinativas (Louveaux 1977), sugerindo uma função desses hormônios no processo de meiose. O subsequente declínio dos níveis de ecdisteróides coincide com o término da espermiogênese ainda antes da ecdise do adulto (Tozetto *et al.* 2007).

2. Hexamerinas

Em insetos holometábolos, a transição do estágio larval para o pupal e o subsequente desenvolvimento do adulto ocorrem com base nas reservas de nutrientes acumuladas durante o estágio larval, uma vez que as pupas e adultos-faratos (adultos em desenvolvimento, ainda encobertos pela cutícula pupal) não se alimentam.

Proteínas produzidas durante o estágio larval e armazenadas na hemolinfa e/ou no corpo gorduroso recebem a denominação geral de “proteínas de estocagem” (Burmester e Scheller 1999). Algumas destas

pertencem à classe das hexamerinas (Telfer e Kunkel 1991), que integram uma família de proteínas composta por fenoloxidases, hemocianinas transportadoras de oxigênio,

pseudo-hemocianinas e receptores de hexamerinas (Burmester e Scheller 1996; Burmester 2001, 2002). Embora presentes em grande quantidade na hemolinfa, as hexamerinas não se ligam ao oxigênio como as hemocianinas, pois nelas, os resíduos de histidina ligadores de íons Cu^{2+} , necessários para o transporte de oxigênio, foram substituídos por outros aminoácidos (Beitema *et al.* 1994; Burmester 2001, 2002 – **Fig. 5**).

As hexamerinas têm grande massa molecular e consistem de seis subunidades similares ou idênticas de 75-90 kDa (Scheller *et al.* 1990; Telfer e Kunkel 1991). São sintetizadas em grandes quantidades pelo corpo gorduroso larval em resposta à acentuada ingestão de alimento e, subsequentemente, secretadas na hemolinfa onde se acumulam e representam 60 a 90% do total de proteínas circulantes (Scheller *et al.* 1990; Haunerland 1996). Por ocasião da muda metamórfica, inicia-se o seqüestro das hexamerinas pelas mesmas

Figura 5: Esquema mostrando a substituição de aminoácidos histidina na região de ligação ao cobre das hexamerinas, em comparação às hemocianinas.

células do corpo gorduroso que as sintetizaram (**Fig. 6**), onde serão armazenadas em forma de grânulos citoplasmáticos para serem utilizadas em processos do metabolismo intermediário e atender ao desenvolvimento pós-larval (Locke e Collins 1965, 1966, 1967 e 1968; Levenbook e Bauer 1984).

Estudos preliminares sugeriram que o seqüestro das hexamerinas e de outras proteínas da hemolinfa pelas células do corpo gorduroso ocorria por meio de um mecanismo de endocitose não-seletivo (Locke e Collins 1966; Duhamel e Kunkel

1987). No entanto, a seletividade deste processo foi demonstrada pela identificação de

Figura 6: Síntese e seqüestro de hexamerinas pelas células do corpo gorduroso (exemplo em *Calliphora vicina*). A) Representação de células do corpo gorduroso em processo de exportação de hexamerinas para a hemolinfa (célula à esquerda), seqüestro e armazenamento em grânulos citoplasmáticos (célula à direita). B) Barras brancas: taxa de síntese de hexamerinas. Barras listradas: taxa de seqüestro das hexamerinas. A linha preta representa o título de ecdisteróides. A pequena seta na base do esquema indica o início da muda metamórfica.

Fonte: modificado de Burmester e Scheller 1999

Figura 7: Modelo de regulação do seqüestro de hexamerinas pelas células do corpo gorduroso de *Corcyra cephalonica*.

Fonte: modificado de Arif *et al.* 2008.

receptores de hexamerinas nas membranas das células do corpo gorduroso de Lepidoptera (*Helicoverpa zea*, *Corcyra cephalonica*) (Kirankumar *et al.* 1997; Wang e Haunerland 1994) e de vários Diptera (Burmester e Scheller 1992; Burmester e Scheller 1999). Surpreendentemente, os receptores de hexamerinas não

pertencem a nenhuma classe conhecida de receptores de proteínas, mas se relacionam aos seus próprios ligantes, ou seja, às hexamerinas (Burmester e Scheller 1999). Esses receptores são ativados por altos níveis de ecdisteróides (Marinotti e de Bianchi 1986; Ueno e Natori 1982) e por uma tirosina quinase (Arif *et al.* 2003). A fosforilação, necessária à ativação do receptor, é inibida por uma proteína denominada HP19, que inibe, também, a atividade da tirosina quinase (Arif *et al.* 2004, 2007), impedindo assim o seqüestro das hexamerinas (**Fig. 7**).

Diferentes hexamerinas coexistem em uma mesma espécie de inseto e suas origens têm sido atribuídas a eventos de duplicação gênica e diversificação que resultaram em múltiplos parálogos (Burmester 1999) e, possivelmente, à aquisição de novas funções (Hagner-Holler *et al.* 2007). Algumas dessas moléculas contêm, em sua composição, uma porcentagem relativamente alta de aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano) ou metionina, ou glutamina (Telfer e Kunkel 1991). Hexamerinas aromáticas (ou arilforinas), assim como as ricas em metionina, são encontradas em diferentes ordens de insetos, enquanto aquelas contendo alta porcentagem de glutamina são, aparentemente, restritas aos Hymenoptera (Martinez *et al.* 2000; Bitondi *et al.* 2006). É provável que essas particularidades na composição de aminoácidos sirvam para atender a necessidades especiais do desenvolvimento.

Nesse contexto, há evidências de que certas hexamerinas participam do processo de esclerotização do exoesqueleto (Peter e Scheller 1991), fornecendo aminoácidos para a síntese de proteínas cuticulares. Outras teriam função no transporte de metabólitos ou hormônios (ecdisteróides e hormônio juvenil), além de outros componentes orgânicos, como a riboflavina (Enderle *et al.* 1983; Magee *et al.* 1994; Braun e Wyatt 1996; Nagamanju *et al.* 2003). Estudos recentes sugerem que essas proteínas de estocagem podem atuar, também, no processo de diferenciação de castas em cupins, via regulação dos níveis de hormônio juvenil

(Zhou *et al.* 2006, 2007), e no sistema de resposta imune (humoral) dos insetos em geral (Beresford *et al.* 1997). Além disso, a detecção de grânulos de hexamerinas nas células do corpo gorduroso de alguns insetos adultos sugere que essas moléculas constituem fontes de aminoácidos para a produção de proteínas do vitelo dos ovos e são, portanto, coadjuvantes no processo de reprodução (Wang e Haunerland 1991; Roberts *et al.* 1991; Faria *et al.* 1994; Haunerland 1996).

2.1 Hexamerinas de *Apis mellifera*

Ryan *et al.* (1984) foram os primeiros a detectar uma subunidade de hexamerina de 74kDa na hemolinfa de abelhas *A. mellifera* e para isto utilizaram um anticorpo que reagia contra uma hexamerina de *Manduca sexta*. Mais de uma década depois, Danty *et al.* (1998) detectaram quatro subunidades de hexamerinas na hemolinfa dessa abelha, as quais foram denominadas HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c e HEX 80-110, de acordo com suas respectivas massas moleculares aproximadas, conforme determinado por SDS-PAGE. Aparentemente, a hexamerina caracterizada por Ryan *et al.* (1984) corresponde à HEX 70b de Danty *et al.* (1998). Estes autores também verificaram que as subunidades de 70 kDa tinham N-terminais distintos, enquanto aquelas de massa molecular entre 80 e 110 kDa compartilhavam uma sequência N-terminal comum, o que sugere que elas representam isoformas secundárias de uma única sequência primária de aminoácidos, ou seja, da HEX 110. A **Fig. 8** mostra o perfil de migração em SDS-PAGE destas subunidades de hexamerinas de *A. mellifera*. Os dados de Danty *et al.* (1998) sugeriram a existência de, no mínimo, quatro genes codificadores de hexamerinas em *A. mellifera*.

Figura 8: Esquema mostrando as subunidades de hexamerinas (HEX 70a,b,c e 110) detectadas na hemolinfa de *A. mellifera* submetida a SDS-PAGE em comparação com marcadores de massa molecular (à esquerda).

Um destes genes, *hex 70b*, foi seqüenciado e caracterizado ainda antes da publicação do genoma de *A. mellifera*, utilizando-se *primers* desenhados com base na seqüência N-terminal da subunidade correspondente (Cunha *et al.* 2005) Sua expressão foi estudada em relação à ontogênese das operárias e à regulação hormonal da metamorfose. Foi verificado que este gene está ativo durante o estágio larval e que a abrupta redução da abundância de transcritos de *hex70b* coincidia com a diminuição dos títulos de hormônio juvenil e ecdisteróides que antecede a muda metamórfica, sugerindo regulação positiva, em nível de transcrição, por ambos os hormônios. Esta hipótese foi experimentalmente confirmada. O tratamento de larvas de último estágio com estes hormônios resultou em significativo prolongamento do período de expressão de *hex 70b* em comparação às larvas controle, não tratadas, assim evidenciando que altos títulos de hormônio juvenil e ecdisteróides são necessários para a produção de altas taxas de transcritos de *hex 70b* (Cunha *et al.* 2005). No entanto, a drástica diminuição da biossíntese de hexamerinas durante a muda metamórfica de *A. mellifera* e de outros insetos tem sido atribuída não somente a variações hormonais, mas também à interrupção da ingestão de nutrientes que ocorre no final do estágio larval, em preparação para a metamorfose (Webb e Riddiford 1988a, b; Telang *et al.* 2002; Cunha *et al.* 2005).

No estágio adulto, a abundância de hexamerinas na hemolinfa pode ser também, susceptível à dieta alimentar. Abelhas operárias adultas de 7 dias de idade ainda conservam um pequeno estoque de HEX 70b na hemolinfa, o qual diminui consideravelmente nas abelhas submetidas a uma dieta alimentar desprovida de proteínas. Aparentemente, neste caso, as moléculas de HEX 70b são utilizadas para suprir a deficiência de aminoácidos da dieta alimentar (Cunha *et al.* 2005).

O seqüenciamento e anotação do genoma de *A. mellifera* (The Honeybee Genome Sequencing Consortium 2006) facilitaram a caracterização da seqüência nucleotídica do gene

hex 110 utilizando-se como referência a região N-terminal da respectiva subunidade, determinada por Danty *et al.* (1998). *Primers* específicos foram desenhados e utilizados em experimentos de RT-PCR para a amplificação de um fragmento de cDNA de 180 pb. Após clonagem e sequenciamento para confirmação da identidade deste fragmento, estudos de expressão mostraram grande abundância de transcritos *hex 110* em larvas e em operárias adultas. Experimentos de manipulação da dieta alimentar e do *status* reprodutivo das operárias adultas mostraram que os níveis de transcritos *hex 110* correlacionavam-se positivamente com a ingestão de dieta rica em proteínas e com a presença de ovários ativos em operárias órfãs. Estes resultados mostraram que o gene *hex 110* é nutricionalmente regulado e que a reprodução demanda aumento de expressão deste gene (Bitondi *et al.* 2006).

Os trabalhos de Cunha *et al.* (2005) e Bitondi *et al.* (2006) evidenciaram que os dois genes codificadores de hexamerinas de *A. mellifera* até então estudados apresentavam características estruturais peculiares e distintos perfis de expressão, indicando diversidade de funções no ciclo de vida. Com o intuito de explorar a diversidade intra-específica desta família de genes, procedemos à clonagem e sequenciamento da região codificadora de dois dos genes codificadores de hexamerinas que ainda não tinham sido caracterizados, *hex 70a* e *hex 70c*. Além disto, estendemos as análises do gene *hex110*, sequenciando totalmente sua região codificadora. Também aprofundamos os estudos de expressão deste gene e de *hex 70b*. Estes estudos abrangeram aspectos marcantes do ciclo de vida de *A. mellifera*, tais como, diferenciação de castas, metamorfose e reprodução.

OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho consistiu em realizar uma análise comparativa da estrutura gênica e dos perfis de expressão dos quatro genes codificadores de hexamerinas em *A. mellifera*, com a finalidade de estabelecer possíveis funções alternativas em aspectos marcantes do ciclo de vida abrangendo a diferenciação de castas, a metamorfose e a reprodução.

Os seguintes objetivos específicos propostos foram:

- (1) Isolar, clonar e seqüenciar os cDNAs correspondentes aos genes codificadores de hexamerinas: *hex 70a*, *hex 70c* e *hex 110*. Analisar qualitativa e quantitativamente a expressão temporal destes genes no corpo gorduroso, focando, principalmente, a transição larval-pupal e o processo reprodutivo.
- (2) Analisar a expressão dos genes *hex70a*, *hex70b*, *hex70c* e *hex110* nos testículos e ovários com a finalidade de averiguar eventual função no processo reprodutivo.
- (3) Investigar se a expressão de *hex 70a* é regulada pela qualidade da dieta alimentar.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material biológico

Abelhas africanizadas *A. mellifera* foram obtidas no apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

1.1. Obtenção de operárias e rainhas em diferentes estágios e fases da ontogênese

Para obtenção de rainhas e operárias em diferentes fases da ontogênese procedemos ao aprisionamento periódico de rainhas reprodutivas, utilizando-se uma tela excludora adaptada sobre uma área do favo contendo células vazias. Esta tela não restringe a passagem das operárias, somente de rainhas e zangões. Rainhas foram individualmente aprisionadas por um período de 6 horas, durante o qual elas são normalmente alimentadas por operárias nutridoras. Em seguida, foram liberadas e as células dos favos contendo os ovos postos foram mapeadas. A tela foi então novamente adaptada sobre a área de postura para se evitar o retorno da rainha e oviposição recorrente. Subseqüentemente, embriões, larvas e pupas de operárias, com idades sincronizadas, foram coletadas para extração de RNA. Eventualmente, larvas de 1º estágio, com idades sincronizadas, foram utilizadas para a produção de rainhas, após transferência para cúpulas contendo geléia real e manutenção em colônias-recrias de onde eram coletadas nas diferentes fases larvais e pupais. Às vésperas da emergência, cada cúpula contendo uma rainha era adaptada a um pequeno frasco de vidro e colocada em estufa, em condições de umidade relativa (80%) e temperatura (34°C) semelhantes às da colméia. As rainhas que emergiam nestes frascos eram utilizadas para extração de RNA, ou eram introduzidas em colméias órfãs.

1.2. Obtenção de zangões em diferentes estágios e fases da ontogênese

Zangões (larvas, pupas, adultos-faratos e adultos) foram obtidos de colméias regulares, contendo uma rainha, e de colméias órfãs, sem rainha. Portanto, foram utilizados zangões produzidos por rainhas e por operárias poedeiras.

1.3. Identificação das diferentes fases da ontogênese de rainhas, operárias e zangões

Operárias e rainhas em diferentes estágios e fases da ontogênese foram identificadas de acordo com os critérios de Michelette e Soares (1993) e Rembold *et al.* (1980) (**Tabelas I e II - Anexo**), que apresentaram um perfil detalhado do desenvolvimento pré-imaginal de abelhas africanizadas e européias (Europa Oriental), respectivamente, baseado em características morfológicas. As larvas de operárias, rainhas e zangões foram agrupadas em dois estágios (L₄ e L₅) definidos com base no peso corporal e na ocorrência da ecdise. O 5º e último estágio larval é o mais longo de todos, sendo subdividido em três fases: a de alimentação (L₅F), de tecelagem do casulo (L₅S) e prepupal (PP) que representa o estágio de transição entre o estágio larval e o pupal (equivalente à pupa farata). As pupas de operárias e rainhas foram classificadas em sete categorias e as de zangões, em 13 categorias (Tozetto *et al.* 2007) (**Tabela III - Anexo**), usando como parâmetros a cor do olho e a pigmentação da cutícula torácica.

1.4. Obtenção de rainhas, operárias e zangões adultos com idades conhecidas

Para obtenção de adultos com idades conhecidas, favos contendo pupas de operárias e/ou zangões prestes a emergir foram retirados das colônias, inseridos em caixas cercadas por tela e colocados em uma incubadora com temperatura de 34°C e 80% umidade relativa. Rainhas às vésperas da emergência também foram transferidas em suas cúpulas para estufas nas mesmas condições de umidade relativa e temperatura. Rainhas, operárias e zangões com

0-16 horas pós-emergência foram coletados e marcados com tinta (Testors Corporation – USA), na região dorsal do tórax. Operárias e zangões foram devolvidos às colméias de origem. Rainhas foram individualmente introduzidas em colméias órfãs. Fêmeas e machos foram, então, coletados durante momentos específicos da vida adulta: 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 20, 24 e 30 dias para operárias; 3 e 6 dias para rainhas; 5, 6, 8 e 12 dias para zangões.

1.5. Obtenção de operárias órfãs

Operárias adultas foram introduzidas em uma colméia órfã e mantidas nesta condição de orfandade por 21 dias para induzir a ativação dos seus ovários. Elas, então, foram coletadas e dissecadas para a classificação dos seus ovários em ativos (apresentando folículos vitelogênicos ou pré-vitelogênicos), e inativos (apresentando folículos não desenvolvidos). Corpo gorduroso dessas operárias contendo ovários ativos ou inativos foi utilizado para extração de RNA e de proteínas.

1.6. Coleta de operárias para os experimentos de manipulação da dieta alimentar

Nos experimentos para verificação da influência da dieta alimentar sobre a expressão de *hex 70a*, operárias recém-emergidas foram coletadas e separadas em 3 grupos de 40 abelhas, que foram confinadas em caixas de madeira medindo 8x11x13cm. Durante seis dias estas caixas foram mantidas em incubadora, nas mesmas condições de temperatura e umidade relativa acima mencionadas. Durante este período cada grupo de abelhas foi alimentado com dietas distintas: **1)** xarope (50% de açúcar em água); **2)** *beebread* (xarope e pólen na proporção 7 : 3), e **3)** geléia real (xarope e geléia real, na mesma proporção). O alimento foi renovado diariamente e água foi oferecida *ad libitum* a todos os grupos. No 6º dia, as operárias foram coletadas para extração de RNA.

2. Seqüenciamento completo da região codificadora

2.1. Caracterização *in silico*

As regiões N-terminais das subunidades de hexamerinas de *A. mellifera* caracterizadas por Danty *et al.* (1998) foram utilizadas para localização de polipeptídeos no banco de dados GenBank-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As seqüências N-terminais HEX 70a: EYYDTKTADKDFLLKQKKVYNLLYRVAQPALA?ITWYNEG, HEX 70c: AYYAGRHTADMFFLH, e HEX 110: APNVKQRAADQDLLNKQQDVIQLLQKISQIPNQELQNLG identificaram as seguintes proteínas preditas: XP_392867.2 (*hex 70a*, 1411 aminoácidos), XP_392869.2 (*hex 70c*, 686 aminoácidos) e XP_624041 (*hex 110*, 1025 aminoácidos). As seqüências de nucleotídeos correspondentes (XM_392867; XM_392869; XM_624038.2, respectivamente) também foram identificadas. Essas seqüências foram anotadas manualmente, *in silico*, no genoma de *A. mellifera* (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/> - versão 4.0) com auxílio da plataforma Artemis 7.0 (Rutherford *et al.* 2000). As seqüências anotadas foram utilizadas para o desenho de *primers* específicos (**Tabelas IV, V e VI – Anexo**) para determinação experimental das seqüências codificadoras completas (CDS) dos genes *hex 70a*, *hex 70c* e *hex 110*.

2.2. Purificação dos cDNAs amplificados por PCR

Os fragmentos de cDNA de *hex 70a*, obtidos com a combinação de *primers* 1F/2R e 3F/5R, foram amplificados por PCR e purificados utilizando-se o Kit *PureLink Quick Gel Extraction System* (InvitrogenTM, Life Technologies). O mesmo procedimento foi utilizado para os fragmentos de cDNA de *hex 70c*, isolados com a combinação de *primers* PIF/2R e 3F/PIR; e para os fragmentos de cDNA de *hex 110*, obtidos combinando-se os *primers* 0F/2R e 2F/5R.

2.3. Preparo de células eletrocompetentes - *Escherichia coli* linhagem DH5 α

Escherichia coli da linhagem DH5 α mantidas a -70°C foram inoculadas em 5 mL de meio de cultivo LB (Luria Bertani) a 37°C sob agitação (180 rpm) por 16 horas. Desse cultivo líquido, 200 μ L foram utilizados para inocular 500 mL de meio LB a 37°C sob agitação (230 rpm) por 16 horas até atingir densidade óptica de 0,5 - 0,6, verificada em comprimento de onda de 595 nm (Ultrospec 2100 pro – *Pharmacia*). As células, então, foram mantidas em gelo por 30 min e centrifugadas a 6000 $\times$ g por 5 min a 4°C. O precipitado foi ressuspendido em 5 mL de cloreto de cálcio 0,1 M, seguido de centrifugação a 6000 $\times$ g por 5 min a 4°C. O precipitado foi novamente ressuspendido em 5 mL de cloreto de cálcio 0,1 M acrescido de glicerol (15%). Em seguida, centrifugou-se a 5000 $\times$ g por 15 min a 4°C e ao *pellet* foi adicionado glicerol. Alíquotas de 250 μ L foram armazenadas à -70°C.

2.4. Clonagem

Os fragmentos de cDNA amplificados e analisados em gel de agarose foram utilizados para clonagem. A ligação ao plasmídeo foi realizada através do kit *pGEM-T Easy* (*Promega*) a partir de 3 μ L do cDNA purificado, 1 μ L do plasmídeo, 1 μ L de T4 DNA ligase e 5 μ L de tampão de ligação para T4 DNA ligase. Após incubação a 4°C por 16 horas, para otimizar a reação e, desta forma, aumentar o número de colônias transformantes, 3 μ L da mistura de ligação foram utilizados para transformar 250 μ L de células competentes (*E. coli*, linhagem DH5 α) através de choque térmico (42°C por 1 min). Alternativamente, foi também utilizado para clonagem o Kit PCR 2.1 Topo (Invitrogen), no qual 4 μ L do cDNA purificado, 1 μ L de solução salina (NaCl 1,2 M e MgCl₂ 0,06 M) e 2 μ L de vetor Topo foram misturados e incubados por 10-30 min em temperatura ambiente, sendo imediatamente transferidos para o gelo, onde foram mantidos por 2 min. Somente, então, foram utilizados para transformar 100

μL de células competentes (*E. coli* da linhagem DH5α), através de choque térmico (42°C por 1 min). As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio sólido LB com ampicilina (200 mg/mL), em presença de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactosidase – 50mg/mL) e IPTG (isopropilthio-beta-D-galactosidase – 200mg/mL). Após 16 horas de incubação a 37°C, os clones positivos (colônias brancas) foram inoculados em meio LB líquido com ampicilina (200 mg/mL) por mais 16 horas a 37°C, sob agitação de 180 rpm.

Após clonagem, os plasmídeos com os insertos foram isolados utilizando-se colunas do kit de *miniprep FastPlasmid Mini* (Eppendorf) ou *Promega Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification system*, de acordo com os respectivos protocolos do fabricante. A confirmação da presença dos insertos foi realizada através da digestão dos plasmídios com enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen) por 2 horas a 37°C, visto que o sítio de restrição para esta endonuclease flanqueia o sítio de policlonagem do vetor, destacando o fragmento contendo o inserto. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1x, corado com brometo de etídeo.

2.5. Sequenciamento e análise das seqüências

Clones positivos, contendo insertos, foram seqüenciados pelo método de Sanger, em sistema de seqüenciamento automático *ABI Prism 310* (Applied Biosystems). Para cada reação de amplificação, foram usados 2 μL de *BigDye* (Perkin Elmer), 2 μL de tampão de seqüenciamento, 2 μL de mini-preparação plasmidial, 3 μL de água estéril e 1 μL de *primer* sense (F-Forward) ou 1 μL de *primer* antisense (R-Reverse) (**Tabelas IV, V e VI - Anexo**) para um volume final de 10 μL. As amplificações ocorreram em 25 ciclos de 96°C - 10 s, 50°C - 5 s e 60°C - 4 min. Os produtos de reação foram precipitados por isopropanol 75%, ressuspendidos em tampão *Template Supression Reagent* com EDTA (Applied Biosystems),

desnaturados a 94°C por 2 min e submetidos a eletroforese capilar em aparelho *ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

As seqüências obtidas foram analisadas por meio do programa *Sequencher™ version 4.7 for Windows* (Gene Codes Corporation) que avalia as seqüências pela qualidade dos eletroferogramas gerados pelo seqüenciador, com posterior anotação das mesmas sobre o genoma, com auxílio da plataforma Artemis 7.0 (Rutherford *et al.* 2000).

2.6. Análise de similaridade

As seqüências nucleotídicas consenso dos genes *hex70a*, *hex70c* e *hex110*, obtidas por sequenciamento e analisadas *in silico*, foram submetidas ao GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sob os seguintes números de acesso: **EF591128** para *hex 70a*; **EF589162** para *hex 70c*; **EU105212** para *hex 110*. As seqüências de aminoácidos (deduzidas) das respectivas subunidades, juntamente com seqüências de proteínas de *A. mellifera* e de outros organismos, pertencentes à mesma família (HEX 110: **ABU92559**; HEX 70a: **ABQ59246**; HEX 70c: **ABQ84439**; HEX 70b: **AAT11850**; Hexamerin 2β *Aedes aegypti*: **EAT33979**; Hemocianina *Litopennaeus vannamei*: **CAB85965**; profenoloxidase *A. mellifera*: **AAO72539**; seqüências preditas de *Nasonia vitripennis* **XP_001607029.1**, **XP_001607012.1**, **XP_001604915.1**, **XP_001605292.1** e **XP_001600430.1**) foram utilizadas para a construção de múltiplos alinhamentos utilizando-se o programa ClustalW (<http://align.genome.jp/>) e de um dendrograma de similaridade utilizando-se o método de *neighbor-joining* (programa MEGA v3.1, Kumar *et al.* 2004).

3. Estudo da expressão dos genes *hex 70a*, *hex 70b*, *hex 70c* e *hex 110*

3.1. Extração do RNA total e síntese do cDNA

Larvas e pupas inteiras de abelhas melíferas foram homogenizadas em 1 mL de reagente Trizol (TRIzol[®] Reagent, Invitrogen) para a extração do RNA total, conforme protocolo do fabricante. Adultos tiveram o intestino retirado e descartado para, então, serem estocados em 1 mL de reagente Trizol. Para os estudos de expressão gênica em órgãos e tecidos, os testículos, ovários, o tegumento abdominal dorsal que contém o corpo gorduroso em sua face interna, foram dissecados em Ringer para insetos (0,5% NaCl; 0,042% KCl; 0,025% CaCl₂. 2H₂O) e homogeneizados em 500 µL de Trizol. Após a extração, os RNAs totais foram tratados com 1 µL (1 U/µL) de DNase I (Promega) na proporção 1:10 em água milli-Q por 37°C - 40 min, seguida de inativação desta enzima a 70°C por 15 min. A quantidade de RNA foi estimada por espectrofotometria utilizando-se comprimento de onda de 260 nm (NanoDrop[®] ND-1000, *NanoDrop Technologies*). Para avaliação do grau de pureza dos RNAs foi utilizada a razão entre as leituras de 260 e 280 nm, sendo considerada apropriada para síntese de cDNA as amostras que apresentaram valores entre 1,8-2,0. Aliquotas de RNA total contendo 1 ou 2,5 µg, devidamente quantificadas, foram utilizadas para síntese da primeira fita de cDNA, juntamente com oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen) na reação de transcrição reversa (RT) com a enzima Superscript II[™] (Invitrogen).

3.2. PCR e análise por eletroforese

Para as amplificações por PCR foram utilizados os cDNAs sintetizados a partir do RNA total e os *primers* específicos para os genes *hex70a* (JUF e JUR, **Tabela IV - Anexo**), *hex 70b* (*foward*: 5'-ATC CGC TCT TCA AAT GTG GTC TAC-3'; *reverse*: 5'-GTG TTG CTT CCG CTT TTC AGG-3'), *hex 70c* (JUF e JUR, **Tabela V - Anexo**) e *hex 110* (2F e 2R, **Tabela VI - Anexo**). As condições de PCR para os cDNAs obtidos de 2,5 µg de RNA total foram: 94°C por 2 min, seguido por 27 ciclos de 94°C, 30 s; 58°C, 1 min; 72°C, 1 min, e extensão final a 72°C por 5 min, para os genes *hex70a*, *hex 70c* e *hex 110*. Para o gene *hex*

70b, as condições de PCR foram: 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94°C, 30 s; 52°C, 45 s; 72°C, 1 min, e extensão final a 72°C por 10 min. As reações foram realizadas com 1 µL de *primer* forward e reverse (10 µM), 1 µL cDNA (diluído 10 vezes), 9,5 µL de *Eppendorf Master Mix 2,5X* (10X PCR *buffer* [200 mM tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl]; 50 mM MgCl₂; 25 mM dNTP mix [100 mM de solução de: dTTP; dATP; dGTP e dCTP]; *Taq DNA polymerase* [5 U/µL]), totalizando um volume de 25 µL com água bidestilada estéril. O controle da amplificação foi realizado utilizando-se *primers* específicos para *actina* de *A. mellifera* (número de acesso no GenBank: AB023025). Neste caso, as condições de amplificação foram às mesmas usadas para os genes *hex70a*, *hex 70c* e *hex 110*, com exceção da temperatura de anelamento dos *primers* específicos para a *actina* que foi de 60°C e o número de ciclos, 30.

Para análise dos produtos de amplificação por PCR, foram adicionados a estes 2,5 µL de tampão de amostra (1 µL tampão da amostra 10X: 80 µL de EDTA 0,5 M; 720 µL de formaldeído 37%; 2 mL de glicerol; 3,08 mL de formamida; 5 mL de tampão 10X MOPS e 0,5% de azul de bromofenol e xilenocianol). Esta mistura foi aplicada em gel de agarose 1,2% em tampão 1X TBE (0,45 M Tris-base; 0,45 M ácido bórico; 0,5 M EDTA; pH 8,0) contendo brometo de etídio (0,3 µL/mL de agarose). O gel foi submetido à eletroforese em corrente constante de 100 V, por 1h. Os resultados foram visualizados e documentados digitalmente com o uso de um foto-documentador KODAK EDAS 290. O λ DNA/*Hind* III *Fragments* (Invitrogen™, *Life Technologies*) ou *DNA Ladder* (Promega), de 100 pb, foram utilizados como marcadores do tamanho do fragmento amplificado.

3.3. RT-PCR em Tempo Real

Para comparar quantitativamente os níveis de mRNA de *hex 70a*, *hex 70b*, *hex70c* e *hex 110* entre as diferentes fases do desenvolvimento de operárias, rainhas e zangões, foi

utilizado o método quantitativo de RT-PCR em Tempo Real (7500 Real Time PCR System - Applied Biosystems). A reação de amplificação, com volume final de 20 µL, continha 10 µL de SYBR® Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), 1 µL de cDNA (diluído 10X), 7,4 µL de água destilada e 0,8 µL de cada *primer* específico (RTR e RTF para *hex 70a*; 2F e 1R para *hex 70c*; 3R e 4F para *hex 110*; **Tabelas IV e V - Anexo**; RTR – 5'-ACG AAG ACA GAT TCG TGG CT-3' e RTF – 5'-ATA CGA CGA GTT CGG TCA TG-3' para *hex 70b*). Cada reação foi preparada em duplicata (da mesma amostra) e para cada fase do desenvolvimento, foram analisadas três amostras independentes. As condições de PCR foram: 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Os dados foram normalizados utilizando-se os níveis de mRNA de *actina* ou *rp49* (*ribosomal protein 49* - número de acesso no GenBank: AF441189) (*reverse* – 5'-TTG AGC ACG TTC AAC AAT GG-3'; *forward* – 5'-CGT CAT ATG TTG CCA ACT GGT-3') de *A. mellifera*. A quantidade relativa dos transcritos foi calculada usando o método comparativo Ct (Applied Biosystems, *User bulletin* # 2).

3.4. Análise estatística

Diferenças estatísticas entre as quantidades relativas de transcritos estimadas por RT-PCR em Tempo Real foram determinadas por análise de variância (ANOVA) (SigmaStat 3.5). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4. Localização das proteínas

4.1. Coleta do material

Para a detecção das subunidades de hexamerinas, a hemolinfa de operárias, rainhas e zangões em diferentes estágios do desenvolvimento foi coletada inserindo-se um microcapilar na cutícula abdominal dorsal, entre o 3º e 4º tergitos. Às alíquotas de hemolinfa

obtidas por sucção foram estocadas a -20°C e oportunamente processadas para quantificação de proteína total e eletroforese em poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Ovários de rainhas e operárias, assim como embriões, foram homogeneizados em água destilada e centrifugados a 1500 $\times$ g por 5 min a 4°C. Alíquotas dos sobrenadantes, assim como de hemolinfa, tiveram seu teor de proteínas totais determinados por espectrofotometria (Ultrospec 2100 pro – *Pharmacia*), pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina em curvas padrão (Bradford 1976). Proteínas de testículos foram purificadas usando reagente Trizol (Invitrogen) e quantificadas pelo método do ácido bicinonínico (Smith *et al.* 1985). Alíquotas de amostras contendo 1 μ g de proteínas foram analisadas por SDS-PAGE e alíquotas contendo 5 μ g de proteínas foram submetidas a *Western blot*.

4.2. SDS-PAGE

As proteínas da hemolinfa e dos diferentes tecidos foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS, contendo 7,5% da solução de acrilamida/bis-acrilamida. O procedimento baseou-se na descrição de Laemmli (1970), com algumas modificações. O gel de separação, medindo 12x10x0,09cm, foi preparado com 2,5 mL de solução de acrilamida (30%)/bis-acrilamida(0,8%), 5 mL de tampão Tris-HCl 0,15 M pH 8,8, 2,3 mL de água destilada, 40 μ L de TEMED e 190 μ L de persulfato de amônia a 1%. O gel de empilhamento (4,26% de acrilamida/bis-acrilamida) foi preparado com 0,375 mL de acrilamida (30%)/bis-acrilamida (0,8%), 1,38 mL de tampão Tris-HCl 0,024M pH 6,8, 0,825 mL de água destilada, 10 μ L de TEMED e 51 μ L de APS 5%. O tampão usado nas cubas dos eletrodos era composto por 1,515 g de Tris-Base, 7,2 g de glicina, 0,5 g de SDS e 250 mL de água.

4.3. Preparo das amostras

Diferentes volumes de tampão para amostras (1,51 g de Tris-base, 20 mL de glicerol, 4 g SDS, 10 mL 2-mercaptoetanol, 0,002 g de bromofenol *blue*, água destilada até um volume total de 100 mL, pH 6,75) foram adicionados às alíquotas de extratos de tecidos ou hemolinfa para perfazer 1-5 µg de proteínas. As amostras foram desnaturadas a 100°C por 2 min e aplicadas em gel para migração durante 2 horas e 30 min a 4°C, sob corrente de 15-20 mA, juntamente com marcadores de massa molecular.

Terminada a eletroforese, os géis foram corados com Nitrato de Prata (Caetano–Anollés e Gresshoff 1994) para localização das subunidades HEX 110, HEX 70b e HEX 70c. Para a localização da subunidade HEX 70a, que migra na mesma posição de uma das subunidades de lipoforina (Robbs *et al.* 1985) as bandas foram transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose por *Western blot* para subsequente detecção com anticorpo contra HEX 70a.

4.4. *Western blot*

Para transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose (*Immun-Blot™ PVDF Membrane for Protein Blotting* ou *Hybond-ECL™ Nitrocellulose membrane* – Amersham Biosciences) foi preparado um “sanduíche” como se segue: uma placa de acrílico de 9,5x10x0,2cm perfurada; duas esponjas umedecidas em tampão de transferência (9,36 g de glicina, 1,96 g de Tris, 520 mL de água destilada, 130 mL de etanol); dois papéis de filtro umedecidos em tampão de transferência; o gel de poliacrilamida; a membrana umedecida em água destilada e, então, em tampão de transferência; dois papéis de filtro umedecidos em tampão de transferência; uma esponja umedecida em tampão de transferência; outra placa perfurada igual à primeira. O “sanduíche” foi inserido na cuba de transferência, totalmente encoberto com o tampão de

transferência e submetido a corrente elétrica de 30 V por 2 horas em temperatura ambiente. Terminada a transferência, a membrana foi lavada com água destilada por 5 min, seguida de coloração com solução de *Ponceau* por 5 min. A membrana foi, então, cuidadosamente lavada em água destilada, para retirada do excesso de corante, e as bandas correspondentes aos marcadores de massa molecular foram assinaladas com lápis.

A membrana foi incubada em *Blotto* (3,027 g Tris, 0,147 g CaCl₂, 2,337 g NaCl, 50 g leite Molico (*Nestlé*), 500 µL azida 1%, água destilada até obter 500 mL, pH 8,5) por 16 horas, em refrigerador a 4°C. Subsequentemente, esta mistura foi substituída por *Blotto* contendo o anticorpo primário (anti-HEX 70a) na proporção de 1:5000. Este anticorpo monoclonal foi sintetizado e produzido pela Affinity BioReagents a partir da seguinte sequência de aminoácidos da subunidade HEX 70a predita: SYKMHQKPYNKD. Após 1 hora, sob leve agitação em temperatura ambiente, a membrana foi lavada rapidamente por duas vezes em PBS (1 litro de PBS 10X diluído pH 7,2 [16 g NaCl, 0,4 g KCl, 2,88 g Na₂HPO₄, 0,48 g KH₂PO₄, água destilada até completar 200 mL] contendo 500 µL de Tween-20), seguida por outras três lavagens na mesma solução, sendo a primeira de 15 min e as outras duas de 5 min cada.

A membrana foi, então, incubada em 24 mL de PBS-Tween e 2 µL de anticorpo secundário (diluído 1:12000) por 1 hora; e novamente lavada como descrito anteriormente.

Para a revelação, a membrana foi incubada por 1 min utilizando-se 3 mL de cada reagente de detecção (reagentes 1 e 2) do kit *ECL™ Western Blotting Analysis System* (Amersham Biosciences). Filme *Hyperfilm™ MP* (Amersham Biosciences) foi colocado em contato com a membrana em um cassete, por 5 min e, em seguida, em revelador e reforçador GBX Kodak (diluído 50 vezes em água) durante 30 s a 1 min. Subsequentemente o filme foi lavado em água por 2 min e inserido no fixador e reforçador GBX Kodak (diluído 4,5 vezes)

por mais 2 min, para então ser novamente lavado em água. Todo este procedimento de revelação foi realizado em câmara escura.

RESULTADOS

1. Seqüenciamento e análise dos genes codificadores de hexamerinas

A região codificadora completa [ou CDS (*coding sequence*), que compreende a seqüência entre os códons de início (ATG = metionina) e de término da tradução] dos genes *hex 70a*, *hex 70c* e *hex 110* e parte de suas regiões 5´ e 3´ não-traduzidas (*UTRs*) foram seqüenciadas e depositadas no GenBank [números de acesso: **EF591128** (mRNA) e **ABQ59246** (subunidade protéica) para *hex 70a*; **EF589162** (mRNA) e **ABQ84439** (subunidade protéica) para *hex 70c*; **EU105212** (mRNA) e **ABU92559** (subunidade protéica) para *hex 110*]. O alinhamento das CDSs completas (2052nt para *hex 70a*; 2199nt para *hex 70c*; 3027nt para *hex 110*) com as seqüências genômicas correspondentes revelou que *hex 70a* e *70c* consistem, ambos, de 6 éxons e *hex 110* contém 8 éxons, flanqueados por sítios de *splicing* GT/AG (**Fig. 9**). A CDS completa da *hex 70b* foi obtida e caracterizada por Cunha *et al.* (2005) e esse gene consiste de 7 éxons (**Fig. 9**). As subunidades protéicas preditas, HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c e HEX 110, contêm as respectivas seqüências N-terminais determinadas por Danty *et al.* (1998) (HEX 70a: EYYDTKTADKDFLLKQKKVYNLLYRVAQPALA?ITWYNEG, HEX 70b: VPNKVADKTYVTRQK, HEX 70c: AYYAGRHTADMFFLH, HEX 110: APNVKQRAADQDLLNKQQDVILLQKISQIPNQELQNLG), confirmando, portanto, que os genes seqüenciados nesse trabalho codificam estas subunidades.

Figura 9: Estrutura dos genes codificadores das hexamerinas de *A. mellifera*. As setas em preto mostram os códons de iniciação (à esquerda) e término (à direita) da tradução. Éxons e íntrons estão representados por retângulos e linhas, respectivamente, e seus tamanhos estão indicados. Regiões UTR estão marcadas em cinza escuro. O diagrama relativo ao gene *hex 70b* foi baseado nos dados publicados por **Cunha *et al.* 2005**. Entre os genes, a extensão dos éxons e íntrons não obedece a mesma escala.

As subunidades HEX 70a, HEX 70c e HEX 110 são polipeptídeos longos (684, 686 e 1008 aminoácidos, respectivamente) com massa molecular de 81,4, 81,28 e 111,98 kDa e valor de ponto isoelétrico (pI) equivalente a 6,46, 7,94 e 6,43 (calculado pelo programa <http://expasy.org/cgi-bin/protparam>). A subunidade HEX 70a apresenta 18,2% de aminoácidos aromáticos, e a HEX 70c contém 16,9%, o que as inclui na classe das arilforinas, assim denominadas porque são compostas por 15%, ou mais, de aminoácidos aromáticos (Telfer *et al.* 1983). Asparagina, isoleucina, leucina e lisina estão presentes em quantidades relativamente altas (7,2 a 10,4%) na subunidade HEX 70a e leucina e serina estão presentes na proporção de 8,5% e 7,4%, respectivamente, em HEX 70c. HEX 110 se distingue por apresentar uma quantidade muito elevada de glutamina (17,9%) e proporções relativamente

altas de glicina (8,8%), leucina (9,0%) e valina (9,1%). HEX 70b possui alta porcentagem de leucina (10,2%) e valina (10,4%) em sua composição de aminoácidos (**Tabela VII**).

Tabela VII: Composição de aminoácidos das subunidades de hexamerinas de *A. mellifera*.

Tipos de aminoácidos	% de aminoácidos			
	110	70a	70b *	70c
Alanina	6,2	4,7	3,8	4,8
Arginina	3,1	3,5	3,8	4,8
Asparagina	5,4	7,2	7,3	6,7
Aspartato	3,4	5,7	5,1	5,8
Cisteína	0,1	0,3	0,1	0,4
Glutamina	17,9	2,6	3,8	3,1
Glutamato	3,0	6,1	5,1	5,5
Glicina	8,8	4,4	4,8	4,7
Histidina	2,6	2,2	4,0	0,7
Isoleucina	5,6	8,3	3,5	5,4
Leucina	9,0	10,4	10,2	8,5
Lisina	2,6	7,7	5,9	6,9
Metionina	1,0	2,0	4,4	6,4
Fenilalanina	2,4	7,2	5,4	6,7
Prolina	5,2	5,6	5,0	4,1
Serina	6,2	5,6	5,1	7,4
Treonina	3,0	3,8	4,4	4,2
Triptofano	0,7	1,6	0,7	1,2
Tirosina	5,0	9,4	7,0	9,0
Valina	9,1	1,8	10,4	3,6

* Dados sobre HEX 70b foram baseados em **Cunha et al. 2005**.

Todas as subunidades de hexamerinas de *A. mellifera* apresentaram os domínios conservados N, M e C, típicos da proteína ancestral, hemocianina. Uma região característica

das subunidades das hexamerinas é o peptídeo sinal, o qual é constituído por 21, 18, 16 e 21 aminoácidos, respectivamente, nas subunidades HEX 70a (MFIPSHQVWLVLGGLAFSLVGA), HEX 70c (MLSKVVLLVALAAICGAQ), HEX 110 (MRYFIILLALVALGVC) e HEX 70b (MIVIMKAGFLFLASLCLLVQA), conforme determinado pelo programa SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). (Fig. 10).

Figura 10: Domínios conservados presentes nas subunidades das hexamerinas. Regiões contendo os domínios N, M e C, típicos de hemocianina, estão destacadas. A posição dos aminoácidos está indicada nas barras pretas. Entre as subunidades, a extensão dos domínios não obedece a mesma escala.

As seqüências previstas das subunidades de hexamerinas de *A. mellifera* foram comparadas com hexamerinas de um outro Hymenoptera, a vespa parasita *Nasonia vitripennis*, e de *Aedes aegypti*, além de uma hemocianina do crustáceo *Litopenaeus vannamei* (número de acesso: CAB85965) (Fig. 11A) e para isto foi utilizado o programa de alinhamento múltiplo, ClustalW 1.83 (<http://align.genome.jp/>). Uma das hexamerinas de *N. vitripennis* (número de acesso: XP_001607029.1) mostrou-se similar à HEX 70a de *A. mellifera*, com 51% de identidade; outras hexamerinas previstas desta mesma vespa (números de acesso: XP_001607012.1 e XP_001604915.1), mostraram-se similares a HEX 70c, com

50% e 46% de identidade, respectivamente. Entre as hexamerinas de *A. mellifera*, a maior similaridade encontrada foi entre HEX 70a e HEX 70b, com 42% de identidade.

No intuito de obter informação mais detalhada sobre a similaridade das hexamerinas nos Hymenoptera, um dendograma foi gerado, utilizando-se como grupos externos a hemocianina de *L. vannamei* e a profenoloxidase de *A. mellifera* (número de acesso: **AAO72539**). A hexamerina de *A. aegypti* também foi incluída nesta análise (**Fig. 11B**). HEX 70c de *A. mellifera* e duas das hexamerinas de *N. vitripennis* (XP_001604915.1 e XP_001607012.1), apresentaram-se altamente similares, com um ramo bastante robusto. O mesmo foi observado para HEX 70a de *A. mellifera* e XP_001607029.1 de *N. vitripennis*. Dentre as hexamerinas de *A. mellifera*, HEX 110, em termos de composição de aminoácidos, mostrou-se a mais distinta dentre as hexamerinas de *A. mellifera*.

A

		<i>Apis mellifera</i>				<i>Nasonia vitripennis</i>					Aa	Lv
		70a	70b	70c	110	XP_001604915.1	XP_001607012.1	XP_001607029.1	XP_001600430.1	XP_001605292.1		
<i>Apis mellifera</i>	70a	-	42	40	31	38	40	51	30	32	39	27
	70b		-	39	32	35	39	39	33	31	38	27
	70c			-	30	46	50	39	30	30	36	23
	110				-	26	29	28	28	30	31	24
<i>Nasonia vitripennis</i>	XP_001604915.1					-	64	35	27	28	36	25
	XP_001607012.1						-	39	29	30	39	26
	XP_001607029.1							-	31	31	39	28
	XP_001600430.1								-	34	27	25
	XP_001605292.1									-	28	23
	Aa										-	30
	Lv											-

B

Figura 11: Comparação entre as seqüências das subunidades de hexamerinas de *A. mellifera* e *N. vitripennis*. **A)** Análise de similaridade. **B)** Dendrograma construído pelo método de *Neighbor Joining*. As seqüências de *N. vitripennis* estão identificadas pelos seus números de acesso no Banco de Dados do Projeto *Nasonia* (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/nasonia/>). Os números entre os nódulos representam valores de *bootstrap*. A seqüência de uma hexamerina de *A. aegypti* (Aa) foi incluída nas análises. Uma hemocianina de *L. vannamei* (Lv) e a profenoloxidase de *A. mellifera* foram utilizadas como grupos externos.

2. Expressão dos genes codificadores de hexamerinas durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*

2.1. Operárias

Em operárias, os transcritos de *hex 110* foram detectados a partir do 5º estágio larval, ao longo de todo estágio pupal, compreendendo as fases de pupa (Pw) e de adultos faratos (Pp

até Pbd), e no estágio adulto. Na transição entre os estágios larval-pupal e pupal-adulto, a quantidade de transcritos de *hex 110* diminui consistentemente, mas em seguida aumenta, mantendo-se nas operárias adultas até os 30 dias de idade. Este padrão de expressão difere totalmente dos padrões de expressão dos genes *hex 70b* e *hex 70c*, cujos transcritos são detectáveis somente no estágio larval: a abundância de transcritos de *hex 70b* e *hex 70c* decai a níveis basais durante a transição do estágio larval para o pupal (**Fig. 12A**). Análises de amostras de hemolinfa de operárias em desenvolvimento utilizando-se SDS-PAGE seguida de coloração do gel com nitrato de prata, mostraram acúmulo das subunidades HEX 70b e HEX 70c durante o estágio pupal, com esgotamento paulatino deste estoque nas abelhas adultas (**Fig. 12B**). A subunidade HEX 110 está praticamente ausente na hemolinfa de operárias adultas-faratas e adultas, a despeito da presença de seu mRNA nestes estágios (**Fig.12B**). Subunidades HEX 70a migram na mesma posição que uma lipoforina e, portanto, não podem ser inequivocamente identificadas em géis corados com nitrato de prata (**Fig. 12B**).

A

B

Figura 12: **A)** Perfil de expressão dos genes *hex 110*, *hex 70b* e *hex 70c* durante os estágios larval, pupal e adulto de operárias de *A. mellifera*. **A)** Produto de RT-PCR submetido a eletroforese em gel de agarose para verificação da abundância de transcritos de *hex 110*, *hex 70b* e *hex 70c* no corpo gorduroso. O gene da *actina* foi utilizado como controle endógeno e normalizador, por apresentar expressão constitutiva nas fases analisadas; **B)** SDS-PAGE mostrando o acúmulo das subunidades de hexamerinas (HEX 110, HEX 70b e HEX 70c) na hemolinfa. Os valores à esquerda referem-se aos marcadores de massa molecular (M) em kDa. L₅F, L₅S e PP: larvas de 5° estágio (em fase de alimentação, tecelagem de casulo e prepupa, respectivamente); Pw, Pp, Pb, Pbm e Pbd: sucessivas fases do estágio pupal; RN: recém-nascida; os números correspondentes aos indivíduos adultos referem-se à sua idade em dias. As linhas tracejadas indicam o mesmo estágio do desenvolvimento.

O perfil dos transcritos de *hex 70a* durante o desenvolvimento apresentou-se muito semelhante ao perfil dos transcritos de *hex 110*. Ambos os genes se expressam durante todo o desenvolvimento, com consistente diminuição dos níveis de transcritos na transição do estágio pupal para o adulto, embora não tenha havido mudança de abundância de transcritos *hex 70a* durante a transição larval-pupal (compare **Figs. 12A e 13A**). Análises por *Western blot*, utilizando anticorpo monoclonal contra HEX 70a permitiram confirmar que esta subunidade apresenta-se em grandes quantidades no corpo gorduroso de operárias até a metade do estágio

pupal (Pb), e em menores quantidades no estágio adulto (**Fig. 13B**, painel superior). A diminuição na concentração de HEX 70a no corpo gorduroso durante a transição de Pb para Pbm (**Fig. 13B**, painel superior) parece consequência da intensificação da secreção desta proteína, evidenciada pelo aumento de sua abundância na hemolinfa durante a fase Pbm (**Fig. 13B**, painel superior). A **Fig. 13B** também sugere que conforme o desenvolvimento avança, ocorre diminuição da biossíntese de HEX 70a no corpo gorduroso e isto se reflete na diminuição da abundância da subunidade na hemolinfa. Os dados da **Fig. 13** indicam que em contraste com a maioria dos genes de hexamerinas até hoje estudados, o gene *hex 70a* de operárias *A. mellifera* está ativo durante o estágio adulto.

Figura 13: Perfil de expressão de *hex 70a* durante os estágios larval, pupal e adulto de operárias de *A. mellifera*. **A)** Produto de RT-PCR submetido a eletroforese em gel de agarose para verificação da abundância de transcritos de *hex 70a* no corpo gorduroso. O gene da *actina* foi utilizado como controle endógeno e normalizador; **B)** Western blot utilizando anticorpo anti-HEX 70a mostrando a abundância desta proteína no corpo gorduroso e hemolinfa. Os valores à esquerda referem-se aos marcadores de massa molecular em kDa. L₅F, L₅S e PP: larvas de 5º estágio (em fase de alimentação, tecelagem de casulo e prepupa, respectivamente); Pw, Pdp, Pb, Pbm e Pbd: sucessivas fases do estágio pupal; RN: recém-nascida; os números correspondentes aos indivíduos adultos referem-se à sua idade em dias. As linhas tracejadas indicam o mesmo estágio do desenvolvimento.

2.2. Rainhas

Em rainhas, transcritos de *hex 110* são mais abundantes durante o 5º estágio larval e então diminuem em quantidade, gradativamente, durante o estágio pupal. Transcritos de *hex*

70b existem em abundância na fase de alimentação do 5º estágio larval (L₅F), mas sua quantidade decai a níveis praticamente indetectáveis nos estágios subsequentes. mRNA de *hex 70c* é abundante durante todo o 5º estágio larval (fases L₅F, L₅S e PP), mas sua quantidade diminui drasticamente após a muda metamórfica e mantém-se em nível muito baixo até a emergência do adulto, quando não é mais detectado (**Fig. 14A**). Análises utilizando-se SDS-PAGE mostraram que a subunidade HEX 110 existe na hemolinfa até o meio do estágio pupal (Pb). As subunidades HEX 70b e 70c são abundantes na hemolinfa até à fase Pbm, mas diminuem em concentração conforme o desenvolvimento progride (**Fig. 14B**).

Figura 14: Perfil de expressão de *hex 110*, *hex 70b* e *hex 70c* durante os estágios larval, pupal e adulto de rainhas de *A. mellifera*. **A)** Produto de RT-PCR submetido a eletroforese em gel de agarose para verificação da abundância de transcritos de *hex 110*, *hex 70b* e *hex 70c* no corpo gorduroso. O gene da *actina* foi utilizado como controle endógeno e normalizador; **B)** SDS-PAGE mostrando o acúmulo das subunidades de hexamerinas HEX 110, HEX 70b e HEX 70c na hemolinfa. Os valores à esquerda referem-se aos marcadores de massa molecular (M) em kDa. L₅F, L₅S e PP: larvas de 5º estágio (em fase de alimentação, tecelagem de casulo e prepupa, respectivamente); Pw, Pp, Pdp, Pb, Pbl, Pbm e Pbd: sucessivas fases do estágio pupal; RN: recém-nascida; Ov: rainhas em oviposição; 3d e 6d: idade em dias. As linhas tracejadas indicam o mesmo estágio do desenvolvimento.

O perfil de transcritos de *hex 70a* nas rainhas apresentou-se muito semelhante ao das operárias (**Fig. 15A**). No entanto, durante o estágio adulto, rainhas recém-nascidas apresentaram níveis mais altos de transcrito que rainhas virgens com 6 dias de idade, mas não tão elevados quanto em rainhas ovipositoras. Análises por *Western blot* usando o anticorpo específico mostraram que a subunidade HEX 70a se acumula na hemolinfa durante o estágio pupal, com menor concentração na metade deste estágio (fase Pb) que mais ao final (fase

Pbm), e subsequente diminuição dos níveis desta subunidade nas rainhas adultas, tanto nas virgens de 3 dias como nas ovipositoras, mais velhas (**Fig. 15B**).

Figura 15: Perfil de expressão de *hex 70a* durante os estágios larval, pupal e adulto de rainhas de *A. mellifera*. **A)** Produto de RT-PCR submetido a eletroforese em gel de agarose para verificação da abundância de transcritos de *hex 70a* no corpo gorduroso. O gene da *actina* foi utilizado como controle endógeno e normalizador; **B)** Western blot utilizando anticorpo anti-HEX 70A mostrando a abundância desta proteína na hemolinfa. Os valores à esquerda referem-se aos marcadores de massa molecular em kDa. L₅F, L₅S e PP: larvas de 5º estágio (em fase de alimentação, tecelagem de casulo e prepupa, respectivamente); Pw, Pp, Pdp, Pb, Pbl, Pbm e Pbd: sucessivas fases do estágio pupal; RN: recém-nascida; Ov: rainhas em oviposição; 3d e 6d: idade em dias. As linhas tracejadas indicam o mesmo estágio do desenvolvimento.

2.3. Zangões

Assim como em rainhas e operárias, os transcritos das quatro hexamerinas em zangões são muito abundantes no 5º estágio larval (**Figs. 16 e 17**). Após a muda metamórfica, os níveis do mRNA de *hex 110* diminuem consistentemente nos zangões (**Fig. 16A**), de modo similar ao que ocorre nas rainhas (**Fig. 14A**), onde são detectados níveis basais ao longo de todo o período pupal, e em contraste ao observado em operárias (**Fig. 12A**). Assim como em operárias e rainhas, transcritos de *hex 70b* e *hex 70c* não são detectados no corpo gorduroso de zangões após a muda metamórfica (**Fig. 16A**). Análises por SDS-PAGE mostraram que as

respectivas subunidades protéicas são abundantes na hemolinfa de zangões durante quase todo o estágio pupal (Figs. 16).

Figura 16: Perfil de expressão de *hex 110*, *hex 70b* e *hex 70c* durante os estágios larval, pupal e adulto de zangões de *A. mellifera*. **A)** Produto de RT-PCR submetido a eletroforese em gel de agarose para verificação da abundância de transcritos de *hex 110*, *hex 70b* e *hex 70c* no corpo gorduroso. O gene da *actina* foi utilizado como controle endógeno e normalizador; **B)** SDS-PAGE mostrando o acúmulo das subunidades de hexamerinas (HEX 110, HEX 70b e HEX 70c) na hemolinfa. Os valores à esquerda referem-se aos marcadores de massa molecular (M) em kDa. L₅F, L₅S e PP: larvas de 5º estágio (em fase de alimentação, tecelagem de casulo e prepupa, respectivamente); P1-P13: sucessivas fases do estágio pupal; RN: recém-nascido; 5, 6, 8 e 12: idade em dias. As linhas tracejadas indicam o mesmo estágio do desenvolvimento.

Na transição do estágio pupal para o adulto, a quantidade de mRNA de *hex 70a* diminui consistentemente nos zangões, mas aumenta após a emergência. A atividade do gene *hex 70a* aparentemente é retomada após drástica diminuição nos níveis de transcritos ao final do estágio pupal, sugerindo reativação da transcrição. Transcritos *hex 70a* são claramente detectados em zangões de 0-5 dias de idade, mas então novamente diminuem em abundância evidenciando desativação permanente do gene *hex 70a* (Fig. 17A). As análises por *Western*

blot mostram que no corpo gorduroso de zangões em estágio pupal e em recém-nascidos, os níveis da subunidade HEX 70a são similares àqueles encontrados na hemolinfa de operárias jovens (**Fig. 17B**). Assim, a diminuição transiente na produção de transcritos *hex 70a* que antecede a emergência do zangão, não está refletida no *pool* de subunidades acumuladas no corpo gorduroso (**Fig. 17B**).

Figura 17: Perfil de expressão de *hex 70a* durante os estágios larval, pupal e adulto de zangões de *A. mellifera*. **A)** Produto de RT-PCR submetido a eletroforese em gel de agarose para verificação da abundância de transcritos de *hex 70a* no corpo gorduroso. O gene da *actina* foi utilizado como controle endógeno e normalizador; **B)** Western blot utilizando anticorpo anti-HEX 70A mostrando a abundância desta proteína no corpo gorduroso de zangões e hemolinfa de operária jovem. Os valores à esquerda da membrana referem-se aos marcadores de massa molecular em kDa. L₅F, L₅S e PP: larvas de 5º estágio (em fase de alimentação, tecelagem de casulo e prepupa, respectivamente); P2-P13: sucessivas fases do estágio pupal; RN: recém-nascido; 5, 6, 8 e 12: idade em dias. As linhas tracejadas indicam o mesmo estágio do desenvolvimento.

2.4. Análises quantitativas

Os resultados obtidos por RT-PCR semiquantitativa permitiram a visualização do perfil de abundância de transcritos dos genes de hexamerinas durante o desenvolvimento de rainhas, zangões e operárias. Com a finalidade de comparar as quantidades relativas de transcritos dos genes codificadores de hexamerinas entre os diferentes morfotipos de *A. mellifera* (rainhas, operárias e zangões) foram realizadas análises por RT-PCR em Tempo Real. Estas análises abrangeram duas etapas do ciclo de desenvolvimento: a transição larval-

pupal e o estágio adulto. Assim, a expressão dos quatro genes codificadores de hexamerinas foi comparada entre larvas de 4º e 5º estágio e pupas iniciais de rainhas, operárias e zangões. Para a fase adulta, foram quantificados transcritos de *hex70a* e *hex110* que são os únicos genes de hexamerinas que se expressam nesta fase.

Ainda que haja algum descompasso temporal, a modulação da expressão dos genes de hexamerinas mostra semelhanças durante a transição larval-pupal. Nas operárias e zangões, os níveis de transcritos dos quatro genes codificadores de hexamerinas aumentam na fase de alimentação do 5º estágio larval (fase L₅F) (**Fig. 18**). Nas rainhas, este aumento ocorre durante a fase subsequente (L₅S), exceto para a expressão de *hex 70b*, que é maior na fase L₅F. Disso decorre que na fase de alimentação (L₅F), a quantidade relativa de transcritos de hexamerinas é sempre significativamente menor nas rainhas que nas operárias e zangões, exceção para os transcritos *hex 70c*, presentes em maior quantidade em rainhas L₅F que em operárias na mesma fase de desenvolvimento ($P = <0,001$). Da comparação entre as quantidades relativas de transcritos dos genes de hexamerinas nota-se que na fase L₅F, os transcritos de *hex 110* e *hex 70b* alcançam quantidades muito mais elevadas que os transcritos das demais hexamerinas ($P = 0,002$ e $P = 0,001$, respectivamente) (**Fig. 18**).

Verifica-se ainda que já no 4º estágio larval ocorrem diferenças nos níveis de transcritos de *hex 70a* e *hex 70b* (mas não de *hex 110* e *hex 70c*), entre as castas e sexos (**Fig. 18**). Curiosamente, as quantidades relativas de transcritos de *hex 70b* e *hex 70c* são significativamente maiores nas larvas L₅F de zangões que nas fêmeas de mesmo estágio.

Figura 18: Níveis relativos de transcritos de *hex 70a*, *hex 70b*, *hex 70c* e *hex 110* detectados por PCR em Tempo Real no corpo gorduroso de operárias, rainhas e zangões. L4: 4º estágio larval; L5F e L5S: larvas de 5º estágio em fase de alimentação e tecelagem do casulo, respectivamente; Pw: pupa inicial. Cada ponto dos gráficos representa a média de três amostras independentes normalizadas com o gene de expressão constitutiva *rp49*. A quantidade relativa dos transcritos foi calculada segundo o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Níveis de transcritos foram comparados entre os grupos usando o teste *two way* ANOVA. Diferenças estatísticas (** $P = <0,001$ para todas, exceto para *hex 110*, * $P = 0.045$) foram determinadas pelo teste *post hoc* Holm-Sidak (Jandel SigmaStat 3.1 software, Jandel Corporation, USA). Letras indicam diferença significativa: operária $\neq$ rainha e zangão (ab), rainha $\neq$ operária e zangão (ac), zangão $\neq$ operária e rainha (bc), operária $\neq$ rainha $\neq$ zangão (abc).

Nos adultos, os resultados indicam que *hex 70a* e *hex 110* são mais expressos em operárias do que em rainhas, sejam elas virgens ou ovipositoras (**Fig. 19**). Esta diferença, entre rainhas e operárias, é mais acentuada quando analisamos a quantidade de transcritos de *hex 110*, maior em operárias que em rainhas virgens e ovipositoras, na proporção de 288 e 576 vezes, respectivamente. Em relação a *hex 70a*, esta proporção é de 94 e 9 vezes quando se compara as operárias com rainhas virgens e ovipositoras, respectivamente (**Fig. 19**).

Figura 19: Níveis relativos de transcritos de *hex 70a* (A) e *hex 110* (B) detectados por PCR em Tempo Real no corpo gorduroso de operárias e rainhas com 3 dias de idade e rainhas ovipositoras. As barras representam médias de três amostras independentes normalizadas com o gene *rp49*. A quantidade relativa dos transcritos é dada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Applied Biosystems, *User bulletin* # 2). Níveis de transcritos foram comparados entre os grupos usando *one way* ANOVA e o teste *post hoc* Holm-Sidak (Jandel SigmaStat 3.1 *software*, Jandel Corporation, USA). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($P = 0,008$ para *hex 70a*; $P = 0,025$ para *hex 110*).

3. Níveis de expressão de *hex 70a* no corpo gorduroso de operárias órfãs

A expressão de *hex 70a* foi investigada no corpo gorduroso de operárias órfãs com ovários ativos ou com ovários inativos. Os níveis de transcrito de *hex 70a* foram aproximadamente 24 vezes maiores no corpo gorduroso de operárias com ovários ativos do que naquelas que apresentaram ovários inativos (**Fig. 20A**). Maior quantidade de subunidades HEX 70a também foi encontrada nas operárias com ovários ativos (**Fig. 20B**).

Figura 20: Níveis relativos de transcritos de *hex 70a* detectados por PCR em Tempo Real (**A**) e *Western blot* (**B**) no corpo gorduroso de operárias órfãs com ovários ativos ou inativos. As barras representam médias de três amostras independentes normalizadas com o gene *actina*. A quantidade relativa dos transcritos é dada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Applied Biosystems, *User bulletin # 2*). *Western blot* utilizando anticorpo anti-HEX 70A mostram a abundância desta proteína no corpo gorduroso. Os valores à esquerda da membrana de *Western blot* referem-se aos marcadores de massa molecular, em kDa.

4. Expressão de genes codificadores de hexamerinas associada ao desenvolvimento das gônadas e reprodução

A expressão dos genes *hex 70a*, *hex 70b*, *hex 70c* e *hex 110* foi investigada nos ovários de rainhas e operárias e nos testículos de zangões durante estágios pré-imaginais e nos adultos. Além disso, nos estágios em que foram identificados transcritos de *hex 70a*, foi também checada a presença da respectiva subunidade protéica.

Altos níveis de transcritos de *hex 110* foram detectados nos ovários de operárias durante o 5º estágio larval, com subsequente diminuição em pupas iniciais (Pw). Transcritos de *hex 70b* e *hex 70c* não foram detectados nas gônadas das fêmeas (**Fig. 21**).

Figura 21: Expressão de *hex 110*, *hex 70b* e *hex 70c* nos ovários de operárias em desenvolvimento. Produto de RT-PCR submetido a eletroforese em gel de agarose para verificação da abundância de transcritos. A expressão de *actina* foi utilizada como controle endógeno e normalizador das quantidades de cDNA. L₅F e L₅S: larvas de 5º estágio em processo de alimentação e tecelagem do casulo, respectivamente. Pw, Pp, Pbl, Pbm e Pbd: sucessivas fases do estágio pupal.

De modo similar à expressão de *hex 110*, transcritos de *hex 70a* também foram detectados nas gônadas de operárias em 5º estágio larval e em início de estágio pupal (Pw). Mas ao contrário de *hex 110*, a expressão do gene *hex 70a* se prolonga nas gônadas durante o estágio pupal, mostrando-se abundante até à fase Pb, quando então diminui consideravelmente na fase Pbm e não é mais detectada nas gônadas de pupas Pbd e de operárias adultas (**Fig. 22A**). *Western blots* utilizando anticorpo específico confirmaram estes resultados: subunidades HEX 70a foram detectadas nos ovários de operárias em estágio pupal (fase Pb), mas não nos de operárias adultas (**Fig. 22B**).

Figura 22: Expressão de *hex 70a* nos ovários de operárias em desenvolvimento e adultas. **A)** Produto de RT-PCR submetido a eletroforese em gel de agarose para verificação da abundância dos transcritos de *hex 70a*. A expressão de *actina* foi utilizada como controle endógeno e normalizador das quantidades de cDNA. **B)** *Western blot* de extratos de ovários marcados com anticorpo anti-HEX 70a. L₅F e L₅S: larvas de 5º estágio em processo de alimentação e tecelagem do casulo, respectivamente; Pw, Pp, Pb, Pbm e Pbd: sucessivas fases do estágio pupal; 0-3, 15-20 e 20-30: idade de operárias adultas em dias. Os valores à esquerda da membrana de *Western blot* referem-se aos marcadores de massa molecular em kDa. Amostras do mesmo estágio do desenvolvimento estão conectadas por linhas tracejadas.

Já nos ovários de rainhas em desenvolvimento a expressão de *hex 110* foi evidenciada em todas as fases analisadas, com altos níveis de transcritos nas fases iniciais do estágio pupal (fases Pw, Pp e Pb), e diminuição da abundância de transcritos ao final do estágio pupal e nas rainhas adultas (**Fig. 23**). Transcritos de *hex 70b* foram detectados nos ovários de rainhas em 4º estágio larval e transcritos de *hex 70c* não foram detectados nas gônadas de rainhas (**Fig.23**).

Figura 23: Expressão de *hex 110*, *hex 70b* e *hex 70c* nos ovários de rainhas em desenvolvimento e adultas. Produto de RT-PCR submetido a eletroforese em gel de agarose para verificação da abundância de transcritos. A expressão de *actina* foi utilizada como controle endógeno e normalizador das quantidades de cDNA. L₄: 4º estágio larval. Pw, Pp, Pb, Pbl, Pbm e Pbd: sucessivas fases do estágio pupal. RN: rainha recém-emergida. Ov: rainha ovipositora.

O padrão de ocorrência de transcritos de *hex 70a* nos ovários de rainhas (**Fig. 24A**) é similar ao dos ovários de operárias (**Fig. 22A**), no entanto, a expressão deste gene se prolonga nos ovários de rainhas até às fases mais adiantadas do estágio pupal, e ocorre inclusive nos ovários das recém-nascidas. Uma observação interessante foi que rainhas recém-nascidas apresentaram níveis mais altos de transcritos *hex 70a* em seus ovários do que rainhas ovipositoras. Não detectamos expressão do gene *hex 70a* em embriões (**Fig. 24A**). Análises por *Western blot* confirmaram a presença da subunidade HEX 70a nos ovários de rainhas recém-nascidas e ovipositoras. A presença inequívoca destas subunidades nos ovários de rainhas ovipositoras contrapõe-se os níveis quase indetectáveis dos respectivos transcritos (**Fig. 24A, B**).

Figura 24: Expressão de *hex 70a* nos ovários de rainhas em desenvolvimento e adultas, mas não em embriões. **A)** Produto de RT-PCR submetido a eletroforese em gel de agarose para verificação da abundância de transcritos de *hex 70a*. A expressão de *actina* foi utilizada como controle endógeno e normalizador das quantidades de cDNA. **B)** Investigação da presença de subunidades HEX 70a nos ovários de rainha e embriões utilizando-se *Western blot* marcado com anticorpo anti-HEX 70a. L₄: larva de 4º estágio; Pw, Pp, Pb, Pbl, Pbm e Pbd: sucessivas fases do estágio pupal; RN: recém-nascida. Ov: ovipositora; Nu: hemolinfa de operária jovem utilizada como controle. Marcadores de massa molecular (kDa) estão indicados à esquerda da membrana de *Western blot*. Amostras do mesmo estágio do desenvolvimento estão conectadas por linhas tracejadas.

Altos níveis de transcritos de *hex 110* foram detectados nos testículos de zangões em 5º estágio larval e em fase inicial do estágio pupal (P1-P2). Subseqüentemente, os níveis do transcrito decaem abruptamente e a expressão de *hex 110* não é mais detectada nos testículos dos adultos. Transcritos de *hex 70b* também foram detectados, em altos níveis, em testículos de larvas de zangões de 5º estágio (L₅F), mas em baixos níveis, em testículos de zangões em

estágio pupal e recém-nascidos (**Fig. 25**). Não foi detectada expressão do gene *hex 70c* em testículos, em qualquer das fases de desenvolvimento analisadas.

Figura 25: Expressão de *hex 110*, *hex 70b* e *hex 70c* nos testículos de zangões. Produto de RT-PCR submetido a eletroforese em gel de agarose para verificação da abundância de transcritos. A expressão de *actina* foi utilizada como controle endógeno e normalizador das quantidades de cDNA. L₅F e L₅S: larvas de 5º estágio em fase de alimentação e tecelagem do casulo, respectivamente. P1 a P10: fases sucessivas do estágio pupal. RN: zangão recém-nascido.

O gene *hex 70a* se expressa em altos níveis nos testículos de zangões em final de estágio larval (fase PP) e durante todo o estágio pupal, decaindo ao final deste estágio e nos testículos do recém-nascido (**Fig. 26A**). Altos níveis de transcritos de *hex 70a* nos testículos estão correlacionados com o crescimento e maturação destes órgãos durante o estágio pupal. Coincidindo com o término da espermatogênese ao final deste estágio, testículos de zangões pré-emergentes (fase P13 do estágio pupal) e recém-nascidos mostraram significativa diminuição na abundância de transcritos *hex 70a*. Nos testículos de zangões em desenvolvimento, a presença de subunidades HEX 70a foi confirmada por *Western blot* (**Fig. 26B**).

Figura 26: Expressão de *hex 70a* nos testículos de zangões em desenvolvimento. **A)** Produto de RT-PCR submetido a eletroforese em gel de agarose para verificação da abundância de transcritos de *hex 70a*. A expressão de *actina* foi utilizada como controle endógeno e normalizador das quantidades de cDNA. **B)** Subunidades HEX 70a nos testículos de zangões. L₅F e L₅S: larvas de 5º estágio em fase de alimentação e tecelagem do casulo, respectivamente; PP: prepupa; P1 a P13: sucessivas fases do estágio pupal; RN: recém-nascido. Marcadores de massa molecular (kDa) estão indicados à esquerda da membrana de *Western blot*. Amostras do mesmo estágio do desenvolvimento estão conectadas por linhas tracejadas.

5. Expressão de hexamerinas dependente da dieta alimentar

A ativação dos ovários e a produção de ovos, em insetos, são processos que requerem grande demanda de nutrientes. Em vista disso, investigamos a expressão de *hex 70a* no corpo gorduroso de operárias alimentadas com diferentes tipos de dieta. Análises por PCR em Tempo Real mostraram 114 vezes mais transcritos *hex 70a* nas abelhas operárias que receberam *beebread* que naquelas alimentadas com dieta desprovida de proteínas (xarope). Níveis intermediários de transcritos foram detectados em abelhas alimentadas com geléia real, sendo cerca de 24 vezes maior em comparação àquelas alimentadas com xarope (**Fig. 27A**). As análises por *Western blot* corroboraram os resultados obtidos por PCR em Tempo Real:

subunidades HEX 70a são abundantes na hemolinfa de operárias que receberam *beebread*, mas não naquelas que receberam xarope ou geléia real (**Fig. 27B**).

Figura 27: Níveis de transcritos de *hex 70a* e da correspondente subunidade protéica em operárias alimentadas com xarope, *beebread* ou geléia real. **A)** Quantificação relativa dos transcritos de *hex 70a* no corpo gorduroso usando PCR em Tempo Real. Médias de três amostras independentes, normalizadas pela expressão de *actina*. A quantidade relativa de transcritos de *hex 70a* foi calculada usando os valores de $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Os valores médios obtidos das operárias alimentadas com *beebread* ou geléia real foram calculados em relação aos das operárias alimentadas com xarope, considerado como 1. Níveis do transcrito foram comparados entre os grupos usando o teste *one way* ANOVA. Diferenças estatísticas ($P < 0,001$) foram atribuídas pelo teste Tukey (Jandel SigmaStat 3.1 software, Jandel Corporation, USA). **B)** Western blot de pools de hemolinfa obtida de 3 operárias alimentadas com *beebread* ou geléia real ou xarope. Bandas de HEX 70a identificadas utilizando-se o anticorpo específico anti-HEX 70a. Marcadores de massa molecular em kDa estão indicados.

DISCUSSÃO

Quatro genes codificadores de hexamerinas foram encontrados no genoma de *A. mellifera*, *hex 70a*, *hex 70b*, *hex 70c* e *hex 110*. O seqüenciamento da região codificadora completa desses genes revelou domínios altamente conservados mas, também, diferenças estruturais e de organização de íntrons e éxons. Estudos de expressão em diferentes estágios do desenvolvimento, órgãos e tecidos, mostraram padrões ora semelhantes, ora distintos, sugerindo que as proteínas correspondentes desempenham papéis clássicos, como fontes de aminoácidos para o desenvolvimento pupal e adulto mas, também, podem ser funcionalmente diferentes e específicas para determinados processos biológicos.

- Estrutura e organização dos genes de hexamerinas de *Apis mellifera*

O seqüenciamento da região codificadora completa dos genes *hex 70a*, *hex 70c* e *hex 110* permitiu caracterizar suas respectivas estruturas, confirmando as predições ou corrigindo-as. Identificamos, por exemplo, um éxon do gene *hex 70a* não anotado na versão 4 do genoma de *A. mellifera* recentemente publicado (*The Honeybee Genome Sequencing Consortium* 2006). Além disso, confirmamos as predições de *hex 70c* e *hex 110*. As massas moleculares dos polipeptídeos preditos (81,46 kDa para *hex 70a*, 81,28 kDa para *hex 70c* e 111,98 kDa para *hex 110*) são coerentes com os respectivos padrões de migração eletroforética em géis de poliacrilamida e SDS. A comparação da região N-terminal da subunidade HEX 70c predita no genoma (ASYAGRHTADM**D**FLH) com o N-terminal determinado por Danty *et al.* (1998) (A**Y**YAGRHTADM**F**FLH), mostrou diferenças em dois resíduos de aminoácidos (destacados em negrito). Os códons codificadores de Serina (**S**) e Tirosina (**Y**) diferem em apenas uma base nitrogenada (TCC codifica serina e TAC codifica tirosina), sugerindo uma variação polimórfica e não um erro no seqüenciamento. Já os códons para aspartato (**D**) e fenilalanina

(F) diferem em duas bases (GAT codifica aspartato e TTT codifica fenilalanina). A alta qualidade de nossos eletroferogramas nos levou a validar a sequência nucleotídica de *hex 70c* que apresenta 100% de identidade com a sequência depositada pelo *The Honeybee Genome Sequencing Consortium* (2006), indicando que aspartato (D) e não fenilalanina (F) compõe a região N-terminal de HEX 70c.

Análises *in silico* dos polipeptídeos deduzidos confirmaram uma elevada quantidade de aminoácidos aromáticos nas subunidades HEX 70a e HEX 70c (18,2% e 16,9%, respectivamente), o que permite incluí-las na classificação de arilforinas, ou seja, proteínas contendo mais de 15% de aminoácidos aromáticos (Telfer *et al.* 1983), as quais segundo Pan e Telfer (2001) têm possível função na estruturação e esclerotização cuticular. A HEX 110 é rica em glutamina/ácido glutâmico (17,9%), característica restrita a esta hexamerina típica dos Hymenoptera (Danty *et al.* 1998; Hunt *et al.* 2003). Em algumas espécies de formigas, hexamerinas ricas em glutamina/ácido glutâmico (20,4 a 22,8%) e com massas moleculares de 106 a 111 kDa também foram encontradas (Wheeler e Martinez 1995). Estes aminoácidos são essenciais para a síntese de glucosamina, um importante resíduo do polímero de quitina, essencial componente da cutícula e da matriz peritrófica dos artrópodos (Merzendorfer e Zimoch 2003). A matriz peritrófica é formada quando as microfibrilas de quitina associadas com a matriz proteoglicana altamente hidratada são secretadas pelas células epiteliais do intestino, e as funções desta matriz consistem em proteger o epitélio do intestino de patógenos, componentes tóxicos e, em certos casos, facilitar a digestão (Lehane 1997; Shao *et al.* 2001; Matsuo *et al.* 2003).

Embora faltem os sítios de ligação dos íons cobre ao oxigênio nas hexamerinas dos insetos em geral (Immesberg e Burmester 2004) e nas de *A. mellifera*, a presença dos domínios de hemocianina (N, M e C) permite incluí-las na mesma família das hemocianinas, pseudo-hemocianinas e profenoloxidasas.

HEX 70a e HEX 70c apresentaram 40% de identidade entre si. Ambas possuem seis éxons e número semelhante de aminoácidos, 684 e 686, respectivamente. Quando comparadas às hexamerinas de outras espécies, HEX 70a e HEX 70c se destacam pela grande similaridade com ortólogos de outro Hymenoptera, a vespa parasita *N. vitripennis* e por ocuparem uma posição mais derivada dentre as hexamerinas de *A. mellifera*. Hex 70b, que possui 7 éxons e 683 aminoácidos, apresenta 42% de similaridade com HEX 70a, estando associada ao grupo formado por HEX 70a e HEX 70c. HEX 110, no entanto, é a hexamerina com maior número de éxons (8) e de aminoácidos (1008), e está presente em um cromossomo totalmente distinto das outras 3 hexamerinas, sendo a sequência mais basal no dendograma de similaridade.

- Expressão dos genes codificadores de hexamerinas no corpo gorduroso durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*

O gene *hex 110* de *A. mellifera* é abundantemente expresso no corpo gorduroso de larvas e pupas de operárias e também durante o estágio adulto (**Fig. 28**). Os níveis de transcrito decaem quando a ecdise adulta se aproxima, aumentando após a emergência das operárias e mantendo-se em níveis elevados até o 20º dia, aproximadamente, quando diminuem novamente. Entretanto, os altos níveis de transcritos de *hex 110* nas operárias adultas contrastam com a escassez do polipeptídeo correspondente na hemolinfa. De fato, HEX 110 não se acumula na hemolinfa de operárias adultas (Bitondi *et al.* 2006). Uma hipótese para isso seria a rápida utilização da proteína ainda no corpo gorduroso. Isto poderá ser verificado, num futuro próximo, após obtenção de anticorpo contra esta hexamerina.

Em contraste com o perfil de expressão de *hex 110* no corpo gorduroso de operárias em desenvolvimento, os transcritos deste gene foram detectados neste órgão de rainhas e zangões apenas durante o estágio larval e início do estágio pupal; o respectivo polipeptídeo se mantém na hemolinfa das castas e dos zangões até à metade do estágio pupal. A presença de

transcritos de *hex 110* exclusivamente nas operárias adultas é digna de nota e sugere função diferencial da respectiva hexamerina nesta casta.

O gene *hex 70a* é expresso nos estágios larval, pupal e adulto de operárias, rainhas e zangões (**Fig. 28**). HEX 70a é a única das subunidades de hexamerinas de *A. mellifera* presente em quantidades substanciais no corpo gorduroso e hemolinfa de adultos. Mas nos zangões, a presença desta subunidade na hemolinfa se restringe aos primeiros dias do estágio adulto, ao contrário do que foi observado nas fêmeas. Sabe-se que zangões têm vida breve (14 dias, aproximadamente); o estágio adulto das operárias dura em torno de 45 dias e o das rainhas pode se estender até 1-3 anos, ou mais (Winston 1991). Os diferentes perfis de abundância de HEX 70a refletem a longevidade dos morfotipos da colméia.

A presença de HEX 70a no corpo gorduroso de abelhas *A. mellifera* adultas, de ambas as castas e sexos, sugere que essa hexamerina, assim como certas hexamerinas de algumas espécies de insetos (Pan e Telfer 1996, 1999 e 2001; Seo *et al.* 1998; Wheeler *et al.* 2000; Capurro *et al.* 2000; Hahn e Wheeler 2003), tem função associada ao processo reprodutivo. Nossos dados reforçam a hipótese que HEX 70a é importante para a reprodução, uma vez que no corpo gorduroso de operárias órfãs com ovários ativos, ocorreu um significativo aumento na quantidade de transcritos e subunidades HEX 70a.

O gene *hex 70b* expressa-se em larvas de operárias, rainhas e zangões (**Fig. 28**), e tanto nas fêmeas como no macho a quantidade de transcritos decai momentos antes da ecdise pupal, embora a respectiva subunidade permaneça abundante na hemolinfa até à metade do estágio pupal. Este perfil de expressão indica que HEX 70b é uma hexamerina típica, armazenada durante o estágio larval para servir como fonte de aminoácidos para o desenvolvimento pupal e farato-adulto.

A expressão do gene *hex 70c* está limitada ao 4º estágio larval e início do 5º estágio larval nas operárias e zangões, e ao 5º estágio larval nas rainhas (**Fig. 28**), coincidindo com o

período de maior crescimento (fase de alimentação) que precede a metamorfose. A respectiva subunidade, HEX 70c, acumula-se na hemolinfa larval e a partir da metade do estágio pupal diminui em quantidade. Nas larvas e pupas, o perfil de abundância da subunidade HEX 70c, assim como da HEX 70b, é compatível com a função de estocagem de aminoácidos para a metamorfose.

Figura 28 – Diagrama dos perfis de expressão dos genes de hexamerinas de *A. mellifera* no corpo gorduroso de operárias, rainhas e zangões ao longo do desenvolvimento pós-embrionário. As linhas cheias mostram altos níveis de transcritos e as tracejadas indicam baixos níveis.

Aspectos interessantes foram evidenciados da comparação das quantidades de transcritos dos diferentes genes codificadores de hexamerinas em *A. mellifera*, durante a transição larval-pupal. A quantificação relativa por PCR em Tempo Real mostrou claramente que os níveis de todos os tipos de transcritos das quatro hexamerinas são máximos nas larvas L5F de operárias e zangões. No entanto, com exceção dos transcritos de *hex 70b*, níveis máximos são alcançados nas larvas de rainhas somente na fase seguinte, L5S, e estes níveis

são em geral relativamente mais baixos que os das operárias. Este resultado é bastante promissor se considerarmos uma função putativa das hexamerinas: a de serem proteínas ligadoras de hormônio juvenil (Zhou *et al.* 2007). Sabe-se que em *A. mellifera*, o processo de diferenciação de castas é mais evidente no 5º estágio larval, quando as características que diferenciam rainhas de operárias estão bem estabelecidas. No início deste estágio, quando as larvas estão se alimentando ativamente – fase L₅F, os títulos de hormônio juvenil são muito maiores nas larvas de rainhas que nas de operárias. Exatamente nesta fase (L₅F), as larvas de operárias apresentam maiores quantidades de transcritos de hexamerinas que as larvas de rainhas. Pode-se, portanto, hipotetizar que os níveis altos destes transcritos nas operárias contribuem para “ligar” e impedir a ação do hormônio juvenil. Ao contrário, nas rainhas o título deste hormônio atingiria altos níveis devido à baixa concentração de hexamerinas na hemolinfa. Experimentos utilizando-se o cupim *Reticulitermes flavipes* como material biológico sugeriu fortemente que uma hexamerina, Hex-1, se liga ao hormônio juvenil e, assim, controla sua disponibilidade e regula o polifenismo de castas dependente deste hormônio (Zhou *et al.* 2006, 2007; Scharf *et al.* 2007). Não sabemos se as hexamerinas de *A. mellifera* são proteínas ligadoras de hormônio juvenil. Investigações nesta direção podem efetivamente contribuir para esclarecer o processo de determinação de castas nesta espécie de abelhas.

As quantificações por PCR em Tempo Real também evidenciaram que os transcritos de *hex 110* e *hex 70b* são relativamente mais abundantes que os de *hex 70a* e *hex 70c* durante a transição larval-pupal. O significado destas diferenças na atividade dos genes de hexamerinas está para ser determinada.

Em relação à quantificação da expressão dos genes *hex 70a* e *hex 110* – os únicos genes codificadores de hexamerinas que se expressam nos adultos de *A. mellifera* – verificamos que a quantidade relativa dos respectivos transcritos é significativamente maior

nas operárias que nas rainhas virgens ou ovipositoras. O motivo desta diferença requer investigação.

- Expressão de genes codificadores de hexamerinas associada ao desenvolvimento das gônadas e reprodução

Exceto por algumas diferenças, os padrões de expressão de HEX 70a no corpo gorduroso das abelhas adultas (operárias, rainhas e zangões) compartilham semelhanças com os padrões de expressão da proteína precursora do principal componente do vitelo, a vitelogenina (Engels *et al.* 1990; Bitondi e Simões 1996; Hartfelder e Engels 1998). HEX 70a e vitelogenina estão presentes no corpo gorduroso e hemolinfa das operárias, rainhas e zangões adultos, e nestes últimos, a presença de ambas proteínas se limita ao início do estágio adulto. Assim como a vitelogenina (Guidugli *et al.* 2005), HEX 70a existe nos ovários de rainhas adultas, mas não nos ovários de operárias adultas. Mas, diferente da vitelogenina, HEX 70a não é detectada em ovos ou embriões. Dessa forma, não pode ser considerada uma proteína vitelogênica.

Uma hexamerina (Hex-F) foi identificada na hemolinfa de fêmeas adultas de *Musca domestica* (Capurro *et al.* 2000). A função dessa proteína nos ovários desta mosca não é conhecida, mas especula-se que ela possa constituir uma fonte de aminoácidos para a produção de ovos. A presença de transcritos *hex 110* nos ovários de rainhas, mas não nos de operárias (**Fig. 29**), sugere função na reprodução. Esforços direcionados para a obtenção de anticorpo específico anti-HEX 110 e sua utilização em *Western blots* e imunolocalização poderão contribuir para elucidar a possível participação desta hexamerina na reprodução.

Embora transcritos de *hex 70a* não tenham sido detectados nos ovários de rainhas adultas ovipositoras (**ver Fig. 24A**), a presença destes transcritos no corpo gorduroso e a presença da respectiva subunidade na hemolinfa (**ver Fig. 15**) e nos ovários das rainhas (**ver**

Fig. 24B) sugere que as moléculas de HEX 70a sintetizadas no corpo gorduroso são secretadas na hemolinfa e incorporadas aos ovários. A procura por um receptor de HEX 70a nos ovários de rainhas será o próximo passo para elucidar se esta proteína está sendo seqüestrada da hemolinfa. HEX 70a poderia suprir os aminoácidos necessários para a síntese de proteínas relacionadas à ovogênese, o que explicaria a presença dessa proteína nos ovários ativos de rainhas adultas.

Como resultado de padrões de desenvolvimento divergentes, os ovários de larvas destinadas a serem rainhas retêm todos os primórdios de ovaríolos (aproximadamente 180 por ovário), enquanto em operárias, somente poucos primórdios de ovaríolos sobrevivem à metamorfose (Wiston 1991). A expressão de *hex 70a*, *hex 110* e *hex 70b* nos ovários em desenvolvimento de rainhas e operárias (**Fig. 29**), coincide com o período de diferenciação dos ovários de cada casta, sugerindo que as respectivas hexamerinas participam destes processos. Além disto, do perfil de abundância de transcritos pode-se inferir que a transcrição de *hex 70a* e *hex 110* nos ovários de rainha se estende até o estágio adulto e, nos ovários de operária, a transcrição termina antes, durante o estágio pupal e larval, respectivamente (**Fig. 29**). Esse padrão de expressão casta-específico reflete o maior potencial de proliferação celular nos ovários de rainhas, que contêm muitos ovaríolos, reforçando a hipótese de que estas hexamerinas estão relacionadas ao crescimento e diferenciação dos ovários.

Os ovários de operárias adultas permanecem em estágio de dormência, mas podem ser ativados em ausência de rainha na colônia. Bitondi *et al.* (2006) demonstraram que no corpo gorduroso de operárias órfãs, cujos ovários estavam ativos, ocorreu um significativo aumento na quantidade de transcritos de *hex 110*, sugerindo que a função deste gene está relacionada à ativação dos ovários. Em complementação, nossos dados mostram aumento do nível de transcritos de *hex 70a* no corpo gorduroso de rainhas ovipositoras, quando comparadas às

virgens (ver **Fig. 15A**), indicando que o produto deste gene também pode ter função associada à reprodução.

Figura 29 – Diagrama dos perfis de expressão das hexamerinas de *A. mellifera* nas gônadas de operárias, rainhas e zangões ao longo do desenvolvimento. As linhas cheias mostram altos níveis de transcrito e as tracejadas indicam baixos níveis.

Em função dessa peculiar relação com o desenvolvimento e ativação dos ovários, decidiu-se investigar se os genes *hex 70a* e *hex 110* também estariam expressos nos testículos. As gônadas do macho apresentam seu máximo desenvolvimento durante o estágio pupal, quando a espermatogênese está ocorrendo. A expressão de *hex 70a* nos testículos é evidente durante esse estágio, mas cessa quando o adulto emerge, coincidindo com o término da espermatogênese e migração dos espermatozóides para as vesículas seminais (Bishop 1920). Este padrão de transcrição sugere que HEX 70a participa, também, do desenvolvimento e maturação dos testículos. A expressão de *hex 110* foi detectada em testículos de zangões em 5º estágio larval e na primeira metade do estágio pupal, o que pode também ser sugestivo de função no desenvolvimento destes órgãos e na espermatogênese.

Todas estas evidências sugerem uma nova função para as hexamerinas de *A. mellifera*, ainda não descrita na literatura. Aparentemente, além do papel clássico de estocagem de aminoácidos para o desenvolvimento pupal e adulto-farato, HEX 70a e HEX 110 foram cooptadas para exercerem funções alternativas, ou seja, participar do desenvolvimento ovariano e maturação dos testículos durante o estágio pré-imaginal. Embora a presença de HEX 70a nos ovários ativos (de rainhas adultas) indique função na ovogênese e produção de ovos, sua ausência nos embriões iniciais mostra que esta proteína não é um componente do vitelo. Investigações adicionais são necessárias para estabelecer a função dessas hexamerinas no desenvolvimento e funcionamento das gônadas.

- Síntese de hexamerinas dependente da dieta alimentar

O acúmulo de HEX 70a em operárias adultas é significativamente influenciado pela nutrição. Abelhas operárias jovens consomem pólen ativamente, e estocam proteínas e outros componentes orgânicos na hemolinfa para serem seqüestrados e utilizados quando necessário. Operárias mais velhas, que já estão exercendo atividades extra-nidais, não coletam pólen para sua própria alimentação, mas doam este material para a colônia. Enquanto forrageiam, elas consomem preferencialmente néctar (Crailsheim *et al.* 1992), uma dieta deficiente em proteína (Slansky e Scriber 1985). Ao contrário das abelhas jovens, as forrageadoras podem ter que usar suas próprias reservas de proteína para sustentar o metabolismo. Conseqüentemente, os níveis de proteína decaem rapidamente na hemolinfa (Crailsheim 1986). A concentração de vitelogenina, por exemplo, diminui acentuadamente nas operárias forrageadoras (Engels *et al.* 1990; Hartfelder e Engels 1998; Piulachs *et al.* 2003). Na hemolinfa do adulto, HEX 70a, possivelmente, representa uma fonte adicional de aminoácidos para processos metabólicos implicados na sustentação de abelhas operárias durante o período mais tardio de seu ciclo de vida, quando elas não têm acesso a uma dieta

protéica. Recentes estudos suportam uma conexão entre a nutrição e a transição do trabalho interno para o trabalho externo à colônia. A diminuição do consumo de pólen que também leva à diminuição de moléculas consideradas marcadores do *status* nutricional, como os lipídeos (Toth *et al.* 2005), ou o silenciamento do gene da vitelogenina (Nelson *et al.* 2007) provocaram saída precoce para o forrageamento. Sendo uma proteína de estocagem, HEX 70a é uma candidata natural a participar deste esquema. Os fatores que induzem a diminuição do consumo de pólen e conseqüente utilização das proteínas e lipídeos estocados na hemolinfa de operárias, com conseqüente mudança fisiológica de comportamento, ainda não foram identificados. Além de mudanças no *status* nutricional, a transição de tarefas intra-nidais para as extra-nidais tem sido associada a diferenças na expressão de muitos genes no cérebro, envolvendo alterações na atividade endócrina (aumento nos títulos de hormônio juvenil), metabolismo e ciclo circadiano (Toth e Robinson 2007). Essa transição é socialmente regulada por feromônios e outros fatores sociais (Leoncini *et al.* 2004) mas também envolve componentes genotípicos (Giray *et al.* 2000; Page *et al.* 2006). A expressão do gene *hex 70a* nas abelhas operárias adultas é fortemente influenciada pela dieta, sugerindo que a proteína por ele codificada pode representar um novo componente entre aqueles que determinam ou influenciam o polietismo etário.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

1 – Quatro genes codificadores de hexamerinas foram encontrados no genoma de *A. mellifera*, *hex 70a*, *hex 70b*, *hex 70c* e *hex 110*. O seqüenciamento da região codificadora completa desses genes revelou domínios altamente conservados mas, também, diferenças estruturais e de organização de íntrons e éxons. As respectivas subunidades polipeptídicas contêm os domínios N, M e C, típicos de hemocianinas, mas uma delas, HEX 110, difere das demais por apresentar uma inserção de aminoácidos repetitivos no domínio C, além de mostrar pouca similaridade com as outras subunidades. HEX 70a, HEX 70b e HEX 70c têm mais de 15% de aminoácidos aromáticos em sua composição e, por isso, se incluem na classe das arilforinas com função putativa na estruturação e esclerotização cuticular. HEX 110 é rica em glutamina/ácido glutâmico, uma característica até agora somente encontrada em hexamerinas de espécies de Hymenoptera;

2 – Durante a muda metamórfica, os perfis quantitativos de expressão dos genes *hex 70a*, *hex 70b*, *hex 70c* e *hex 110* no corpo gorduroso apresentaram diferenças marcantes entre os morfotipos da colônia, sugerindo que as respectivas hexamerinas desempenham funções diferenciadas nas castas e sexos, durante a diferenciação de castas e metamorfose;

3 – Transcritos de *hex 70a*, *hex 70b* e *hex 110* foram detectados também nas gônadas em diferenciação e desenvolvimento de operárias, rainhas e zangões, sugerindo que os respectivos produtos protéicos têm função na diferenciação dos ovários e maturação dos testículos;

4 – Dois dos quatro genes codificadores de hexamerinas, *hex 70a* e *hex 110* se expressam também no corpo gorduroso das abelhas adultas. Transcritos de *hex 70a* foram

detectados em operárias, rainhas e zangões, sugerindo função de estocagem de aminoácidos para processos inerentes ao estágio adulto. Transcritos de *hex 110* foram detectados exclusivamente em operárias adultas, sugerindo função diferencial dessa hexamerina nesta casta. Foi constatado que a quantidade de transcritos *hex 70a* e *hex 110* no corpo gorduroso é significativamente maior em operárias adultas que em rainhas, sejam elas virgens ou ovipositoras, caracterizando papel especializado nas operárias;

5 – Os níveis de transcritos *hex 70a* no corpo gorduroso de operárias, assim como a abundância de suas subunidades na hemolinfa, aumentam em resposta à ativação dos ovários. Este fato, além da constatação da presença de HEX 70a nos ovários de rainhas, sugere que esta hexamerina está associada ao processo reprodutivo;

6 – O acúmulo de transcritos de *hex 70a* no corpo gorduroso, e de suas subunidades na hemolinfa de operárias adultas é dependente do tipo de dieta alimentar, sugerindo controle nutricional da transcrição e tradução.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arif A, Scheller K, Dutta-Gupta A (2003) Tyrosine kinase mediated phosphorylation of the hexamerin receptor in the rice moth *Corcyra cephalonica* by ecdysteroids. Insect Biochem Mol Biol 33: 921-928.

Arif A, Vasanthi P, Hansen IA, Scheller K, Dutta-Gupta A (2004) The insect haemolymph protein HP19 mediates the nongenomic effect of ecdysteroids on acid phosphatase activity. J Biol Chem 279: 28000-28008.

Arif A, Gullipalli D, Scheller K, Dutta-Gupta A (2007) Significance of the 19-kDa hemolymph protein HP19 for the development of the rice moth *Corcyra cephalonica*: morphological and biochemical effects caused by antibody application. Arch Insect Biochem Physiol 66: 32-44.

Barchuk AR, Cristino AS, Kucharski R, Costa LF, Simões ZLP, Maleszka R (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. BMC Dev Biol 7: 70.

Beintema JJ, Stam WT, Hazes B, Smidt MP (1994) Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (hexamerins). Mol Biol Evol 11: 493-503.

Beresford PJ, Basinski-Gray JM, Chiu JKC, Chadwick JS, Aston WP (1997) Characterization of hemolytic and cytotoxic G, ulysins: a relationship with arylphorins. Dev Compar Immunol 21: 253-266.

Bishop GH (1920) Fertilization in the honeybee. I. The male sexual organs: their histological structures and physiological functioning. J Exp Zool 31: 225-265.

Bitondi MM, Nascimento AM, Cunha AD, Guidugli KR, Nunes FM, Simões ZL (2006) Characterization and expression of the Hex 110 gene encoding a glutamine-rich hexamerin in the honey bee, *Apis mellifera*. Arch Insect Biochem Physiol 63: 57-72.

Bitondi MM, Simões ZL (1996) The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titers in Africanized *Apis mellifera* workers. J Apic Res 35: 27-36.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.

Braun RP, Wyatt GR (1996) Sequence of the hexameric juvenile hormone-binding protein from the hemolymph of *Locusta migratoria*. J Biol Chem 271: 31756-31762.

Burmester T (1999) Identification, molecular cloning, and phylogenetic analysis of a non-respiratory pseudo-hemocyanin of *Homarus americanus*. J Biol Chem 274: 13217-13222.

Burmester T (2001) Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. Mol Biol Evol 18: 184-195.

Burmester T (2002) Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. J Comp Physiol 172: 95-107.

Burmester T, Scheller K (1992) Identification of binding proteins involved in the stage-specific uptake of arylphorin by the fat body cells of *Calliphora vicina*. Insect Biochem Mol Biol 22: 211-220.

Burmester T, Scheller K (1996) Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor. J Mol Evol 42: 713-728.

Burmester T, Scheller K (1999) Ligands and receptors: common theme in insect storage protein transport. Naturwissenschaften 86: 468-474.

Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1994) Staining nucleic acids with silver: an alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. Promega Notes Magazine 45: 13-21.

Capurro ML, Moreira-Ferro CK, Marinotti O, James AA, de Bianchi AG (2000) Expression patterns of the larval and adult hexamerin genes of *Musca domestica*. Insect Mol Biol 9: 169-177.

Crailsheim K (1986) Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifera carnica* Pollm). J Insect Physiol 32: 629-634.

Crailsheim K, Schneider LHW, Hrassnigg N, Buhlmann G, Brosch U, Gmeinbauer R, Schoffmann B (1992) Pollen consumption and utilization in worker honey bees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *J Insect Physiol* 38: 409-419.

Cristino AS, Nunes FMF, Lobo CH, Bitondi MMG, Simões ZLP, Da Fontoura Costa L, Lattorff HMG, Moritz RFA, Evans JD, Hartfelder K (2006) Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality. *Insect Mol Biol* 15: 703-714.

Cunha AD, Nascimento AM, Guidugli KR, Simões ZL, Bitondi MM (2005) Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera*. *J Insect Physiol* 51: 1135-1147.

Danty E, Arnold G, Burmester T, Huet JC, Huet D, Pernollet JC, Masson C (1998) Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem Mol Biol* 28: 387-397.

Duhamel RC, Kunkel JG (1987) Molting-cycle regulation of hemolymph protein clearance in cockroaches: possible size-dependent mechanism. *J Insect Physiol* 33: 155-158.

Enderle U, Kauser G, Reum K, Scheller K, Koolman J (1983) In: Scheller K (Eds) *The larval serum proteins of insects*. Thieme-Stratton, Stuttgart, pp. 40-49.

Engels W, Kaatz H, Zillikens A, Simões ZP, Trube A, Braun R, Dittrich F (1990) Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In: Hoshi M, Yamashita O, editors. *Adv Invert Reprod*, vol 5. Oxford: Elsevier, p 495-502.

Evans JE, Wheeler DE (1999) Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5575-5580.

Faria FS, Garcia ES, Goldenberg S (1994) Synthesis of a hemolymph hexamerin by the fat body and testis of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol* 24: 59-67.

Giray T, Guzmán-Novoa E, Aron CW, Zelinsky B, Fahrbach SE, Robinson GE (2000) Genetic variation in worker temporal polyethism and colony defensiveness in the honey bee, *Apis mellifera*. *Behav Ecol* 11: 44-55.

Grogan DE, Hunt JH (1979) Pollen proteases: their potential role in insect digestion. *Insect Biochem* 9: 309-313.

Guidugli KR, Piulachs MD, Bellés X, Lourenço AP, Simões ZLP (2005) Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. *Arch Insect Biochem Physiol* 59: 211-218.

Hagner-Holler S, Pick C, Girgenrath S, Marden JH, Burmester T (2007) Diversity of stonefly hexamerins and implication for the evolution of insect storage proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 1064-1074.

Hahn DA, Wheeler DE (2003) Presence of a single abundant storage hexamerin in both larvae and adults of the grasshopper, *Schistocerca americana*. J Insect Physiol 49: 1189-1197.

Hartfelder K, Engels W (1998) Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. Curr Topics Dev Biol 40: 45-77.

Haunerland NH (1996) Insect storage proteins: gene families and receptors. Insect Biochem Mol Biol 26: 755-765.

Haydak MH (1970) Honey bee nutrition. Annu Rev Entomol 15: 143-156.

Hoover SE, Keeling CI, Winston ML, Slessor KN (2003) The effect of queen pheromone on worker honey bee ovary development. Naturwissenschaften 90: 477-480.

Hoover SE, Higo HA, Winston ML (2006) Worker honey bee ovarian development: seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition. J Comp Physiol [B] 176: 55-63.

Hunt JH, Buck NA, Wheeler DE (2003) Storage proteins in vespid wasps: characterization, developmental pattern, and occurrence in adults. J Insect Physiol 49: 785-794.

Immesberger A, Burmester T (2004) Putative phenoloxidases in the tunicate *Ciona intestinalis* and the origin of the arthropod hemocyanin superfamily. J Comp Physiol 174: 169-180.

Kerr WE, Silveira ZV (1974) A note on the formation of honeybee spermatozoa. J Apic Res 13: 121-126.

Kirankumar N, Ismail SM, Dutta-Gupta A (1997) Uptake of storage protein in the rice moth *Coccyra cephalonica*: identification of storage protein binding proteins in the fat body cell. Insect Biochem Mol Biol 27: 671-679.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-682.

Lehane M.J (1997) Peritrophic matrix structure and function. Annu Rev Entomol 42: 525-550.

Leoncini I, Le Conte Y, Costagliola G, Plettner E, Toth AL, Wang M, Huang Z, Bécard JM, Crauser D, Slessor KN, Robinson GE (2004) Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. Proc Natl Acad Sci USA 101: 17559-17564.

Levenbook L, Bauer AC (1984) The fate of the larval storage protein calliphorin during adult development of *Calliphora vicina*. Insect Biochem 14: 77-86.

Lin H, Winston ML (1998) The role of nutrition and temperature in the ovarian development of the worker honey bee (*Apis mellifera*). Canadian Entomologist 130: 883-891.

Locke M, Collins JV (1965) The structure and formation of protein granules in the fat body of an insect. *J Cell Biol* 26: 857-884.

Locke M, Collins JV (1966) Sequestration of protein by the fat body of an insect. *Nature* 210: 552-553.

Locke M, Collins JV (1967) Protein uptake in multi vesicular bodies in the molt-intermolt cycle of an insect. *Science* 158: 467-469.

Locke M, Collins JV (1968) Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. *J Cell Biol* 36: 153-183.

Louveaux J (1977) Anatomie de l'abeille: XL'appareil reproducteur du male, *Bull. Tech Apic* 4: 43–48. In: Tozetto SO, Bitondi MMG, Dallacqua RP, Simões ZLP (2007) Protein profiles of testes, seminal vesicles and accessory glands of honey bee pupae and their relation to the ecdysteroid titer. *Apidologie* 38: 1-11.

Magee J, Kraynack N, Massey HCJr, Telfer WH (1994) Properties and significance of a riboflavin-binding hexamerin in the hemolymph of *Hyalophora cecropia*. *Arch Insect Biochem Physiol* 25: 137-157.

Makert GR, Paxton RJ, Hartfelder K (2006) Ovariole number – a predictor of differential reproductive success among worker subfamilies in queenless honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Behav Ecol Sociobiol* 60: 815-825.

- Marinotti O, de Bianchi AG (1986) Uptake of storage protein by *Musca domestica* fat body. J Insect Physiol 32: 819-825.
- Martinez T, Burmester T, Veenstra J, Wheeler D (2000) Sequence and evolution of a hexamerin from the ant, *Camponotus festinatus*. Insect Mol Biol 9: 427-431.
- Matsuo T, Sato M, Inoue N, Yokoyama N, Taylor D, Fujisaki K (2003) Morphological studies on the extracellular structure of the midgut of a tick, *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). Parasitol Res 90: 243-248.
- Merzendorfer H, Zimoch L (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. J Exp Biol 206: 4393-4412.
- Michelette ERF, Soares AEE (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honeybee workers (*Apis mellifera* L.). Apidologie 24: 431-440.
- Moritz R, Crailsheim K (1987) Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.) J Insect Physiol 33: 923-931.
- Nagamanju P, Hansen IA, Burmester T, Meyer SR, Scheller K, Dutta-Gupta A (2003) Complete sequence, expression and evolution of two members of the hexamerin protein family during the larval development of the rice moth, *Coccyra cephalonica*. Insect Biochem Mol Biol 33: 73-80.

Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page RE, Amdam GV (2007) The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. PLoS Biol 5: 673-677.

Page RE Jr, Scheiner R, Erber J, Amdam GV (2006) The development and evolution of division of labor and foraging specialization in a social insect (*Apis mellifera* L.). Curr Top Dev Biol 74: 253-286.

Pan ML, Telfer WH (1996) Methionine-rich hexamerin and arylphorin as precursor reservoirs for reproduction and metamorphosis in female luna moths. Arch Insect Biochem Physiol 32: 149-162.

Pan ML, Telfer WH (1999) Equivalence of riboflavin-binding hexamerin and arylphorin as reserves for adult development in two saturniid moths. Arch Insect Biochem Physiol 42: 138-146.

Pan ML, Telfer WH (2001) Storage hexamer utilization in two lepidopterans: differences correlated with the timing of egg formation. J Insect Sci 1.2.

Pernal SF, Currie RW (2000) Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bee (*Apis mellifera* L.). Apidologie 31: 387-409.

Peter MG, Scheller K (1991) Arylphorins and integument. In: Retnakaran, A., Binnington, K., (Eds.). The Physiology of Insect Epidermis. Intaka Press, North Carolina, Australia, pp. 115-124.

Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuck AR, Cruz J, Simões ZL, Bellés X (2003) The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem Mol Biol* 4: 459-465.

Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K (1990) Caste and metamorphosis – hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen Comp Endocr* 79: 31-38.

Ratnieks FLW (1993) Egg laying, egg removal, and ovary development by workers in queenright honey bee colonies. *Behav Ecol Sociobiol* 32: 191-198.

Rembold H, Kremer JP, Ulrich GM (1980) Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 11: 29-38.

Robbs SL, Ryan RO, Schmidt JO, Keim PS, Law JH (1985) Lipophorin of the larval honeybee, *Apis mellifera* L. *J Lipid Res* 26: 241-247.

Roberts DB, Turing JD, Loughlin SA (1991) The advantages that accrue to *Drosophila melanogaster* possessing larval serum protein 1. *J Insect Physiol* 37: 391-400.

Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Kajandream MA, Barrell B (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16: 944-945.

Ruttner F, Hesse B (1981) Rassenspezifische Unterschiede in Ovarentwicklung und Eiablage von weisellosen Arbeiterinnen der Honigbiene *Apis mellifera*. *Apidologie* 12: 159-183.

Ryan RO, Schmidt JO, Law JH (1984) Arylphorin from the hemolymph of the larval honeybee. *Insect Biochem* 14: 515-520.

Schafer MO, Dietemann V, Pirk CWW, Neumann P, Crewe RM, Hepburn HR, Tautz J, Crailsheim K (2006) Individual versus social pathway to honeybee worker reproduction (*Apis mellifera*): pollen or jelly as protein source for oogenesis? *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 192: 761-768.

Scharf ME, Buckspan CE, Grzymala TL, Zhou X (2007) Regulation of polyphonic caste differentiation in the termite *Reticulitermes flavipes* by interaction of intrinsic and extrinsic factors. *J Exp Biol* 210: 4390-4398.

Scheller K, Fisher B, Schenkel H (1990) Molecular properties, functions and developmentally regulated biosynthesis of arylphorin in *Calliphora vicina*. In: Hagerdorn, H.H., Hildebrand, J.G., Kidwell, M.G., Law, J.H., (Eds.), *Molecular Insect Science*. Plenum Press. New York, pp. 155-162.

Schmidt-Capella IC, Hartfelder K (1998) Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J Insect Physiol* 44: 385-391.

Schmidt LS, Schmidt JO, Rao H, Wang W, Xu L (1995) Feeding preference and survival of young worker honeybees (Hymenoptera: Apidae) fed rape, sesame and sunflower pollen. J Economic Entomol 88: 1591-1595.

Seo SJ, Kang YJ, Cheon HM, Kim HR (1998) Distribution and accumulation of storage protein-1 in ovary of *Hyphantria cunea* Drury. Arch Insect Biochem Physiol 37: 115-128.

Shao L, Devenport M, Jacobs-Lorena M (2001) The peritrophic matrix of hematophagous insects. Arch Insect Biochem Physiol 47: 119–125.

Silveira ZV (1972) Efeito da temperatura na meiose dos machos de *Apis mellifera*, II. Ciência e Cultura 24: 160.

Slansky JR, Scriber JM (1985) Food consumption and utilization. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds), Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology. Oxford Pergamon Press, New York.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150: 76-85.

Snodgrass RE (1956) Anatomy of honeybee, Comstock Publ Ass Cornell Univ. Press Ithaca, NY, pp 344.

Telang A, Buck NA, Wheeler DE (2002) Response of storage protein levels to variation in dietary protein levels. *J Insect Physiol* 48: 1021-1029.

Telfer WH, Keim PS, Law JH (1983) Arylphorin, a new protein from *Hyalophora cecropia*: comparisons with calliphorin and manducin. *Insect Biochem* 13: 601-613.

Telfer WH, Kunkel JG (1991) The function and evolution of insect storage hexamers. *Annu Rev Entomol* 36: 205-228.

The Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443: 931-949.

Toth AL, Kantarovich S, Meisel AF, Robinson GE (2005) Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *J Exp Biol* 208: 4641-4649.

Toth AL, Robinson GE (2007) Evo-devo and the evolution of social behavior. *Trends Genet* 23: 334-341.

Tozetto SO (1997) Hormonelle Steuerung in der Entwicklung von Drohnen (*Apis mellifera carnica*), Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls Universität Tübingen. In: Tozetto SO, Bitondi MMG, Dallacqua RP, Simões ZLP (2007) Protein profiles of testes, seminal vesicles and accessory glands of honey bee pupae and their relation to the ecdysteroid titer. *Apidologie* 38: 1-11.

Tozetto SO, Bitondi MMG, Dallacqua RP, Simões ZLP (2007) Protein profiles of testes, seminal vesicles and accessory glands of honey bee pupae and their relation to the ecdysteroid titer. *Apidologie* 38: 1-11.

Ueno K, Natori S (1982) Activation of fat body by 20-hydroxyecdysone for the selective incorporation of storage protein in *Sarcophaga peregrine* larvae. *Insect Biochem* 12: 185-191.

Velthuis HH (1970) Ovarian development in *Apis mellifera* worker bees. *Entomol Exp Appl* 13: 377-394.

Velthuis HHW, Ruttner F, Crewe RM (1990) Differentiation in reproductive physiology and behaviour during the development of laying worker honey bees. In: Engels W (ed) *Social Insects – an evolutionary approach to caste and reproduction*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 231-243.

Visscher PK (1989) A quantitative study of worker reproduction in honeybee colonies. *Behav Ecol Sociobiol* 25: 247-254.

Wang Z, Haunerland NH (1994) Receptor-mediated endocytosis of storage proteins by fat body of *Helicoverpa zea*. *Cell Tissue Res* 278: 107-115.

Webb BA, Riddiford LM (1988a) Regulation of expression of arylphorin and female-specific protein mRNAs in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol* 130: 682-692.

Webb BA, Riddiford LM (1988b) Synthesis of two storage proteins during larval development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Dev Biol 130: 671-681.

Wheeler D (1996) The role of nourishment in oogenesis. Annual Review of Entomology 41: 407-431.

Wheeler DE, Martínez T (1995) Storage proteins in ants (Hymenoptera: Formicidae). Comp Biochem Physiol 112B: 15-19.

Wheeler DE, Tuchinskaya I, Buck NA, Tabashnik BE (2000) Hexameric storage proteins during metamorphosis and egg production in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepdoptera). J Insect Physiol 46: 951-958.

Winston ML (1991) The Biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, London, England, pp. 4-109.

Zhou XG, Oi FM, Scharf ME (2006) Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. Proc Natl Acad Sci USA 103: 4499-4504.

Zhou X, Tarver MR, Scharf ME (2007) Hexamerin-based regulation of juvenile hormone-dependent gene expression underlies phenotypic plasticity in a social insect. Development 134: 601-610.

ANEXO

Tabela I: Identificação dos estágios larvais de operárias e rainhas de *Apis mellifera* (Michelette e Soares 1993; Rembold *et al.* 1980).

Instares larvais	Intervalo de peso (mg) e características	
	Operárias	Rainhas
L₄	4,80 – 24,80	3,80 – 44,00
L₅F₁	27,12 – 42,62	35,00 – 90,00
L₅F₂	53,09 – 91,01	91,00 – 180,00
L₅F₃	106,78 – 115,86	181,00 – 260,00
L₅S₁	Intestino totalmente cheio	
L₅S₂	Intestino em processo de esvaziamento	
L₅S₃		
PP₁	Intestino totalmente vazio	
PP₂	<p>Pouco movimento, cabeça orientada em direção ao opérculo, o intestino pode ser visualizado como um tubo vazio.</p> <p>Imóvel, cabeça orientada em direção ao opérculo, o intestino não é mais visível, os apêndices da cabeça e do tórax são visíveis através da cutícula.</p>	
PP₃	<p>Imóvel, cabeça orientada em direção ao opérculo, o líquido exuvial foi reabsorvido e a cutícula larval tornou-se opaca e enrugada. Apêndices torácicos não podem mais ser visualizados.</p>	

Tabela II: Parâmetros para classificação do desenvolvimento pupal e adulto farato de operárias e rainhas de *Apis mellifera* (Michelette e Soares 1993; Rembold *et al.* 1980).

Fases do estágio pupal	Cor do olho	Pigmentação da cutícula torácica
Pw	Branco	Ausente
Pp	Rosa	Ausente
Pdp	Rosa escuro	Ausente
Pb	Marrom	Ausente
Pbl	Marrom	Início
Pbm	Marrom	Intermediária
Pbd	Marrom	Intensa

Tabela III: Parâmetros para classificação do desenvolvimento de pupas de zangão de *Apis mellifera* (Tozetto *et al.* 2007).

Fases pupais	Cor dos olhos	Pigmentação da cutícula torácica
P1	Perolado	Perolado
P2	Bege	Perolado
P3	Rosa	Perolado
P4	Violeta	Perolado
P5	Violeta escuro	Perolado
P6	Violeta escuro	Pigmentação mesocutânea
P7	Violeta escuro	Marfim
P8	Violeta claro	Marfim
P9	Violeta claro	Bege
P10	Violeta claro	Bege escuro
P11	Violeta claro	Marrom claro
P12	Marrom	Marrom
P13	Marrom	Marrom escuro

Tabela IV: Sequências de *primers* específicos utilizados para o sequenciamento do gene *hex 70a*.

Código do <i>primer</i>	SEQUÊNCIA (5'- 3')
1F	GCA TCT CCA CTC TCA GAT TC
1R	ATC AGA GCG TGA TTG GCT TT
2F	CTC TCT GGG CGA AGA ACA AC
2R	ACC AGA ATC GAT TGC TGC CG
3F	GAG AAT ATC GGC AGC AAT CG
3R	CAG TTT GTG ATG CGA ATC GT
4F	TGA AGA GCA AAG AAA CGA TGA
4R	AAC AAT CTT CCT GGG AAT CC
5F	TCG TTT GGT TTT CCG TTA GA
5R	TTT GCT TTT GAC GCA TGT TC
JUF	GCT GGT ATC TGA ATC ACG ATT
JUR	CAC GAT AAT CCG GCA AAT CG
RTF	AAA GCC AAT CAC GCT CTG AT
RTR	AAT CGT GAT TCA GAT ACC AGC

Tabela V: Sequências de *primers* específicos para o sequenciamento do gene *hex 70c*.

Código do <i>primer</i>	SEQÜÊNCIA (5'- 3')
PIF	GAG GTT TAA TGT GAT TAT CC
PIR	AGA ATA TTG TAA AGC GGT CG
1F	AGG AAG GCA CAC CGC CGA TA
1R	GGG ATA GAT CTC GTA GAT GG
2F	TTA CAA AAC TGC CGC TTG GG
2R	ATC CAG AAT TGA TGG GCT TG
3F	GCC CAA AGA AAT ACG TGG AC
JUF	CCA GCC TTT GAC GAG ATC AA
JUR	GAA TAT GTC GCT GGG CAT TAT

Tabela VI: Sequências de *primers* específicos para o sequenciamento do gene *hex 110*.

Código do <i>primer</i>	SEQÜÊNCIA (5'- 3')
0F	ACG GAC AGT CAA CAT CGC AT
0R	CTC GTG AAT CCA AGT GAT GT
1F	GTT GCT GCT GTA TTA ACT CG
1R	CAG TTC CTT CAA TCA GAT CAC
2F	GTC CTC AGA ATC TTC AAC TTC
2R	ATG GTC GTG TTT GGG TCC AA
3F	TAC TGG TCA CCA ATC CCA AC
3R	TGG CCT ACA GGA TTC TGG AT
4F	GGC GGA GGA ATT CAG CAA AA
4R	CAT AGG GGA CGT TCA TTC CT
5F	TCC GTA CTG CAA GGA TTA GG
5R	ACT AAC AAC TGT TTG CGT GC

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Insect Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinsphys

A honeybee storage protein gene, *hex 70a*, expressed in developing gonads and nutritionally regulated in adult fat body

Juliana Ramos Martins^a, Francis Morais Franco Nunes^a,
Zilá Luz Paulino Simões^b, Márcia Maria Gentile Bitondi^{b,*}

^a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Faculdade de Filosofia, Departamento de Biologia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 February 2008

Accepted 19 March 2008

Keywords:

Hexamerin gene

Apis mellifera

Ovary

Testis

ABSTRACT

In preparing for metamorphosis, insect larvae store a huge amount of proteins in hemolymph, mainly hexamerins. Out of the four hexamerins present in the honeybee larvae, one, HEX 70a, exhibited a distinct developmental pattern, especially since it is also present in adults. Here, we report sequence data and experimental evidence suggesting alternative functions for HEX 70a, besides its well-known role as an amino acid resource during metamorphosis. The *hex 70a* gene consists of 6 exons and encodes a 684 amino acid chain containing the conserved hemocyanin N, M, and C domains. HEX 70a classifies as an arylphorin since it contains more than 15% of aromatic amino acids. In the fat body of adult workers, *hex 70a* expression turned out to be a nutrient-limited process. However, the fat body is not the only site for *hex 70a* expression. Both, transcript and protein subunits were also detected in developing gonads from workers, queens and drones, suggesting a role in ovary differentiation and testes maturation and functioning. In its putative reproductive role, HEX 70a however differs from the yolk protein, vitellogenin, since it was not detected in eggs or embryos.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The adult phenotypes in a honeybee colony, the queen, workers and drones, remarkably differ in size, morphology, physiology, behavior, and life span. Totally adapted to the task of being the mother of the colony, the queen produces continuously a huge amount of eggs that, when fertilized will mostly develop into workers and only a few will become queens. Unfertilized eggs originate drones. The functionally sterile workers are engaged in colony maintenance, including brood rearing and foraging. Drones have no other known task besides mating with a virgin queen (Winston, 1987).

The female caste phenotypes result from differential feeding during the larval stages. A queen-destined larva is continuously fed on pure royal jelly, whereas the worker-destined larvae are fed with this glandular secretion during the earlier larval instars, before it is subsequently supplemented with pollen and honey (Haydak, 1970). As an important consequence of differential

nutrition, a queen larva grows faster than the worker larvae, its metamorphic molt is accelerated and adult ecdysis occurs earlier than in workers (after 16–17 instead of 19–21 days). Drones take a longer time to eclose, approximately after 24 days (Jay, 1963; Rembold et al., 1980; Michelette and Soares, 1993). A critical consequence of differential nutrition is the caste-specific divergence of the ovaries. In a predestined queen larva, the primordia of the structural units forming the ovary, the ovarioles, are all preserved, grow extensively during pupal stage and a few days after the adult ecdysis the queen will be able to mate and lay eggs. In contrast, in worker larvae, the majority of ovariole primordia degenerates by apoptosis (Schmidt-Capella and Hartfelder, 1998), and in the remnant ovarioles, oogenesis normally does not take place, but they may be activated for production of haploid eggs if the colony has lost its queen.

Caste-specific traits have become established during the 5th larval instar (Hartfelder and Engels, 1998), when larvae stop feeding in preparation for the metamorphic molt. As in all Holometabola, the larval–pupal transition and subsequent pre-imaginal development in honeybees occur at the expenses of nutrient reserves, especially storage proteins accumulated during the larval feeding stages (Burmester and Scheller, 1999). Typical storage proteins are the hexamerins, which are massively present in larval hemolymph. They are composed of six identical or similar 75–90 kDa subunits, and belong to a family of proteins that includes hemocyanins, prophenoloxidas and arylphorin-receptor proteins (Scheller et al.,

Abbreviation: hex, hexamerin; ApoLp, apolipoprotein; cDNA, DNA complementary to RNA; BSA, bovine serum albumin; DNase, deoxyribonuclease; kDa, kilodalton(s); SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide-gel electrophoresis; RNase, ribonuclease; UTR, Untranslated region(s); CDS, coding sequence.

* Corresponding author at: Av. Bandeirantes, 3900, 14040-901, Ribeirão-Preto, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 16 3602 3805; fax: +55 16 3602 3704.

E-mail address: mmgbit@usp.br (M. Maria Gentile Bitondi).

0022-1910/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jinsphys.2008.03.009

1990; Burmester, 2002). Hexamerins have been considered as genuine larval-specific storage proteins with a primary role in metamorphosis (Telfer and Kunkel, 1991), but for some insects, mainly lepidopterans and dipterans, there are considerable circumstantial evidence supporting the hypothesis that some hexamerins may also be targeted for egg production (Benes et al., 1990; Wheeler and Buck, 1996; Capurro et al., 1997; Wheeler et al., 2000; Pan and Telfer, 2001; Telfer and Pan, 2003).

Egg production in insects is a nutrient-limited process, but females differ considerably in the way they obtain nutrients to support reproduction. In the majority of lepidopterans, for example, adults do not feed on protein and females must use hexamerins accumulated during the larval feeding stage to support egg production (Wheeler et al., 2000). In contrast, nourishment on a rich protein source, such as pollen, is a *sine qua non* condition for adult honeybee workers to synthesize vitellogenin, the protein yolk precursor (Bitondi and Simões, 1996). Workers extensively consume pollen at the beginning of the adult stage (Crailsheim et al., 1992), when they are more prone to activate their ovaries when separated from the queen. Reproductive queens are also continuously fed via transference by trophallaxis of the proteinaceous glandular secretions produced by nurse workers (Haydak, 1970). Consequently, if the amino acids stocks necessary for vitellogenin synthesis and egg production in the honeybee were directly derived from dietary supplies, the persistence of a larval storage protein in adult bees should be unnecessary. However, based on the relative mobility of hemolymph proteins on Coomassie Blue-stained SDS-PAGE, Danty et al. (1998) suggested that one of the four honeybee hexamerins, HEX 70a, persisted in adults. But this was weak evidence since HEX 70a subunits comigrate with the small lipophorin subunit (ApoLp-II) (Robbs et al., 1985).

The current study was undertaken to investigate the presence of HEX 70a in adults, and to explore its participation in honeybee reproduction. To this end, we cloned and sequenced the complete *hex 70a* CDS, and based on the deduced amino acid sequence, a specific antibody was produced and used in Western blots to identify HEX 70a. The combined characterization of transcriptional dynamics and protein subunit profile in different tissues and organs during honeybee life cycle now clearly evidences the presence of HEX 70a in adults, and supports its possible role in the development, differentiation and functioning of female and male gonads. Furthermore, our data suggest that besides its well-known importance in metamorphosis, this storage protein may have been coopted into new roles, indicated by the fact that *hex 70a* expression in adults is nutritionally regulated and shows sex- and caste-specific differences.

2. Materials and methods

2.1. Honeybees

Africanized honeybees were collected from hives maintained at the Experimental Apiary of the Faculty of Medicine in Ribeirão Preto, São Paulo University, Brazil. Queens were reared by standard apicultural procedures. Developing queens, workers and drones were staged according to Rembold et al. (1980), Michelette and Soares (1993), and Tozetto et al. (2006), respectively. Adult workers and drones of known ages were obtained by paint marking the newly emerged and returning them to their hives to be collected later at appropriate age.

2.2. Honeybee organs analyzed for *hex 70a* expression

The expression of *hex 70a* was analyzed in the fat body of workers and drones collected at different stages of ontogenesis

(larval, pupal and adult) from colonies headed by an egg-laying queen. For some experiments, adult workers were maintained in a hive under a queenless condition during 21 days to induce ovary activation. They were then collected, dissected under a stereomicroscope using Ringer saline solution, and examined for ovary status classification in activated, if presenting pre-vitellogenic or vitellogenic follicles, or inactive, if presenting undeveloped follicles. Fat body from these workers carrying active or inactive ovaries were sampled and used for RNA and protein extractions.

Ovaries from queens and workers in pre- and post-imaginal development, testes from developing and newly emerged drones, and hypopharyngeal glands from 7-day-old workers were carefully dissected and exhaustively washed in Ringer saline to eliminate contaminant hemolymph and fat body, before being used for RNA and protein extractions.

Eggs and embryos (up to 72 h after oviposition) were pooled and also used in *hex 70a* expression analyses.

2.3. Differential nutrition

Newly emerged workers (0–16 h old) were collected and separated in three groups of 40 bees each that were confined in 8 cm × 11 cm × 13 cm screened wooden cages and kept for 6 days at 34 °C and 80% relative humidity. During this period they were fed on syrup (50% sugar in water), beebread (30% in syrup) or royal jelly (30% in syrup). Water was given *ad libitum*. After 6 days, the hemolymph was collected by puncturing the abdomen between the 3rd and 4th abdominal tergites with a glass microcapillary. Pools of hemolymph obtained from the differentially fed groups were centrifuged at 5000g for 5 min at 4 °C, and the supernatants were used in Western blots. Following hemolymph collection, the dorsal abdominal carcass was dissected and used as a source of fat body for RNA extraction.

2.4. Determination of the *hex 70a* CDS

The HEX 70a N-terminal amino acid sequence, as described by Danty et al. (1998) (EYDITKTADKDFLLKQKKVYNLLYRVAQPA-LA?ITWYNEG), was aligned against the Official Gene Set database (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) to identify the predicted protein sequence (GB30362-PA). The corresponding nucleotide sequence (GB30362-RA) was annotated using the software Artemis 7.0 (Rutherford et al., 2000) and used to design primers for experimental determination of the complete *hex 70a* CDS. The primers (1F and 2R; 3F and 5R, Table 1, see also Fig. 1A) were combined for PCR amplification from first-strand cDNA obtained by reverse transcription (see Section 2.5) from total RNA of 5th instar worker larvae. Amplicons were purified and

Table 1
Specific primers used for sequencing *Hex 70a* gene

Code	Sequence (5' → 3')
1F	GCA TC CCA CTC TCA GAT TC
1R	ATC AGA GCG TGA TTG GCT TT
2F	CTC TCT GGG CGA AGA ACA AC
2R	ACC AGA ATC GAT TGC TGC CG
3F	GAG AAT ATC GGC AGC AAT CG
3R	CAG TTT GTG ATC CGA ATC GT
4F	TGA AGA GCA AAG AAA CGA TGA
4R	AAC AAT CTT CCT GGG AAT CC
5F	TCG TTT GGT TTT CCG TTA GA
5R	TTT GCT TTT GAC GCA TGT TC
JUF	GCT GGT ATC TGA ATC ACG ATT
JUR	CAC GAT AAT CCG GCA AAT CG

Fig. 1. (A) Schematic diagram of *hex 70a* gene structure. Initiation (ATG) and termination (TAA) codons are pointed by arrows. Exons and introns are represented by boxes and lines, respectively. UTR regions are marked in dark gray (5'-UTR, 45nt; 3'-UTR, 506nt). Positions of specific primers used for sequencing and expression studies are marked by arrows inside the boxes. (B) *HEX 70a* deduced sequence. Signal peptide is underlined. N-terminal sequence as determined by Danty et al. (1998) is double underlined. N, M, and C hemocyanin-typical domains are marked: N, white letters on a gray background; M, white letters on a black background; and C, black letters on a gray background. A dashed line underlies the amino acid sequence used for antibody synthesis.

subcloned using TOPO TA-cloning kit (Invitrogen). Insert-containing plasmids were subjected to sequencing reactions with primers described in Table 1 and Fig. 1A, and M13-reverse and forward universal primers, using ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing reagents (Applied Biosystems). Sequences were analyzed using Sequencher (version 4.7, Gene Codes Corporation) and Artemis 7.0 tools.

2.5. Semi-quantitative RT-PCR

The expression of *hex 70a* was evaluated by semi-quantitative RT-PCR, using the specific primers JUR and JUF (Table 1) to generate a 148 bp cDNA fragment. Total RNA was extracted from developmental stages and different tissues using TRIzol reagent (Invitrogen). RNA extracts were incubated at 37 °C in the presence of 3 units of RNase-free DNase (Promega) for 40 min to eliminate contaminant DNA, followed by 15 min at 70 °C to inactivate the enzyme. First-strand cDNA was synthesized by reverse transcription using 2.5 µg RNA, SuperScript II reverse transcriptase and an oligo dT_(12–18) primer (Invitrogen). Negative control reactions without the enzyme were also prepared in parallel to check for DNA contamination. Aliquots of cDNA were subjected to PCR (27 cycles of 30 s at 94 °C, 1 min at 58 °C and 1 min at 72 °C) after establishing the adequate number of cycles to avoid saturation. The amplification products were analyzed by electrophoresis in 1.2% agarose gels containing ethidium bromide. An *A. mellifera actin* gene (GenBank accession number AB023025), which is constitutively expressed during development (Lourenço et al., 2008, in press), was used to control for cDNA loading. The primers used for *actin* gene amplification were: ACT forward (5'-TGC CAA

CAC TGT CCT TTC TG) and ACT reverse (5'-AGA ATT GAC CCA CCA ATC CA), and the thermal cycling program was the same as described above.

2.6. Real time RT-PCR

To quantitatively compare the levels of *hex 70a* mRNA, a real-time quantitative RT-PCR assay was performed using the 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Amplifications were carried out in 20 µl reaction volumes, containing 10 µl SYBR® Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), 1 µl first-stranded cDNA (diluted 10x), 7.4 µl water and 1 pmol of each *hex 70a* gene-specific primer (JUR and JUF). PCR conditions were 50 °C for 2 min, and 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. To check reproducibility, each SYBR green assay was performed in triplicate. Data were normalized to *A. mellifera actin* mRNA levels and the relative amount of *hex 70a* transcripts was calculated using the 2^{−ΔΔCT} method (Applied Biosystems User bulletin #2; Livak and Schmittgen, 2001).

2.7. SDS-PAGE

Protein samples were prepared from hemolymph, fat body, ovaries, testes, embryos, and hypopharyngeal glands. Hemolymph samples were centrifuged at 5000g for 5 min at 4 °C. Fat body, ovaries, embryos and hypopharyngeal glands were separately homogenized in water, and centrifuged at 15,000g for 5 min at 4 °C. Supernatants were used as samples. Testis proteins were purified using TRIzol, according to manufacturer's instructions. Protein quantifications for hemolymph, fat body, ovaries and

hypopharyngeal glands were performed according to Bradford (1976). Proteins from testes and embryos were quantified using bicinchoninic acid (Smith et al., 1985). Standard curves were prepared with BSA.

Electrophoresis in denaturing conditions (Laemmli, 1970) was carried out at 15 mA and 4 °C, using 7.5% polyacrylamide gel (100 × 120 × 0.9 mm³) and aliquots of samples containing 3 µg of total protein.

2.8. Western blot

The proteins (from hemolymph, fat body, ovaries, testes, hypopharyngeal glands and embryos) separated by SDS-PAGE were transferred to nitrocellulose membranes (ImmunBlot™ PVDF Membrane). Non-specific binding sites were blocked by incubating the membranes for 1 h with 10% non-fat dried milk in PBS (50 mM Tris, 80 mM NaCl, 2.6 mM CaCl₂, pH 8.5). HEX 70a subunits were detected by incubation for 1 h, at room temperature, with a monoclonal anti-HEX 70a antibody obtained from a sequence (SYKMHQKPYNKD) of the predicted protein (the antibody was custom made by Affinity BioReagents, Golden, CO, USA), diluted 1:5000 in 10% milk/PBS. The membranes were washed thoroughly in PBS-T (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄, 0.05% Tween 20, pH 7.2) and subsequently incubated for 1 h in a horseradish peroxidase labeled anti-rabbit IgG secondary antibody (Amersham Biosciences), diluted 1:12,000 in PBS-T. After washing in PBS-T, the detection was carried out by using the ECL System (ECL™ Western Blotting Analysis System—Amersham Biosciences).

3. Results

3.1. Characterization of the honeybee hex 70a gene

The entire CDS of the *hex 70a* gene and part of the 5' and 3' UTRs were sequenced and deposited in the GenBank database [EF591128 (mRNA) and ABQ59246 (protein subunit)]. Alignment of the complete CDS (2052 nt) and the corresponding genomic sequence revealed that the *hex 70a* gene is represented by a single copy in the HoneyBee Genome Assembly (version 4.0), and consists of 6 exons (Fig. 1A), flanked by typical GT/AG splicing sites.

The conceptual translation product (Fig. 1B) was confirmed as being the HEX 70a subunit because it contains the N-terminal sequence as determined by automated Edman degradation of HEX 70a subunit bands separated by SDS-PAGE using honeybee hemolymph (Danty et al., 1998). HEX 70a is a 684 residues long polypeptide with an estimated molecular mass of 81.4 kDa and a theoretical pI value of 6.46 (calculated by using <http://expasy.org/cgi-bin/protparam>). The amino acid sequence consists of a high percentage (18.2%) of aromatic amino acids, a characteristic of arylphorins (Telfer et al., 1983) that include HEX 70a. Other amino acids present in relatively high quantities (>7%) are: Asn, Ile, Leu and Lys (Table 2). A secretory signal peptide spanning 21 amino acids, as predicted by the SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), was identified in the primary HEX 70a sequence, as well as the conserved residues related to hemocyanin N, M, and C domains (Fig. 1B).

Multiple sequence alignments (ClustalW 1.83, <http://align.genome.jp/>) were used to compare at the amino acid level the deduced HEX 70a sequence with related hexamerins from the honeybee and other hymenopterans. The closest relative turned out to be a predicted hexamerin from the parasitic wasp *Nasonia vitripennis* (GenBank XP_001607029.1), which displayed 51%

Table 2

HEX 70a amino acid compositions

Amino acids	Quantities	%
Ala	32	4.7
Arg	24	3.5
Asn	49	7.2
Asp	39	5.7
Cys	2	0.3
Gln	18	2.6
Glu	42	6.1
Gly	30	4.4
His	15	2.2
Ile	57	8.3
Leu	71	10.4
Lys	53	7.7
Met	14	2.0
Phe	49	7.2
Pro	38	5.6
Ser	38	5.6
Thr	26	3.8
Trp	11	1.6
Tyr	64	9.4
Val	12	1.8

identity with honeybee HEX 70a. The other predicted hexamerin sequences from this wasp (GenBank XP_001607012.1, XP_001604915.1, XP_001605292.1, and XP_001600430.1) were 40%, 38%, 32% and 30% identical to HEX 70a. This protein is 44% identical to a hexamerin (HEX 2) of the ant *Camponotus festinatus* (GenBank CAB62053), and shares 42%, 40% and 31% identity with the others hexamerins from the honeybee: HEX 70b (GenBank AY601637; Cunha et al., 2005), HEX 70c (GenBank EF589162; Martins J.R. unpublished results), and HEX 110 (GenBank ABU92559; Bitondi et al., 2006), respectively.

3.2. Expression of hex 70a in honeybee workers and drones

In workers and drones, *hex 70a* transcripts were detected as abundant throughout the 5th larval instar and almost the entire pupal stage. At the transition from pupal to the adult stage, the amount of transcripts consistently dropped, but increased after adult emergence. The developmental pattern of *hex 70a* transcripts differed between workers and drones during the adult stage. A high level of transcripts was maintained in adult workers during the first half of the adult stage (1–24 days) whereas in drones a decay was observed as early as at the 6th day (Fig. 2A, C). Transcript decay in adult workers approximately coincided with the time of foraging activity (18–28 days), for collecting nectar and pollen (Winston, 1987). In drones, this coincided with the beginning of the short orientation flights (6–7 days) that precede the longer flights for searching and fecundating the queen (Fahrbach et al., 1997).

Western blot analysis using the specific antibody showed that HEX 70a subunits are present in large amounts in worker fat body up to the mid pupal stage (Pb phase), before they subsequently decrease to a constant level that persists into the adult stage (Fig. 2B, upper panel). A similar expression pattern was found in worker hemolymph (Fig. 2B, lower panel), with a larger transcript level during the pupal than the adult stage. In fat body of drone in pupal stage, levels of HEX 70a subunits are similar to those found in the hemolymph of adult nurse workers (Fig. 2D).

In hemolymph of adult workers, the HEX 70a store (Fig. 2B, lower panel) does not seem to merely result from a residual carry over from pre-imaginal stores. The presence of high levels of *hex 70a* transcripts during more than 24 days in adult workers (Fig. 2A) rather indicates continuous gene activity than a low turnover of the mRNA synthesized during pre-imaginal stages.

Fig. 2. Patterns of *hex 70a* expression during larval, pupal and adult stages of workers and drones. (A) *hex 70a* transcripts in worker fat body; (B) HEX 70a protein subunits in worker fat body (upper panel) and hemolymph (lower panel); (C) *hex 70a* transcripts in drone fat body; (D) HEX 70a protein subunits in drone fat body (a hemolymph sample from adult workers was used for comparison). Transcript pattern during development (A and C) was characterized by RT-PCR followed by electrophoresis of the amplified cDNA on ethidium bromide-stained agarose gel. A housekeeping *actin* gene was used to control cDNA loading and to normalize for differences in cDNA amounts. HEX 70a protein subunits (B and D) detected by Western blots using anti-HEX 70a (molecular mass markers in kDa are given at the left margin of the Western blots). L₅F and L₅S: feeding and spinning 5th instar larvae; PP: pharate pupae; Pw, Pdp, Pb, Pbm, Pbd: successive phases of worker pupal stage; P2–P13: successive phases of drone pupal stage; NE: newly eclosed adult. Adult development is indicated in days. Samples of the same developmental stage in figures A–B, and C–D are connected by dashed lines.

Even in drones, *hex 70a* gene activity appears to resume after the drastic decrease in transcript levels at the end of the pupal stage, suggesting *de novo* synthesis of HEX 70a in adults (Fig. 2C). Taken together, results shown in Fig. 2 confirm that *hex 70a* gene expression extends into the adult stage, and it does so in a sex-specific manner.

3.3. Levels of *hex 70a* expression in worker fat body depend on the reproductive status and nutrition

The observed *hex 70a* expression in adults (Fig. 2A, B) pointed to a possible role of this gene in reproduction, and led us to compare transcript and protein subunit levels in workers differing in reproductive status. Expression was then investigated in the fat body of queenless workers that had activated ovaries and their sisters that did not respond to the absence of the queen, and had inactive ovaries. Levels of *hex 70a* transcripts were 23.7-fold higher in the fat body of workers with active than in those with

inactive ovaries (Fig. 3A). A higher amount of HEX 70a subunits was also found in the fat body of workers with active ovaries when compared to those carrying inactive ovaries (Fig. 3B), thus confirming that expression levels correlate positively with ovary activation.

As in insects in general ovary activation and egg production are nutrient-limited processes, we investigated whether *hex 70a* expression in the fat body of honeybee workers depends on dietary protein consumption. We could show that, in effect, *hex 70a* transcription was impaired in workers fed on a diet devoid of proteins (syrup), whereas bees maintained on a beebread diet showed a high abundance of *hex 70a* mRNA (114.2-fold higher than in those fed on syrup). An intermediary level of transcripts was obtained in bees fed on royal jelly (24.3-fold higher in comparison to syrup-fed ones) (Fig. 4A). Levels of HEX 70a subunits followed these transcript levels, being significantly higher in beebread-fed than in royal jelly or syrup-fed workers (Fig. 4B).

This result confirms that *hex 70a* gene transcription and translation in adult workers depend on the supply of raw material

Fig. 3. Expression of *hex 70a* in the fat body of 21-day-old queenless workers carrying active or inactive ovaries. (A) Relative quantification of *hex 70a* transcripts in fat body using real-time RT-PCR. Data were normalized to *actin* and the relative amount of *hex 70a* transcripts was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. The mean value (triplicates of a pool prepared with fat body from three bees) obtained from workers carrying inactive ovaries was considered as 1, and the mean value obtained from workers with active ovaries was calculated relative to it; (B) HEX 70a band identified by Western blot of fat body proteins probed with antibody against HEX 70a. Molecular mass markers in kDa are indicated.

Fig. 4. Levels of *hex 70a* transcripts and of the corresponding protein subunit in the fat body of workers fed on, or syrup, beebread, or royal jelly. (A) Relative quantification of *hex 70a* transcripts in the fat body using real-time RT-PCR. Data (means/SE of three independent samples) were normalized to *actin* and the relative amount of *hex 70a* transcripts was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. The mean value obtained from workers fed on beebread, or royal jelly, was calculated relative to the workers fed on syrup, considered as 1. Transcript levels were statistically different among groups ($p < 0.001$; one-way ANOVA with post-hoc comparisons by the Tukey test; Jandel SigmaStat 3.1 software, Jandel Corporation, USA). (B) Western blot of hemolymph pools from workers fed on beebread, royal jelly or syrup, probed with anti-HEX 70a. Molecular mass markers in kDa are indicated.

via a protein-rich diet. In this context, the higher *hex 70a* gene expression in the fat body of workers with activated ovaries might be explained if we consider that, because of their new position in

the bee society, as reproductive females, they could have been preferentially fed by subordinate nestmates.

3.4. Expression of the *hex 70a* gene in developing female and male gonads

After having established the correlation between ovary activation and increased levels of *hex 70a* expression in the fat body, we investigated the presence of the transcript and corresponding protein subunit in the ovaries of non-reproductive (workers) and reproductive (queens) females during pre-imaginal and adult stages. We also looked whether *hex 70a* is expressed in the testes of developing and newly emerged drones.

High levels of *hex 70a* transcripts were detected in ovaries of queenright workers at the 5th larval instar and initial phases (Pw–Pb) of the pupal stage, but not at the end of the pupal stage (Fig. 5A). The presence of the subunit was confirmed in the ovaries of workers at the Pb phase of the pupal stage (Fig. 5B). Ovaries from adult workers did not express *hex 70a* gene, as deduced from the absence of the transcript (Fig. 5A) and of the subunit (Fig. 5B).

In the ovaries of developing queens, the pattern of occurrence of *hex 70a* transcripts was similar to that detected in worker ovaries, but, unlike in workers, *hex 70a* continued to be expressed in the adult ovaries. An interesting observation was that newly emerged queens presented higher transcript levels in their ovaries than egg-laying queens. We could not detect *hex 70a* gene activity in embryos (Fig. 6A). The Western blot shown in Fig. 6B confirms the presence of HEX 70a subunits in queen ovaries and their absence in embryos. Fig. 6B also revealed that the pattern of HEX 70a subunits in the ovaries of adult queens differs from the transcript pattern, with newly emerged and egg-laying queens presenting similar levels of protein subunits in their ovaries. This may be explained by the transport of this hexamerin from hemolymph to the ovaries of egg-laying queens perhaps to be used for egg production. However, HEX 70a was not detected in embryos, as demonstrated by the total absence of immunoreactivity against anti-HEX 70a in the Western blots (Figs. 6B).

Taken together, the data presented in Figs. 5 and 6 suggest a role for the *hex 70a* gene in ovary development during pre-imaginal stages of workers and queens. This is further evidenced by the detection of a high level of *hex 70a* transcripts in the testes in correlation with their growth and maturation during the pupal stage (Fig. 7A). Coinciding with the completion of spermatogenesis at the end of this stage, testes from pre-emerging (P13 phase of the pupal stage) and newly emerged drones showed a significant decrease in transcript abundance. In developing testes, the presence of the HEX 70a subunits was confirmed by Western blotting probed with the specific antibody (Fig. 7B).

3.5. Absence of *hex 70a* transcripts and subunits in hypopharyngeal glands

No traces of transcripts and subunits were found in well-developed glands from 7-day-old workers, indicating that they do not express *hex 70a* gene and do not sequester the corresponding protein for using in royal jelly synthesis (Fig. 8).

4. Discussion

4.1. The honeybee hexamerin genes: functions deduced from expression patterns

Four genes encoding hexamerin subunits were found in the honeybee genome, *hex 70a*, *hex 70b*, *hex 70c* and *hex 110*.

Fig. 5. Expression of *hex 70a* in worker ovaries. (A) *hex 70a* transcript abundance in the ovaries of developing and adult workers determined by RT-PCR, with the amplified cDNA run on ethidium bromide-stained agarose gel. *actin* cDNA was used as a loading control. L₅F and L₅S: feeding and spinning 5th instar larvae; P_w, P_p, P_b, P_{bm}, P_{bd}: successive phases of worker pupal stage. Adult age is given in day intervals. (B) Western blots of ovary extracts probed with anti-HEX 70a antibody. Subunits were detected in ovaries from workers in pupal stage (P_b phase) but not in adult ovaries. Molecular mass markers (kDa) are indicated. Dashed lines connect RT-PCR and Western blot results obtained with ovary samples from the same developmental stage.

Sequencing of the complete CDSs revealed highly conserved motifs but also notable differences in gene structures and translated protein subunits. Detailed expression studies, encompassing several developmental stages and different tissues, disclosed distinct patterns, suggesting that the respective proteins are functionally different. *A. mellifera hex 70b* gene (GenBank AY601637; Cunha et al., 2005) is highly expressed in larvae, but the amount of transcripts strongly decreases after pupal ecdysis, and, even more so, after adult ecdysis. Expression of *hex 70c* gene (GenBank EF589162) is practically limited to the 4th larval instar and beginning of the 5th larval instar (Martins, unpublished results). The respective protein subunits, HEX 70b and HEX 70c, accumulate in larval hemolymph, but from the middle of the pupal stage onward they progressively disappear (Cunha et al., 2005). Thus, the expression patterns for these two hexamerins (HEX 70b and HEX 70c) are typical for insect hexamerins and are compatible with a function in metamorphosis.

The *A. mellifera hex 110* gene (GenBank ABU92559) is abundantly expressed in worker larvae. Transcript levels then progressively decrease after the metamorphic molt, but increase subsequently to the adult ecdysis, and are maintained at high levels up to the 15th day of the adult stage, at least. However, the high level of *hex 110* transcripts in adults contrasts with the very low abundance of the corresponding polypeptide in hemolymph, suggesting either a down-regulation at the translational level, or a rapid protein turnover (Bitondi et al., 2006). This hexamerin is rich in glutamine/glutamic acid, and seems to be restricted to hymenopterans (Danty et al., 1998; Hunt et al., 2003), perhaps to attend particular amino acid needs.

The honeybee *hex 70a* gene (this study) is expressed in larval, pupal and adult stages. HEX 70a is present in substantial quantities in fat body and hemolymph of adult workers (and adult queens—data not shown). The abundance of this protein, and of its transcript, changes in adult worker fat body in correlation with ovary activity and bee nutrition. Except for remarkable differences in temporal expression profiles, HEX 70a shares all these features with the honeybee yolk protein, vitellogenin (Engels et al., 1990; Bitondi and Simões, 1996;

Hartfelder and Engels, 1998). Like vitellogenin (Guidugli et al., 2005), HEX 70a is present in ovaries of adult queens but not in those of adult workers, yet unlike vitellogenin, it is not detected in eggs or embryos, therefore, it cannot be considered as a vitellogenic protein. Adult expression of a non-vitellogenic hexamerin was also described in *Musca domestica* females (Capurro et al., 2000). The function of this protein is not known, but it has been suggested that it may constitute a source of amino acids for egg formation. The same function is here being proposed for the honeybee HEX 70a.

As a result of divergent developmental pathways, the ovaries of queen-destined larvae retain all ovariole primordia (approximately 180 per ovary) and continue to grow during pupal stage, whereas in workers, only few of the ovariole primordia survive metamorphosis and will show initial stages of oogenesis. In the adult stage, worker ovaries remain dormant, with chances to be activated if the queen dies or is experimentally removed from the colony. The expression of *hex 70a* in developing ovaries of queens and workers coincides with the time of germline and somatic cell differentiation. However, there is a difference: *hex 70a* transcription in queen ovaries is extended into the adult stage whereas in worker ovaries it terminates earlier, yet during pupal stage. This caste-specific expression pattern reflects the lower potential of cell proliferation in worker ovaries, containing only a few ovarioles, than in queen ovaries, plenty of these structural units.

Ovaries from egg-laying queens express *hex 70a* transcripts albeit at a very low level in comparison to the levels found in the ovaries of newly emerged, virgin queens. But HEX 70a subunits were detected in equivalent quantities in both, suggesting that ovaries of egg-laying queens may sequester this hexamerin from the hemolymph. The search for a HEX 70a receptor in queen ovaries should be the next step to elucidate whether this protein is indeed sequestered from hemolymph. In the ovaries, HEX 70a could be hydrolyzed to supply amino acids for the synthesis of proteins needed for oogenesis or other processes related to ovary function. This would explain the presence of this protein in the active ovaries of adult queens, but not in the dormant worker ovaries.

Fig. 6. Detection of *hex 70a* expression in queen ovaries but not in embryos. (A) *hex 70a* transcript abundance in the ovaries of developing and adult queens, and in embryos determined by RT-PCR resolved by electrophoresis on ethidium bromide-stained agarose gel. *actin* cDNA was used as a loading control. Pw, Pp, Pb, Pbl, Pbm, Pbd: successive phases of pupal stage. Newly eclosed (NE) and egg-laying (EL) queens. Additional ovary samples from NE and EL queens are also shown (lower panel). (B) HEX 70a protein subunits in the ovaries of queens detected by Western blot probed with anti-HEX 70a. Nu: nurse worker hemolymph used for comparison. Molecular mass markers (kDa) are indicated. Dashed lines connect RT-PCR and Western blot results obtained with ovary samples from the same developmental stage.

Because of its peculiar relationship with ovary development and activation we decided to investigate whether the *hex 70a* gene is also expressed in testes. The male gonads attain their maximal development during pupal stage, when spermatogenesis is at its peak. Expression of *hex 70a* is evident during this stage, but ceases at the time of adult eclosion, coinciding with the termination of spermiogenesis and sperm migration to the seminal vesicles (Bishop, 1920). This transcript pattern strongly suggests that HEX 70a also participates in testes development and maturation.

Taken together, these evidences suggest a previously undescribed function for a honeybee hexameric storage protein. Apparently, HEX 70a has been coopted from its classical role in nutrient storage for metamorphosis and pupal/pharate adult development into an additional one in ovarian development and testis maturation during pre-imaginal stages. The presence of the protein in active ovaries (of queens) furthermore indicates a role in adult ovary function, but its absence in eggs (embryos) rules out a possible role in vitellogenesis. Additional research is needed to establish the exact role of this hexamerin in gonad development and functioning.

In the search for alternative functions for HEX 70a, we also verified whether the worker bee could be using this hexamerin as an amino acid resource for hypopharyngeal gland activity and royal jelly production. However, the complete absence of subunit bands in gland samples analyzed by Western blots probed with anti-HEX 70a ruled out this possibility. In this aspect, the role of this hexamerin differed from vitellogenin, for which there is evidence indicating its utilization for royal jelly production by nurse bees (Amdam et al., 2003; Seehuus et al., 2007).

Two storage hexamers in the *C. festinatus* ant (one of them, HEX 2, being the most closely related to HEX 70a: see Section 3.1), accumulate in queenless (brood-less) workers and virgin queens, suggesting that under certain colony conditions, dietary proteins are converted to and stored in the form of hexamerins (Martinez and Wheeler, 1993, 1994; Wheeler and Buck, 1995). These findings support a role of ant hexamerins as a nutritional source for the nourishment of the brood by workers, and egg formation by queens. The unusual features of accumulation of certain hexamerins in queenless workers may be typical of all social Hymenoptera, and suggests special regulation dependent on colony needs, thus pointing to new roles for storage proteins besides their involvement in metamorphosis.

Fig. 7. Expression of *hex 70a* in drone testes. (A) *hex 70a* transcript abundance in the testes of developing and adult drones determined by RT-PCR. Amplified cDNA run on ethidium bromide-stained agarose gel. *actin* cDNA was used as a loading control. L₅F and L₅S: feeding and spinning 5th instar larvae; PP: pharate pupae; P1–P13: successive phases of drone pupal stage; NE: newly eclosed adults. (B) HEX 70a protein subunits in the testes of drones detected by Western blot using anti-HEX 70a. Molecular mass markers (kDa) are indicated at the left margin. Dashed lines connect transcripts and subunits levels in testis samples of the same developmental stage.

Fig. 8. Investigation of the presence of *hex 70a* transcripts and HEX 70a subunits in hypopharyngeal glands. (A) *hex 70a* transcript abundance determined by RT-PCR resolved by electrophoresis on ethidium bromide-stained agarose gel. *actin* cDNA was used as a loading control. HG: hypopharyngeal glands from 7-day-old nurse workers. A fat body sample (pool from several nurse workers) was used for comparison. (B) Search for HEX 70a subunits in HG extracts subjected to Western blot probed with anti-HEX 70a. A hemolymph pool from nurse workers was used for comparison.

4.2. Adult nutrition, *hex 70a* gene expression in fat body and HEX 70a accumulation in hemolymph

Nutrition significantly influenced the accumulation of HEX 70a in adult honeybees, both at the transcript and protein level. In young worker bees that actively consume pollen, the amino acid supply should exceed demand and the excess may then be stored

in hemolymph to be sequestered and used when necessary. Later in the adult stage, when workers become foragers, they do not collect pollen for their own nourishment, but to donate it to the colony. While foraging, they consume preferentially nectar (Crailsheim et al., 1992), a protein-deficient diet (Slansky and Scriber, 1985). In contrast to nurse bees, the foragers' demand for amino acids would, thus, exceeds consumption and they would have to use their own protein reserves to sustain metabolism. Consequently, levels of storage proteins should decay rapidly. Indeed, foragers typically showed a reduction in total hemolymph proteins (Crailsheim, 1986), as well as in the levels of vitellogenin (Engels et al., 1990; Hartfelder and Engels, 1998; Piulachs et al., 2003). In the adult hemolymph, HEX 70a possibly represent an additional, endogenous, amino acid source for using in metabolic processes implicated in sustaining bee workers during the last period of their life cycle, when they do not have access to dietary proteins.

However, the destination of proteins stored in the worker hemolymph would not be fixed, but dependent on the social context. When necessary, for example, in case of queen loss, protein reserves would then be deviated to attend reproduction, vitellogenin being used for egg production, and HEX 70a being required for a yet unknown function in the reproductive context.

Recent physiological studies support a connection between honeybee nutrition and age-related transition from working inside the hive to foraging. Depletion of molecules considered as markers of nutritional status, such as lipids (Toth et al., 2005), and depletion of vitellogenin levels by knockdown of *vitellogenin* gene function (Nelson et al., 2007) caused a precocious onset of foraging. Being a storage protein, HEX 70a is a natural candidate to participate in this scheme.

However, the factors triggering the decrease in pollen-consumption leading to depletion in the store of lipids and proteins in the adult middle-aged workers, with a consequent switch in physiology and behavior, were not yet identified. In addition to changes in nutritional status, the transition from nurse

to forager tasks has been associated with marked differences in the expression of many genes in the brain, and involves alterations in brain chemistry, endocrine activity (increase in juvenile hormone titer), metabolism, and circadian clock activity (Toth and Robinson, 2007). This transition is socially regulated by pheromones, colony age, and other social cues (Leoncini et al., 2004), but, in addition, it also has a genotype component (Giray et al., 2000; Page et al., 2006). Our study showing expression of *hex 70a* in adult bees, and especially its dependence on nutrition is a new component in this complex syndrome of age-related polyethism in bees.

The increase in consumption of high-quality nutrients could also explain the increase in *hex 70a* expression in the fat body of workers with activated ovaries in detriment of those with inactive ovaries. The increase in expression could simply reflect a privileged nutrition of workers that responded to the absence of the queen by activating their own ovaries. There is evidence that reproductively dominant honeybee workers are preferentially fed by trophallaxis, thus obtaining proteins necessary to activate their ovaries and lay eggs (Schäfer et al., 2006). Practicing trophallaxis, non-reproductive workers feed reproductive workers in queenless colonies, just as they feed the queen in queenright colonies. Nutrients acquired as adults are important for ovary development in honeybees, and in queenless colonies, workers could direct nutrients to some nestmates, which then would activate ovaries and lay eggs (Hoover et al., 2006). Thus, in such complex bee society that benefits the reproductive female, it is possible that workers with active ovaries are contemplated with a higher-quality diet, than their sisters with inactive ovaries, but this needs further confirmation, especially concerning the integration of nutrient transfer between workers of different social status and the genetic factors underlying ovary activation in queenless honeybee workers (Makert et al., 2006).

Acknowledgments

We would like to thank L. R. Aguiar for assistance in maintaining honeybee colonies and in queen rearing, K. R. Guidugli and A. P. Lourenço for helping in nutrition experiments, and A. M. Nascimento for helping in transcript quantification by Real Time-PCR. We are also grateful to Dr. K. Hartfelder for reading the manuscript and correcting the language. Financial support was granted by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Grants 05/03926-5 and 03/11989-1). J.R.M. was supported by a MS fellowship (FAPESP 05/03302-1), and F.M.F.N. by a PhD fellowship (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico 142034/2003-7).

References

- Amdam, G.V., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W., 2003. Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100, 1799–1802.
- Benes, H., Edmondson, R.G., Fink, P., Kejzlarova-Lepesant, J., Lepesant, J.A., Miles, J.P., Spivey, D.W., 1990. Adult expression of the *Drosophila* Lsp-2 gene. *Developmental Biology* 142, 138–146.
- Bishop, G.H., 1920. Fertilization in the honeybee. I. The male sexual organs: their histological structure and physiological functioning. *Journal of Experimental Zoology* 31, 225–265.
- Bitondi, M.M.G., Simões, Z.L.P., 1996. The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin, and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers. *Journal of Apicultural Research* 35, 27–36.
- Bitondi, M.M., Nascimento, A.M., Cunha, A.D., Guidugli, K.R., Nunes, F.M., Simões, Z.L., 2006. Characterization and expression of the Hex 110 gene encoding a glutamine-rich hexamerin in the honeybee, *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 63, 57–72.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Burmester, T., 2002. Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *Journal of Comparative Physiology* 172, 95–107.
- Burmester, T., Scheller, K., 1999. Ligands and receptors: common theme in insect storage protein transport. *Naturwissenschaften* 86, 468–474.
- Capurro, M.de L., Marinotti, O., Farah, C.S., James, A.A., Bianchi, A.G., 1997. The nonvitellogenic female protein of *Musca domestica* is an adult-specific hexamerin. *Insect Molecular Biology* 6, 97–104.
- Capurro, M.de L., Moreira-Ferro, C.K., Marinotti, O., James, A.A., de Bianchi, A.G., 2000. Expression patterns of the larval and adult hexamerin genes of *Musca domestica*. *Insect Molecular Biology* 9, 169–177.
- Crailsheim, K., 1986. Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifera carnica* Pollm.). *Journal of Insect Physiology* 32, 629–634.
- Crailsheim, K., Schneider, L.H.W., Hrassnigg, N., Buhlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R., Schoffmann, B., 1992. Pollen consumption and utilization in worker honey bees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology* 38, 409–419.
- Cunha, A.D., Nascimento, A.M., Guidugli, K.R., Simões, Z.L., Bitondi, M.M., 2005. Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* 51, 1135–1147.
- Danty, E., Arnold, G., Burmester, T., Huet, J.C., Huet, D., Pernollet, J.C., Masson, C., 1998. Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28, 387–397.
- Engels, W., Kaatz, H., Zillikens, A., Simões, Z.L.P., Trube, A., Braun, R., Dittrich, F., 1990. Honeybee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In: Hoshi, M., Yamashita, O. (Eds.), *Advanced Invertebrates Reproduction*. Elsevier, Oxford.
- Fahrbach, S.E., Giray, T., Farris, S.M., Robinson, G.E., 1997. Expansion of the neuropil of the mushroom bodies in male honeybees is coincident with initiation of flight. *Neuroscience Letters* 236, 135–138.
- Giray, T., Guzmán-Novoa, E., Aron, C.W., Zelinsky, B., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E., 2000. Genetic variation in worker temporal polyethism and colony defensiveness in the honey bee, *Apis mellifera*. *Behavioral Ecology* 11, 44–55.
- Guidugli, K.R., Piulachs, M.D., Bellés, X., Lourenço, A.P., Simões, Z.L.P., 2005. Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 59, 211–218.
- Hartfelder, K., Engels, W., 1998. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Current Topics in Developmental Biology* 40, 45–77.
- Haydak, M.H., 1970. Honey bee nutrition. *Annual Review of Entomology* 14, 143–156.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 919–920.
- Hoover, S.E.R., Higo, H.A., Winston, M.L., 2006. Worker honey bee ovary development: seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition. *Journal of Comparative Physiology B* 176, 55–63.
- Hunt, J.H., Buck, N.A., Wheeler, D.E., 2003. Storage proteins in vespid wasps: characterization, developmental pattern, and occurrence in adults. *Journal of Insect Physiology* 49, 785–794.
- Jay, S.C., 1963. The development of honeybees in their cells. *Journal of Apicultural Research* 2, 117–134.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–682.
- Leoncini, I., Le Conte, Y., Costagliola, G., Plettner, E., Toth, A.L., Wang, M., Huang, Z., Bécard, J.M., Crauser, D., Slessor, K.N., Robinson, G.E., 2004. Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honeybees. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101, 17559–17564.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402–408.
- Lourenço, A.P., Mackert, A., Cristino, A.S., Simões, Z.L.P., 2008. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, in press.
- Makert, G.R., Paxton, R.J., Hartfelder, K., 2006. Ovariole number: a prediction of differential reproductive success among worker subfamilies in queenless honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 60, 815–825.
- Martinez, T., Wheeler, D.E., 1993. Identification of two storage hexamers in the ant, *Camponotus festinus*: accumulation in adult queen-less workers. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23, 309–317.
- Martinez, T., Wheeler, D.E., 1994. Storage proteins in adult ants (*Camponotus festinus*): roles in colony founding by queens and in larval rearing by workers. *Journal of Insect Physiology* 40, 723–729.
- Michelette, E.R.F., Soares, A.E.E., 1993. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honeybee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 24, 431–440.
- Nelson, C.M., Ihle, K.E., Fondrk, M.K., Page, R.E., Amdam, G.V., 2007. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology* 5, 673–677.
- Page Jr., R.E., Scheiner, R., Erber, J., Amdam, G.V., 2006. The development and evolution of division of labor and foraging specialization in a social insect (*Apis mellifera* L.). *Current Topics in Developmental Biology* 74, 253–286.

- Pan, M.L., Telfer, W.H., 2001. Storage hexamer utilization in two lepidopterans: differences correlated with the timing of egg formation. *Journal of Insect Science* 1, 1–9.
- Piulachs, M.D., Guidugli, R.R., Barchuk, A.R., Cruz, J., Simões, Z.L., Bellés, X., 2003. The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 459–465.
- Rembold, H., Kremer, J.P., Ulrich, G.M., 1980. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 11, 29–38.
- Robbs, S.L., Ryan, R.O., Schmidt, J.O., Keim, P.S., Law, J.H., 1985. Lipophorin of the larval honeybee, *Apis mellifera* L. *Journal of Lipid Research* 26, 241–247.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A., Barrell, B., 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16, 944–945.
- Schäfer, M.O., Dietemann, V., Pirk, C.W.W., Neumann, P., Crewe, R.M., Hepburn, H.R., Tautz, J., Crailsheim, K., 2006. Individual versus social pathway to honeybee worker reproduction (*Apis mellifera*): pollen or jelly as protein source for oogenesis? *Journal of Comparative Physiology A* 192, 761–768.
- Scheller, K., Fisher, B., Schenkel, H., 1990. Molecular properties, functions and developmentally regulated biosynthesis of arylphorin in *Calliphora vicina*. In: Hagerdorn, H.H., Hildebrand, J.G., Kidwell, M.G., Law, J.H. (Eds.), *Molecular Insect Science*. Plenum Press, New York.
- Schmidt-Capella, I.C., Hartfelder, K., 1998. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *Journal of Insect Physiology* 44, 385–391.
- Seehuus, S., Norberg, K., Krekling, T., Fondrk, K., Amdam, G.V., 2007. Immunogold localization of vitellogenin in the ovaries, hypopharyngeal glands and head fat bodies of honeybee workers, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science* 7 (52), 14 available online: <insectscience.org/7.52>.
- Slansky, J.R., Scriber, J.M., 1985. Food consumption and utilization. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Oxford Pergamon Press, New York.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76–85.
- Telfer, W.H., Kunkel, J.G., 1991. The function and evolution of insect storage hexamers. *Annual Review of Entomology* 36, 205–228.
- Telfer, W.H., Pan, M.L., 2003. Storage hexamer utilization in *Manduca sexta*. *Journal of Insect Science* 3, 26.
- Telfer, W.H., Keim, P.S., Law, J.H., 1983. Arylphorin, a new protein from *Hyalophora cecropia*: comparisons with calliphorin and manducin. *Insect Biochemistry* 13, 601–613.
- Toth, A.L., Robinson, G.E., 2007. Evo-devo and the evolution of social behavior. *Trends in Genetics* 23, 334–341.
- Toth, A.L., Kantarovich, S., Meisel, A.F., Robinson, G.E., 2005. Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honeybees. *Journal of Experimental Biology* 208, 4641–4649.
- Tozetto, S.O., Bitondi, M.M.G., Dallacqua, R.P., Simões, Z.L.P., 2006. Protein profiles of testes, seminal vesicles and accessory glands of honeybee pupae and their relation to the ecdysteroid titer. *Apidologie* 38, 1–11.
- Wheeler, D.E., Buck, N.A., 1995. Storage proteins in ants during development and colony founding. *Journal of Insect Physiology* 41, 885–894.
- Wheeler, D.E., Buck, N.A., 1996. A role for storage proteins in autogenous reproduction in *Aedes atropaipus*. *Journal of Insect Physiology* 42, 961–966.
- Wheeler, D.E., Tuchinskaya, I.I., Buck, N.A., Tabashnik, B.E., 2000. Hexameric storage proteins during metamorphosis and egg production in the diamond-back moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera). *Journal of Insect Physiology* 46, 951–958.
- Winston, M.L., 1987. *The Biology of the Honeybee*. Harvard University Press, Cambridge, MA.