UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Análise comparativa da expressão de vitelogenina em três espécies de abelhas sem
ferrão (Meliponini) que diferem quanto à atividade reprodutiva

Rodrigo Pires Dallacqua

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Área de concentração: Biologia Comparada

Ribeirão Preto
2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

RODRIGO PIRES DALLACQUA

**Análise comparativa da expressão de vitelogenina em três espécies de abelhas
sem ferrão (Meliponini) que diferem quanto à atividade reprodutiva**

Ribeirão Preto
2005

RODRIGO PIRES DALLACQUA

**Análise comparativa da expressão de vitelogenina em três espécies de abelhas
sem ferrão (Meliponini) que diferem quanto à atividade reprodutiva**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão
Preto para a obtenção do título de Mestre
em Ciências

Área de concentração: Biologia Comparada
Orientadora: Prof^a Dra Márcia Maria Gentile
Bitondi

Ribeirão Preto
2005

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

DALLACQUA, RODRIGO PIRES

Análise comparativa da expressão de vitelogenina em três espécies de abelhas sem ferrão (Meliponini) que diferem quanto à atividade reprodutiva./Rodrigo Pires Dallacqua; orientadora Bitondi, Márcia Maria Gentile. Ribeirão Preto, 2005.

70 p. 80: il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto /USP – Área de concentração: Biologia Comparada.

1. Meliponíneos. 2. Vitelogenina. 3. Reprodução de operárias.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rodrigo Pires Dallacqua

Análise comparativa da expressão de vitelogenina em espécies de abelhas sem ferrão (Meliponini) que diferem quanto à atividade reprodutiva

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão
Preto para a obtenção do título de Mestre
em Ciências

Área de concentração: Biologia Comparada

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Profº(a) Dr(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Profº(a) Dr(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Profº(a) Dr(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Para aqueles que me acompanharam nos primeiros passos e me ensinaram coisas sem as quais eu não seria capaz de atingir objetivos e almejar vôos mais altos, minha família. Em especial para meus pais **Angela Maria Pires e José Julio Dallacqua Filho**, que apesar da distância e saudade, os maiores obstáculos para seguir em frente, me fortaleceram e fizeram chegar até aqui,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- À Prof^a Dra Márcia Maria Gentile Bitondi por aceitar o desafio de me orientar e fazê-lo de forma irrepreensível, mas acima de tudo pela amizade, respeito e confiança;
- À CAPES pela bolsa concedida, fundamental para realização deste trabalho;
- Aos professores do Zilá L. P. Simões e Klaus Hartfelder pela amizade e toda boa vontade e auxílios prestados;
- Ao Sidnei Mateus, por toda ajuda prestada no manejo e coleta das abelhas sem ferrão;
- Ao professor Ronaldo Zucchi, por gentilmente ceder as colônias de *Frieseomelitta varia* e à professora Ana Maria Bonetti pelos espécimes de *Melipona scutellaris* utilizados neste trabalho;
- Às minhas queridas amigas Aline Mackert dos Santos e Gesline Fernandes de Almeida, pelo carinho, companheirismo e inestimável amizade;
- À Renata Andrade Cavallari, secretaria da pós-graduação, por toda ajuda, amizade e momentos divertidos;
- Aos amigos pós-graduandos, estagiários, técnicos e professores do bloco A da Genética, que me receberam de braços abertos e sem os quais minha caminhada seria muito mais difícil;
- À Adriana Mendes e Vera Figueiredo, pela amizade, ensinamentos, diversão e auxílio no laboratório desde o início;

- Aos amigos da moradia de pós-graduação (população fixa ou flutuante), especialmente: Simone, Andréia, Carlo, Cristina, Virgílio, Selma, Claudia, Mariana, Denis, Carô, Juliana, Marcela, entre tantos outros;
- Aos amigos do Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada com quem trabalhei na organização do nosso II Encontro;
- À todos amigos que não foram aqui citados, mas não menos importantes em minha vida e trajetória.
- À Maria das Graças Santos de Souza, por minha admiração e respeito, mas principalmente por toda confiança em mim depositada, que não tem preço;
- À Luana Santos de Souza, pela cumplicidade, amor e sacrifício para estar ao meu lado até agora, com certeza uma das pessoas mais importantes nesta conquista e na minha vida;
- À minha família, por acreditarem e investirem em um sonhador que não vive sem seu auxílio para todas as horas;

Muito obrigado!!!

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."
(Martin Luther King)

"A vida só pode ser compreendida olhando-se para trás;
mas só pode ser vivida olhando-se para a frente."
(Soren Kierkegaard)

"Em paralelo com o infinitamente pequeno dos átomos
e com o infinitamente grande das galáxias
devemos considerar também o infinitamente complexo da vida."
(Hubert Reeves)

RESUMO

DALLACQUA, R. P. **Análise comparativa da expressão de vitelogenina em espécies de meliponíneos (abelhas sem ferrão) que diferem quanto à atividade reprodutiva.** 2005. f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

As operárias de abelhas sem ferrão são peculiares com relação à divisão do trabalho reprodutivo para a manutenção da colônia, visto que podem produzir ovos reprodutivos que originam os machos, além dos ovos tróficos destinados a alimentar a rainha. Desta forma, os estudos de expressão de genes e de proteínas envolvidos na biossíntese de vitelo – vitelogênese - e incorporação deste material aos ovócitos contribuem para evidenciar diferenças intra e inter-específicas entre as fêmeas, em relação à fertilidade e comportamento reprodutivo. Os perfis de expressão do gene codificador da vitelogenina e da própria proteína, precursora da principal constituinte do vitelo, foram determinados para várias etapas do desenvolvimento de três espécies de abelhas sem ferrão. Para este estudo foram selecionadas as espécies *Frieseomelitta varia*, cujas operárias nunca põem ovos, mesmo em condições de orfandade, *Scaptotrigona postica* e *Melipona scutellaris*, cujas operárias desenvolvem os ovários e participam ativamente da produção de machos. O RNA total de corpo gorduroso – sítio de biossíntese de vitelogenina – de operárias destas espécies foi extraído e o cDNA obtido por transcrição reversa semiquantitativa foi amplificado, clonado e seqüenciado utilizando-se *primers* específicos para a vitelogenina de *Apis mellifera*. Os resultados revelaram que os cDNA parciais obtidos são bastante conservados entre *F. varia*, *S. postica* e *M. scutellaris* e mostram alta identidade (93-100%) em relação à região 3'-terminal do cDNA da vitelogenina de *A. mellifera*. Entretanto, o perfil de abundância do transcrito difere entre as espécies de meliponíneos e entre estas e as abelhas melíferas. Em *F. varia* e *S. postica* a expressão do transcrito mostrou-se constitutiva ao longo dos períodos pupal e adulto, mas *M. scutellaris* mostrou diminuição da abundância de transcritos nas fases pupais mais avançadas e nas operárias recém-emergidas. Estas espécies diferem de *A. mellifera* cujas pupas não expressam o gene da vitelogenina. A expressão constitutiva

deste gene em *F. varia* e *S. postica* mostra que a atividade do gene em questão não é modificada pela variação dos títulos de ecdisteróides e hormônio juvenil descrita para *A. mellifera* e outros insetos, indicando, portanto, ausência de controle da transcrição de vitelogenina por hormônios nas espécies de meliponíneos estudadas. No entanto, os resultados indicam a existência de controle nutricional da atividade do gene da vitelogenina, dado o aumento de expressão verificado em operárias *F. varia* alimentadas com dieta rica em proteínas (contendo pólen - a fonte de proteínas para as abelhas - e açúcar) em comparação com aquelas que receberam dieta exclusiva de carboidrato (açúcar). A presença da proteína vitelogenina na hemolinfa de *F. varia* ocorre concomitantemente com a expressão constitutiva do transcrito. Neste aspecto, difere de *S. postica* e *M. scutellaris* que também expressam o transcrito da vitelogenina ao longo do estágio pupal e adulto, mas a proteína correspondente somente é detectada nas operárias destas espécies que estão exercendo a função de nutridoras de crias. Pode-se concluir que o gene da vitelogenina é conservado entre as espécies de abelhas até aqui estudadas, porém sua expressão e possivelmente sua regulação diferem entre meliponíneos e abelhas melíferas, refletindo as diferentes estratégias utilizadas na divisão do trabalho reprodutivo.

Palavras chave: Meliponíneos. Vitelogenina. Reprodução de operárias.

ABSTRACT

DALLACQUA, R. P. **Comparative analysis of vitellogenin expression in stinglessbee species (Meliponini) that are different on reproductive activity.** 2005. f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The stingless bee workers are peculiar with relation to reproductive division of labor to colony maintenance, since they are able to produce reproductive eggs that will develop in males, beyond trophic eggs to feed the queen. In this way, studies about gene and protein expression involved on the yolk biosynthesis – vitellogenesis – and the incorporation of this material to the oocytes contributes to evidence intra and inter-specific differences between females, in relation to fertility and reproductive behavior. The vitellogenin, the main yolk constituent precursor, gene expression and the protein itself profile were determined to several developmental stages of three stinglessbee species. To this work were selected the species *Frieseomelitta varia*, whose workers never lay eggs, even in a queenless condition, *Scaptotrigona postica* and *Melipona scutellaris*, whose workers develop their ovaries and participate actively to male production. The whole RNA of the fat body – the vitellogenin biosynthesis site - of these worker species was extracted and the cDNA obtained by semiquantitative reverse transcription amplified, cloned and sequenced through *Apis mellifera* vitellogenin specific primers. The results reveal that the obtained partial cDNAs are very conserved among *F. varia*, *S. postica* and *M. scutellaris* and show high identity (93-100%), in relation to 3'-end *A. mellifera* vitellogenin gene. However, transcript abundance profile is different among stinglessbee species and with honeybees. In *F. varia* and *S. postica* the transcript expression is constitutive during pupal and adult periods, but *M. scutellaris* showed transcript reduction in the advanced pupal phases and newly emerged workers. These species are different from *A. mellifera* pupae that do not express vitellogenin gene. This constitutive gene expression in *F. varia* and *S. postica* shows that the gene activity is not modified by the ecdysteroid and juvenile hormone titers as descript to *A. mellifera* and other insects, indicating absence of vitellogenin transcriptional control by

hormones in the studied stingless bee species. However, the results indicate the existence of vitellogenin gene activity nutritional control, given the verified expression increase in *F. varia* workers and drones fed with a rich protein diet (with pólen – the protein bee source – and sugar) in comparison with which ones received exclusive sugar diet. The presence of vitellogenin protein on the *F. varia* hemolymph occurs concomitantly with the constitutive transcript expression. In this aspect, is different of *S. postica* and *M. scutellaris* which also express the vitellogenin transcript during pupal and adult stages, but the correspondent protein is only detected on the workers of these species that are exerting nurse tasks. Is possible conclude that vitellogenin gene is conserved among the studied bee species, but its expression and possibly regulation are different among stingless bees and honey bees, reflecting different strategies used on reproductive division of labor.

Keywords: stingless bee, vitellogenin, worker reproduction.

1. Introdução

A eussocialidade nos insetos é caracterizada pela presença de uma casta reprodutiva, sobreposição de gerações e cuidado com a prole (Michener, 1974, 2000), no contexto de um complexo padrão organizacional, com os indivíduos da colônia exercendo funções bem definidas. A evolução da socialidade em insetos é um tema bastante explorado do ponto de vista da cooperação entre os indivíduos de uma espécie para a manutenção da estrutura e reprodução da colônia. A organização da vida social é caracterizada por divisão de trabalho de forma cooperativa e mutuamente benéfica que nas sociedades avançadas torna-se evidente pela presença de indivíduos com especializações anatômicas, fisiológicas e de comportamento, fenômeno conhecido como polifenismo de castas (Nijhout, 1999).

Em colônias de abelhas eussociais avançadas, este fenômeno é evidenciado pela origem de castas femininas, as quais possuem acentuadas diferenças no grau de fecundidade (Hartfelder e Engels, 1998). Portanto, podemos encontrar na colônia indivíduos parcial ou completamente estéreis, as operárias, e outros capazes de se reproduzirem em altas taxas, as rainhas. Nas abelhas da família Apidae, a reprodução é de responsabilidade da rainha, e as funções de manutenção da colônia são executadas pelas operárias, que assumem uma sucessão de tarefas de acordo com sua faixa etária (Free, 1980), fenômeno conhecido como polietismo etário. Entretanto, a realização de tarefas específicas para cada uma das idades é definida de acordo com a dinâmica das condições ecológicas (Gordon, 1996), o que gera uma certa plasticidade na realização de tais tarefas. Esta plasticidade é decorrente da interação de fatores internos e externos que atuam na organização da colônia (Giray e Robinson, 1994).

Nas abelhas eussociais da tribo Meliponini, a idade cronológica (aproximada) pode ser deduzida pela alternância na realização das tarefas e o grau de

melanização/esclerotização do exoesqueleto cuticular. As operárias mais jovens, por exemplo, têm menor teor de pigmentos de melanina na cutícula e são responsáveis pelas tarefas de cuidado com as crias e construção das células dos favos. A limpeza e guarda da colônia são realizadas por operárias um pouco mais melanizadas e, finalmente, as abelhas mais velhas que apresentam completa melanização/esclerotização da cutícula, são responsáveis pelo forrageamento (Sakagami, 1982).

Figura 1: Relação entre função e grau de esclerotização/pigmentação da cutícula em operárias adultas de *Frieseomellita varia*

Com relação à divisão do trabalho reprodutivo, é possível observar uma ampla gama de comportamentos no relacionamento entre as castas das diferentes espécies de abelhas. As rainhas de *Apis mellifera* acabam monopolizando a função de reprodução, pois possuem um par de ovários extremamente ativos formados cada um por 150 a 200 ovaríolos, enquanto as operárias têm somente 4 a 7 ovaríolos por ovário (Dedej *et al.*, 1998; Hartfelder e Engels, 1998). Em condições especiais como, por exemplo, na ausência da rainha ou também em colônias muito populosas, as operárias são capazes de produzir ovos que originarão zangões, uma vez que não são fecundados. Deste modo, as operárias *Apis mellifera* podem eventualmente colaborar no processo reprodutivo.

Os estudos mais relevantes sobre este quesito em abelhas sem ferrão, entre as quais foram observadas operárias que participam ativamente da postura dos ovos, estão relacionados à descrição morfológica do grau de desenvolvimento de seus ovários, em presença ou ausência da rainha. De acordo com Sakagami *et al.* (1963) e Zucchi (1977), são encontrados quatro padrões de desenvolvimento ovariano nestas abelhas:

- Operárias que não apresentam ovários ativos em nenhuma circunstância, mesmo em colônias órfãs, ou seja, desprovida de rainha;
- Operárias que não têm ovários ativos em presença de rainhas;
- Operárias que apresentam ovários ativos em alto grau em presença de rainha;
- Operárias que apresentam ovários ativos com uma certa frequência em presença de rainha, porém nem todas as operárias apresentam ovócitos em crescimento.

A maioria das operárias de espécies de abelhas sem ferrão desenvolve os ovários e põe ovos mesmo na presença da rainha (Sakagami *et al.*, 1963; Sakagami e Zucchi, 1966; Sakagami, 1982). Porém, tais ovos não são fecundados, pois as operárias jamais se acasalam. Estes ovos têm como destino: 1) Se desenvolver nos machos das colméias ([Beig](#), 1972; Sakagami, 1982), ou 2) Servir de alimento para a rainha, visto que a prática da oofagia é comum entre os Meliponini (Sakagami *et al.*, 1963; Sakagami, 1982). A diferença morfológica entre os ovócitos que originarão os ovos tróficos e os reprodutivos reside no tamanho e número de células nutridoras, maiores nos primeiros (Cruz-Landim, 2000).

Exceção feita a *Leurotrigona muelleri*, não há um controle inibitório do desenvolvimento ovariano das operárias pela rainha, como ocorre em *Apis mellifera*, o que possibilita a atividade reprodutiva das operárias de meliponíneos (Cruz-Landim, 2000; Zucchi, 1993). Foi hipotetizada a ocorrência de um estímulo para a deposição de vitelo no ovócito que acarreta em ovulação precoce das operárias nutridoras jovens, que se mantêm mais próximas à rainha, ao passo que as nutridoras mais velhas fogem deste mecanismo de controle (Cruz-Landim, 2000). Como consequência, os ovos gerados na primeira situação não são capazes de se desenvolver, tornando-se uma fonte de nutrientes, ou seja, os ovos tróficos.

A postura de ovos reprodutivos pelas operárias é entendida como um comportamento egoísta, desenvolvido a partir de seleção individual. A fertilidade destas é dependente de fatores como nutrição, sazonalidade e temperatura (Kropáčová e Haslbachová, 1969; Lin e Winston, 1998) e está relacionada com o *fitness* da colônia. A postura de ovos reprodutivos por operárias pode ocasionar perdas na colônia, devido à diminuição de produtividade (Montague e Oldroyd, 1998) ou problemas com a realização inadequada de tarefas pelas operárias poedeiras (Koedam *et al.*, 1999).

A participação de operárias de abelhas sem ferrão na produção de machos está aparentemente relacionada ao comportamento monoândrico das rainhas, ou seja, se acasalam com um único macho durante o vôo nupcial, o que acarreta alteração na estrutura parental da colônia (Tòth *et al.*, 2002). As operárias, neste caso, são mais relacionadas aos filhos de suas irmãs que aos da rainha (Hamilton, 1972). Portanto, é mais vantajoso para as operárias produzirem seus próprios descendentes ou cuidarem dos filhos de suas irmãs (Korb e Heinze, 2004) do que dos filhos da rainha.

Uma exceção à participação de operárias na postura e produção de ovos em meliponíneos refere-se às espécies do gênero *Frieseomelitta*, nas quais as operárias são permanentemente estéreis e, portanto, não participam da produção de ovos (Terada, 1974; Staurengo da Cunha *et al.*, 1986; Staurengo da Cunha e Campos, 1993; Boleli *et al.*, 1999). Tal esterilidade era inicialmente atribuída à morfogênese incompleta dos ovários. No entanto, Boleli *et al.* (1999), analisando os estágios imaturos das operárias, mostraram que a morfogênese dos ovariolos ocorre normalmente em *F. varia*, embora os cystócitos não se diferenciem em ovócitos vitelogênicos. Foi constatado que, após a diferenciação dos ovariolos, durante a fase pupal, inicia-se um processo de degeneração dos ovários, que nas abelhas adultas tornam-se uma massa de tecido desprovido de células germinativas, cuja função, se existe, é desconhecida.

Em contraposição ao que ocorre em *F. varia*, as operárias de *Scaptotrigona postica* apresentam ovários bem desenvolvidos e participam ativamente da postura de ovos e produção de machos, mesmo em presença da rainha (Sakagami e Zucchi, 1966; Beig, 1972; Staurengo da Cunha, 1977). A intensidade da atividade de oviposição das operárias de *Scaptotrigona postica* está relacionada com sua idade. As nutridoras são responsáveis pela maioria dos ovos produzidos (Engels e Engels, 1977; Bego *et al.*, 1983; Cruz-Landim, 2000), sendo as mais jovens responsáveis pela produção de ovos tróficos enquanto as mais velhas produzem os reprodutivos (Cruz-Landim, 2000). Os machos filhos de operárias constituem uma fração maior que os gerados pela rainha (Beig, 1972; Bego, 1977). Também em *Melipona scutellaris*, a maioria dos ovos que originam os machos da colônia é produzida pelas operárias (Tóth *et al.*, 2002), porém, somente uma porcentagem destas têm ovários passíveis de serem ativados e realizam postura. Assim como observado em *Scaptotrigona postica* e *Melipona scutellaris*, as

operárias de *Apis mellifera* mais aptas a ativar seus ovários e se tornarem poedeiras são aquelas que exercem a atividade de nutridoras de crias (Engels, 1974; Fluri *et al.*, 1982; Engels *et al.*, 1990).

Em geral, os ovos reprodutivos das operárias dos meliponíneos são postos em células nas quais a rainha previamente ovipositou, chegando a haver ações agressivas contra esta. Tal processo pode ocorrer em dois momentos: (1) uma operária oviposita imediatamente após a rainha, antes da operculação da célula do favo, ou (2) no momento da operculação. Em ambos os casos, as larvas que emergem competem pelo alimento, no entanto, como o desenvolvimento dos machos é mais rápido, suas larvas acabam predando o ovo da rainha (Beig, 1972).

O sucesso reprodutivo das espécies está intimamente relacionado com a vitelogênese, ou seja, síntese e incorporação de vitelo nos ovócitos (Hagedorn e Kunkel, 1979). Desta forma, estudos de proteínas componentes do vitelo podem ser importantes para entender as diferenças casta-específicas relacionadas à genética, bioquímica e fisiologia da reprodução.

Dentro deste contexto, a vitelogenina dos insetos tem se constituído em modelo para estudos sobre reprodução, visto que esta proteína, abundante na hemolinfa, é a precursora da principal proteína constituinte do vitelo. Os estudos sobre a vitelogenina em abelhas estão focados em *Apis mellifera*, na qual apresenta-se como uma glicolipoproteína com peso molecular aparente de 180 kDa (Wheeler e Kawooya, 1990). Sua biossíntese acontece nos trofócitos do corpo gorduroso, sendo em seguida secretada para hemolinfa, onde se acumula. O crescimento dos ovócitos das rainhas e operárias órfãs ocorre às custas do seqüestro de moléculas de vitelogenina da hemolinfa para os ovários e ovócitos. Nestes, a vitelogenina é modificada,

denominando-se então vitelina e será parte integrante do vitelo (Hagedorn e Kunkel, 1979), material nutritivo dos ovos, cuja função consiste em prover embriões com os componentes necessários para seu desenvolvimento.

O estudo de vitelogenina nestas abelhas é de especial interesse, pois a regulação temporal assim como as taxas de biossíntese desta proteína diferem entre as castas. Nas rainhas, a vitelogenina aparece na hemolinfa ainda no período pupal, aproximadamente 60 horas antes da emergência, e aumenta continuamente, chegando a ser pelo menos 10 vezes mais abundante do que nas operárias. Nestas, a vitelogenina também é primeiramente detectada na hemolinfa no início do período pupal, porém mais próximo à emergência, ou seja, aproximadamente 10 horas antes deste evento (Barchuk *et al.*, 2002). Nas rainhas, a taxa de vitelogenina na hemolinfa geralmente corresponde a 55-60% do total de proteínas e em operárias, ao final da primeira semana de vida adulta, chega a 30-40%, diminuindo nas mais velhas, forrageiras. Os zangões também sintetizam vitelogenina, embora em nível consideravelmente menor do que aquele observado nas operárias, e neles, assim como nas operárias, a taxa de vitelogenina decresce conforme a atividade do vôo se intensifica (Engels *et al.*, 1990).

Como a vitelogenina é uma proteína necessária à produção de ovos e, portanto, à fertilidade, sua presença em operárias não-ovipositoras e em zangões é surpreendente, mas esta proteína supostamente tem outra(s) função(ões) e pode estar envolvida no transporte de lipídios (Engels *et al.*, 1990), além de constituir importante elemento da resposta imune (Amdam *et al.*, 2004). Em alguns insetos, a vitelogenina tem sido associada ao transporte de lipídeos, fosfatos, hormônios, metais e vitaminas (Chen *et al.*, 1997; Sappington e Raikhel, 1998; Nose *et al.*, 1997).

O controle da expressão da vitelogenina tem sido um tema bastante explorado na literatura, sobretudo nos aspectos relacionados à regulação hormonal e nutricional de sua biossíntese, que foram estudados principalmente em *Locusta migratoria*, *Lymantria dispar* e *Aedes aegypti*. Nestes insetos, a expressão da vitelogenina é influenciada (induzida ou reprimida) por hormônio juvenil ou análogos sintéticos (Wyatt, 1988; Davis *et al.*, 1990; Deitsch *et al.*, 1995). Um destes análogos - “pyriproxyfen” - induziu a síntese de vitelogenina no corpo gorduroso de *Locusta migratoria* (Edwards *et al.*, 1993). Mas o efeito hormonal pode ser, inversamente, o de reprimir a síntese desta proteína. No Lepidoptera *Lymantria dispar*, por exemplo, há supressão da síntese de vitelogenina quando larvas de 5º instar são tratadas com “methoprene”, um outro análogo do hormônio juvenil (Davis *et al.*, 1990).

Embora o efeito do hormônio juvenil no controle da síntese de vitelogenina tenha sido claramente demonstrado para vários insetos, os aspectos celulares e moleculares que viabilizam sua ação não foram ainda esclarecidos, assim como não foram também identificados receptores para este hormônio. Existem evidências contundentes em *Drosophila melanogaster* e *Heliothis virescens* de que a proteína Usp (*ultraspiracle*), componente do complexo receptor de ecdisona, também constitui receptor de hormônio juvenil (Jones e Sharp, 1997; Jones e Jones, 2000; Jones *et al.*, 2001; Wosniak *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2005). Esta molécula, juntamente com EcR (*ecdysone receptor*) forma um complexo com Usp, com função de regular genes específicos (entre eles o gene da vitelogenina) durante a ontogênese. Em *Apis mellifera*, Barchuk *et al.* (2004) caracterizaram o gene *usp* e verificaram que sua expressão é modulada por hormônio juvenil. Esta modulação, associada às características estruturais da sequência

deduzida da proteína USP, sugerem que esta funcione como uma proteína de ligação ao hormônio juvenil.

A atividade de Usp/EcR na ligação de ecdisona e a ação deste complexo na indução ou repressão de genes específicos tem sido consistentemente comprovada. Segundo o modelo proposto por Ashburner (1972, 1990) e Richards (1992), a ação da ecdisona ou 20-hidroxiecdisona (20E) é mediada por EcR que, ligado a Usp, regula duas classes de genes: os “*early genes*” (reguladores) que codificam fatores de transcrição essenciais para a ativação dos “*late genes*” (constitutivos), além de bloquear a transcrição dos próprios “*early genes*”.

Figura 2: Modelo de ação da ecdisona na modulação da expressão de vitelogenina em *Aedes aegypti*.

Estudos *in vitro* mostraram que doses fisiológicas de 20E estimulam a síntese de vitelogenina em corpos gordurosos de mosquitos. No Diptera *Aedes aegypti*, a indução da síntese de vitelogenina no corpo gorduroso requer 20E, que é sintetizada pelos ovários em resposta ao hormônio ecdisteroidogênico, secretado pelo cérebro após uma alimentação rica em sangue (Deitsch *et al.*, 1995; Kokoza *et al.*, 2001). Em *Drosophila melanogaster*, a vitelogênese é dependente do título de ecdisteróides, que por sua vez é influenciado pelo tipo de dieta alimentar (Bownes, 1989). A quantidade e/ou qualidade da alimentação também influencia a biossíntese ou título de vitelogenina de *Lymantria dispar*. Neste Lepidoptera, a deficiência nutricional leva ao aumento do título de hormônio juvenil na hemolinfa e à diminuição do nível de vitelogenina (Davis *et al.*, 1990).

A comparação entre os perfis de flutuação do título de vitelogenina e de hormônio juvenil na hemolinfa de abelhas operárias, durante o início da vida adulta, mostrou que o aumento do título desta proteína coincide com o aumento do título de hormônio juvenil e com níveis basais de ecdisteróides. No entanto, quando o título hormonal alcança níveis altos, em torno do 9º dia de vida adulta, e prossegue aumentando, a síntese de vitelogenina decai (Rutz *et al.*, 1976; Engels *et al.*, 1990, Huang *et al.*, 1991). O tratamento de abelhas operárias recém-emergidas com doses altas de “pyriproxyfen”, um análogo de hormônio juvenil, inibe a síntese e acúmulo de vitelogenina na hemolinfa durante a primeira semana do estágio adulto (Pinto *et al.*, 2000). Estes dados sugerem que o alto título de hormônio juvenil observado nas abelhas mais velhas pode concorrer para o significativo decréscimo na biossíntese de vitelogenina. Entretanto, a iniciação da biossíntese desta proteína em operárias, assim como nas rainhas, ainda antes da emergência, é dependente de um pequeno pico de

hormônio juvenil e a aplicação tópica deste hormônio, neste período de desenvolvimento, antecipa o início da biossíntese de vitelogenina (Barchuk *et al.*, 2002).

A secreção de vitelogenina pelo corpo gorduroso de operárias *Apis mellifera* também é diretamente influenciada pela qualidade da dieta a que têm acesso nos primeiros dias da vida adulta. Quando alimentadas com uma dieta rica em pólen – a fonte de proteínas para as abelhas – as operárias mostram título de vitelogenina significativamente mais alto do que quando recebem dieta pobre neste nutriente. A ausência de pólen na dieta impede ou diminui consideravelmente a secreção de vitelogenina na hemolinfa (Bitondi e Simões, 1996).

Em geral, acredita-se que a síntese de vitelogenina nos insetos é regulada em nível transcricional por hormônios. A transcrição do mRNA da vitelogenina em *Apis mellifera* é inicialmente detectada no período larval (Guidugli, 2004). O transcrito então desaparece durante o estágio pupal para somente se expressar pouco antes do aparecimento da proteína na hemolinfa no final deste estágio, tanto em operárias como em rainhas (Guidugli, 2001; Piulachs *et al.*, 2003). Porém, Engels (1987) observou que a vitelogenina não é mais detectada na hemolinfa de operárias com 20 dias de vida adulta, apesar do mRNA ser detectado em operárias de até 30 dias de idade (Guidugli, 2001). Em *Locusta migratoria*, o mRNA não desaparece com o término da biossíntese de vitelogenina, sugerindo manutenção do processo de transcrição mas não da tradução (Chinzei *et al.*, 1982, Valle, 1993).

Em vista do exposto, o estudo da expressão de vitelogenina e do seu gene codificador em operárias de três espécies de abelhas sem ferrão que diferem quanto à atividade de produção e postura de ovos, pretendeu fornecer informações relevantes sobre as diferentes estratégias relacionadas à divisão do trabalho reprodutivo.

2. Objetivos

A existência de padrões distintos de desenvolvimento dos ovários de operárias em abelhas sem ferrão reflete diferentes estratégias relacionadas à divisão do trabalho reprodutivo. A análise comparativa de proteínas e genes envolvidos na reprodução e sua regulação em *Scaptotrigona postica* e *Melipona scutellaris*, cujas operárias ovipositam mesmo em presença da rainha, e *Frieseomelitta varia*, cujos ovariolos sofrem morte celular programada antes da emergência do adulto, torna estes insetos modelos interessantes para o estudo da expressão do gene da vitelogenina e sua proteína relativa, cujos dados já estão bem caracterizados para *Apis mellifera*, oferecendo a oportunidade de comparação dos resultados. Em vista do acima exposto, foram objetivos do presente trabalho:

- Identificar o gene da vitelogenina nas três espécies de abelhas sem ferrão e sua expressão em pupas e adultos de operárias nas três espécies;
- Caracterizar a dinâmica de acúmulo da proteína Vg na hemolinfa nas mesmas fases do desenvolvimento em que os transcritos foram analisados;
- Correlacionar, sempre que possível, os resultados obtidos com as curvas de Hormônio Juvenil (HJ) e ecdisteróides (20-E);
- Associar a expressão do gene e sua proteína relativa ao comportamento reprodutivo das operárias na divisão do trabalho reprodutivo.

3. Materiais e métodos

3.1. Material biológico

No presente projeto foram utilizadas operárias de *Frieseomelitta varia* e *Scaptotrigona postica* mantidas no Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP (Setores de Genética e Ecologia) e operárias de *Melipona scutellaris*, oriundas do Meliponário Uberlândia, nesta cidade, MG. Para identificação da idade das abelhas utilizou-se como critérios a intensidade da pigmentação dos olhos (pupas) e da cutícula corporal (adultos e pupas). O comportamento das abelhas adultas na execução de tarefas realizadas na colônia (polietismo etário) também foi utilizado como critério para estimar a idade cronológica das operárias. Estas características estão especificadas na tabela abaixo.

Tabela 1 – Caracterização da idade das abelhas durante os períodos pupal e adulto.

Espécie	Fase	Característica
<i>F. varia</i> , <i>M. scutellaris</i> e <i>S. postica</i>	Pw	Olho branco e corpo sem pigmentação
<i>F. varia</i> , <i>M. scutellaris</i> e <i>S. postica</i>	Pp	Olho rosa e corpo sem pigmentação
<i>F. varia</i> , <i>M. scutellaris</i> e <i>S. postica</i>	Pb	Olho marrom e corpo sem pigmentação
<i>F. varia</i> , <i>M. scutellaris</i> e <i>S. postica</i>	Pbl	Olho marrom escuro e apêndices alaranjados
<i>F. varia</i> , <i>M. scutellaris</i> e <i>S. postica</i>	Pbm	Olho marrom escuro e apêndices medianamente melanizados
<i>F. varia</i> , <i>M. scutellaris</i> e <i>S. postica</i>	Pbd	Olho marrom escuro e corpo com apêndices bem melanizados (tórax e abdome claros)

<i>F. varia</i>	Recém-emergida	Tórax e abdome claros
<i>F. varia</i>	Nutridora	Tórax melanizado e abdome claro com listras transversais
<i>F. varia</i>	Forrageira	Tórax e abdome escuros; operárias coletadas no interior da colônia
<i>M. scutellaris</i>	Recém-emergida	Tórax e abdome claros
<i>M. scutellaris</i>	Nutridora	Tórax e abdome escuros; operárias coletadas no interior da colônia (sobre o favo de cria)
<i>M. scutellaris</i>	Forrageira	Tórax e abdome escuros; operárias coletadas na entrada (exterior) da colônia
<i>S. postica</i>	Recém-emergida	Tórax e abdome claros
<i>S. postica</i>	Nutridora	Tórax e abdome escuros (exceto escutelo)
<i>S. postica</i>	Forrageira	Tórax e abdome escuros; operárias coletadas na entrada (exterior) da colônia

3.2. Clonagem e seqüenciamento de cDNAs codificadores de vitelogenina

3.2.1. Extração do RNA total

As abelhas operárias nutridoras das três espécies de meliponíneos foram identificadas e dissecadas sob lupa em solução salina 0,9% estéril. Para tanto, foram presas com alfinetes entomológicos a uma placa de Petri com parafina. Exceto para a amostra de *M. scutellaris*, o intestino foi descartado, na tentativa de evitar-se contaminação do corpo gorduroso abdominal por conteúdo intestinal, e o restante do abdome foi colocado em reagente *TRIzol*[®] (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento de RNA total - Invitrogen) e congelado em freezer - 80°C até o momento da extração do RNA.

As amostras congeladas em 1 mL de reagente *TRIzol*[®] foram processadas de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total obtido foi ressuspenso em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% para evitar degradação. O RNA total purificado foi quantificado em espectrofotômetro Cecil 3000 em comprimento de onda de 260 nm ou GeneQuant. Uma unidade de absorbância é igual a 40 µg RNA/mL. As amostras foram então estocadas em freezer - 80° C.

Precedendo a transcrição reversa (síntese de cDNA - complementar ao mRNA), o RNA total foi tratado com *DNase - RNase Free* (Promega) por 50 min à 37° C, para eliminação do DNA contaminante, e mais 15 min à 65° C, para inativação da enzima. Para construção da biblioteca de cDNA, utilizou-se 1 µg de RNA total, a enzima *Superscript II* (Invitrogen) e *Oligo (dT)₁₂₋₁₈* (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante. Desta forma, apenas uma fita de cDNA é gerada pela transcrição reversa.

3.2.2. Obtenção do fragmento de cDNA da vitelogenina

O cDNA parcial da vitelogenina (Vg) das espécies estudadas foi isolado e amplificado através de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) com *primers* específicos desenhados para Vg de *Apis mellifera*, cuja amplificação gerou um fragmento de aproximadamente 500 pares de bases, referente ao cDNA putativo da Vg de *Frieseomelitta varia*, *Melipona scutellaris* e *Scaptotrigona postica*. As sequências dos *primers* utilizados são: GRORI-IVG (F) (5'-CGACTCGACCAACGACTTC-3' - *sense*) GRORI-IVG (R) (5'-CCTTAAGTGGCAAGGAAAGCA-3' - *antisense*). Os fragmentos obtidos foram clonados, utilizando-se plasmídeo como vetor, e seqüenciados para confirmação dos genes amplificados.

As amplificações por PCR do cDNA da vitelogenina foram feitas utilizando-se a solução Eppendorf MasterMix (2,5x) (Eppendorf), em termociclador PTC-100 (*Programmable Thermal Controller Peltier-Effect Cycling*, MJ Reaserch). A mistura de reação consistiu de:

- 9,5 µL de água destilada estéril
- 12,5 µL de *MasterMix* Promega(2,5x)
- 1 µL de cDNA
- 1 µL de *foward primer* (10 µM)
- 1 µL de *reverse primer* (10 µM)

As condições de PCR utilizadas foram definidas no experimento de saturação.

- *Vitelogenina (vg)*:

36 ciclos { 94° C - 2 minutos
94° C - 30 segundos
58° C - 1 minuto
72° C - 1 minuto
72° C - 10 minutos

- *Actina (act)*:

30 ciclos { 94° C - 2 minutos
94° C - 30 segundos
60° C - 45 segundos
72° C - 1 minuto
72° C - 7 minutos

Os produtos de reação adicionados de tampão para as amostras (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25%, glicerol 30% em água) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1x (89 mM de Tris base, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, pH 8,0) corado com solução de Brometo de Etídeo (EtBr) (0,5µg/mL de gel).

3.2.3. Inserção do Fragmento de cDNA da vitelogenina em vetor de clonagem

Os fragmentos amplificados foram recortados do gel e purificados com o uso de colunas de extração do kit *PerfectPrep Gel CleanUp* (Eppendorf) e ligados em vetor plasmidial *TOPO TA Cloning kit* (Invitrogen) ou *pGEM®-T Easy* (Promega), conforme instruções dos fabricantes. Os vetores foram, então, utilizados para transformar células competentes por choque térmico.

3.2.4. Preparo das células quimiocompetentes

Escherichia coli da linhagem DH-5 α foi utilizada para inserção dos plasmídeos nos experimentos de subclonagem. Células de *E. coli* (estocadas a -80° C) foram inoculadas em 5 mL de meio de cultivo LB líquido e incubadas por 14 horas a 37° C sob agitação de 250 rpm. Deste cultivo, utilizou-se 50 μ L para inocular 50 mL de meio LB líquido a 37° C sob agitação até atingir a densidade óptica de 0,5 em comprimento de onda de 550 nm. As células foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos a 4° C em tubos *corex*. O precipitado foi ressuspenso em 5 mL de CaCl₂ 0,1 M e deixado em gelo por 25 minutos. Posteriormente, centrifugou-se a 6000 rpm por 5 minutos a 4° C. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado ressuspenso em 5 mL de CaCl₂ 0,1 M com 15% de glicerol. Foram feitas alíquotas de 250 μ L e estas foram guardadas a -80° C.

3.2.5. Clonagem e sequenciamento

As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio sólido de LB-ágar com ampicilina (1 mg/mL), na presença de X-Gal (5-bromo-cloro 3-indoil-B-D-galalactoside) e IPTG (isopropiltio-B-D-galactoside - Invitrogen; 4 μ g/mL). Após cerca de 16 horas de incubação a 37° C, os clones positivos (brancos) para a presença do fragmento foram inoculados em meio LB líquido com ampicilina (50 mg/mL) em tubos *Falcon* e incubados por mais 16 horas a 37° C e sob leve agitação (150 rpm).

Após a clonagem, o plasmídio com o inserto foi isolado através de colunas de extração do kit de *Perfectprep*® *Plasmid Mini* (Eppendorf), conforme instruções do fabricante. A presença do inserto foi detectada pela digestão do plasmídio com enzima *EcoRI* (Invitrogen) por 2 horas a 37° C em banho-maria. O produto da digestão foi

analisado em gel de agarose 1% em tampão TBE 1x e corado com brometo de etídio, para verificação do tamanho do inserto.

Os clones que possuíam o inserto foram seqüenciados pelo método de Sanger, por meio de sequenciador automático *ABI PRISM 310* (Applied Biosystems), após reação com *DNA Sequencing Kit, Big Dye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction - ABI PRISM* (Applied Biosystems). Nesta reação foram usados 2 µL de *big dye* (Perkin Elmer), 2 µL de tampão de seqüenciamento, 2 µL de plasmídio com o inserto, 3 µL de água estéril e 1 µL de *primer* universal M13F (5'-

25 ciclos { 96°C - 10 segundos
50°C - 5 segundos
60°C - 4 minutos

CGACGTTGTAAAACGGCCAGT-3' - *sense*) ou M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' - *antisense*), ambos são específicos para o reconhecimento dos sítios de inserção do inserto no plasmídio, resultando em um volume final de 10 µl de reação. A amplificação pelos *primers* M13F e M13R ocorreu sob as seguintes condições de PCR:

Os produtos desta reação foram precipitados com isopropanol 75% e seqüenciados. As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com a da vitelogenina de *Apis mellifera* e de outros organismos disponíveis na Internet usando o programa *blastx* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

As seqüências de nucleotídeos foram traduzidas com a ferramenta *DNA->Protein translate* (<http://ca.expasy.org/tools/#translate>), para análises comparativas da vitelogenina das abelhas sem ferrão em relação ao mRNA de *A. mellifera* (nº acesso:

NM001011578) e sua proteína deduzida (nº acesso: NP001011578), que foram realizadas através do alinhamento no programa ClustalW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>). As análises de filogenia molecular foram realizadas com as seqüências de aminoácidos deduzidas de *Pimpla niponica* (nº acesso: AAC32024), *Athalia rosae* (nº acesso: T30888), *Aedes aegypti* (nº acesso: AAQ92366), *Anopheles gambiae* (nº acesso: AAF82131), *Bombyx mori* (nº acesso: BAA06397) e *Tenebrio molitor* (nº acesso: AAU20328), além das seqüências de meliponíneos e *A. mellifera*, analisadas em programa Mega versão 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) e metodologia de *Neighbor joining*, a significância foi avaliada por 1000 repetições e a vitelogenina de *Caenorhabditis elegans* (nº de acesso: P05690) foi utilizada como grupo externo.

3.3. Abundância do cDNA da vitelogenina

3.3.1. Abundância do cDNA da vitelogenina ao longo dos estágios pupal e adulto das espécies de meliponíneos estudadas e em operárias de *F. varia* alimentadas com diferentes dietas

As abelhas operárias em diferentes fases do desenvolvimento e aquelas alimentadas com dieta contendo ou não proteínas foram identificadas e dissecadas sob lupa em solução salina 0,9% estéril. Para tanto, foram presas com alfinetes entomológicos a uma placa de Petri com parafina. Exceto para as amostras de *M. scutellaris*, o intestino foi descartado, na tentativa de evitar-se contaminação do corpo gorduroso abdominal por conteúdo intestinal, e o restante do abdome foi colocado em reagente *TRIzol*[®] (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento de RNA total - Invitrogen) e congelados em freezer - 80°C até o momento da extração do RNA.

Os procedimentos para extração e síntese de cDNA fita simples foram os mesmos acima descritos no experimento de clonagem e sequenciamento. Para as PCRs iniciais foram utilizados protocolos para teste do número de ciclos com a finalidade de estabelecer as condições ideais para amplificação do cDNA da vitelogenina. Para tanto, determinou-se o ponto de saturação da PCR com os *primers* GRORI-IVG F e GRORI-IVG R para todas as espécies de meliponíneos, testando-se um número crescente de ciclos (30, 33, 36, 39, 42 e 45), de maneira a escolher a melhor condição para visualização do fragmento diretamente no gel corado com EtBr.

Para controle das reações de PCR e análise do produto em géis de agarose foi utilizado o cDNA da actina, cuja expressão é constitutiva (*GenBank*, número de acesso AB023025). Para tanto, foram utilizados *primers* especificamente desenhados para *Apis mellifera*, que flanqueiam um fragmento de aproximadamente 150 nucleotídeos: ACTF

(5'-TGCCAACACTGTCCTTTCTG-3' - *sense*) e ACTR (5'-AGAATTGACCCACCAATCCA-3' - *antisense*). Também para a actina foram testados diferentes números de ciclos para a reação de PCR (25, 28, 30, 32 e 35). As melhores condições encontradas estão especificadas no item 3.2.2.

3.4. Acúmulo da proteína vitelogenina ao longo do desenvolvimento

3.4.1. Coleta de hemolinfa e preparo das amostras

Alíquotas de hemolinfa de operárias de diferentes idades (pupas e adultas) das três espécies de meliponíneos e de operárias nutridoras *Apis mellifera*, (utilizadas para comparação) foram coletadas através de um pequeno corte superficial da cutícula abdominal, utilizando-se microcapilares de 5 μ L *BLAUBRAND*[®] *intraMARK*. Para se evitar degradação das amostras durante a extração, foi utilizada solução inibidora de proteases [leupeptin, SBTI (soybean trypsin inhibitor) e LBTI (lima bean trypsin inhibitor) na concentração de 0,05mg/10 μ L, e benzamidine 0,1M] na proporção de 1 μ L para cada 10 μ L de hemolinfa. Para se evitar a melanização da hemolinfa, os microcapilares foram previamente lavados em água destilada contendo alguns cristais de feniltiocarbamida (PTC).

Para separação da fase solúvel da hemolinfa, foi realizada uma centrifugação a 2000 g, por 2 min, a 10° C. Posteriormente, as amostras com teor de proteína total conhecido, estimado por ensaio espectrofotométrico (Bradford, 1976), foram submetidas a SDS-PAGE.

3.4.2. Coleta de corpo gorduroso e preparo das amostras

Para análise da vitelogenina no corpo gorduroso de *M. scutellaris*, o corpo inteiro de pupas e adultos de diferentes idades foi homogeneizado em *TRIzol*[®] (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina - Invitrogen) e o isolamento de proteínas foi realizado segundo o protocolo do fabricante. No passo final, o *pellet* de proteínas foi ressuspensão em SDS 1% e armazenado em freezer à -20°C até o momento da dosagem de proteínas, neste caso utilizando o método de Smith *et al.* (1985) para

amostras de proteínas contendo SDS. Esta mistura foi processada por SDS-PAGE e Western blotting para análise da expressão de vitelogenina. Para comparação, foi utilizado o corpo gorduroso de *Apis mellifera* nutridora preparado do mesmo modo.

3.4.3. Quantificação das proteínas totais das amostras de hemolinfa e corpo gorduroso

As proteínas da hemolinfa foram quantificadas utilizando-se o método de Bradford (1976) e as dos extratos de corpo gorduroso foram quantificadas segundo método de Smith *et al.* (1985). Diferentes concentrações de albumina sérica bovina foram utilizadas para construção de curvas padrão, por espectrofotometria a 595 nm e a 565 nm, respectivamente. Depois de quantificadas, amostras contendo 5 µg de proteínas foram utilizadas para eletroforeses e Western blots.

3.4.4. Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas de amostras de hemolinfa e extratos de corpo gorduroso foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5%, em presença de SDS. O procedimento baseia-se na descrição de Laemmli (1970). O gel de separação foi composto por 2,5 mL de solução de acrilamida (30 g) - Bis (0,8 g), 5 mL de tampão Tris-HCl 0,15 M pH 8,8, 2,3 mL de água, 30 µL de TEMED e 190 µL de persulfato de amônia (APS) 1%. O gel de empilhamento (4,26%) foi preparado com 0,375 mL de Acrilamida-Bis na mesma proporção usada para o gel de separação, 1,38 mL de tampão Tris-HCl 0,024 M pH 6,8, 0,825 mL de água, 0,010 mL de TEMED e 0,051

mL de APS 5%. O tampão usado nas cubas dos eletrodos era composto de 1,515 g de Tris-Base, 7,2 g de glicina, 0,5 g de SDS e 250 mL de água.

Diferentes volumes de tampão para amostras (1,25 mL de tampão do gel de empilhamento, 0,5 mL de sacarose 70%, 0,1g de SDS, 0,25 mL de mercaptoetanol, 3 mL de água e aproximadamente 10 µL de bromofenol azul 1%) foram adicionados às alíquotas de hemolinfa e extratos de corpo gorduroso, contendo cerca de 5 µg de proteínas totais. Estas amostras foram então desnaturadas a 100°C por 2 min e centrifugadas a 12000 g durante 2 minutos a 10° C. Os sobrenadantes resultantes foram aplicados aos géis para migração durante 2-3 horas, sob corrente de 20-25 mA, juntamente com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Os géis foram submetidos a Western blot ou foram corados com nitrato de prata (Caetano-Anollés e Gresshoff, 1994) para visualização da vitelogenina.

3.4.5. Western blotting

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de PVDF (*polyvinylidene fluoride*) *Immun-Blot*TM (Bio Rad). O *blotting* foi realizado de acordo com o protocolo de Towbin *et al.* (1979). Para tanto, utilizou-se o sistema de transferência "em tanque" em tampão (20mM Tris, 192mM glicina e metanol 20%) por 2h a 30V. As pistas dos géis contendo os marcadores de massa molecular foram coradas com Ponceau 0,5-1%. A coloração e revelação das membranas foram feitas segundo o protocolo do kit *ECL*[®] (Amersham Biosciences), na qual as membranas foram incubadas com solução Blotto (5% leite desnatado, 0,1% Tween 20 em PBS) *overnight*, seguida de uma rápida lavagem e incubação na mesma solução contendo o

anticorpo primário (soro anti-ovo de abelha - Bitondi e Simões, 1996) na proporção de 1:2000. Posteriormente, as membranas foram lavadas em PBS-Tween por 5 vezes e incubadas no 2º anticorpo (*anti-rabbit Ig*) por 1h, seguida de nova lavagem por mais 5 vezes em PBS-Tween. Após a última lavagem, as membranas foram incubadas nas soluções 1 e 2 do kit por 1 min. Para a detecção do sinal fluorescente, a membrana foi envolvida em folha plástica e colocada dentro de cassetes para exposição a filmes auto-radiográficos (Kodak XR-Omat) por no máximo 1h. Soluções de revelação e fixação da Kodak foram utilizadas para a revelação dos filmes.

4. Resultados

4.1. Sequenciamento do fragmento de *vg*

O cDNA parcial das três espécies de meliponíneos foi isolado a partir da biblioteca de operárias nutridoras de cada espécie, utilizando-se *primers* específicos para o gene codificador de vitelogenina de *A. mellifera*, GRORI-IVG (F) e GRORI-IVG (R), que geraram um fragmento de aproximadamente 500 pares de bases referente à região 3'-terminal do gene, próxima ao domínio GL/ICG, bastante conservado entre os insetos. Análises das seqüências deduzidas de aminoácidos com a ferramenta Blastx (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), mostraram uma alta identidade destas com o precursor de vitelogenina de *A. mellifera*, que variou entre 93% e 100% dependendo da qualidade das seqüências. O alinhamento das seqüências consenso (*amvg*, *fvvg*, *msvg* e *spvg*) de nucleotídeos (Figura 3) e aminoácidos deduzidos (Figura 4), demonstram que a Vg é bastante conservada nas espécies de abelhas analisadas.

Para avaliar a conservação das seqüências obtidas perante a Vg de outras espécies, foi construído um dendograma de similaridade (Figura 5) baseado nas seqüências de aminoácidos deduzidas desta proteína em outras seis espécies de insetos, sendo dois himenópteros (*Athalia rosae* e *Pimpla niponica*), dois dípteros (*Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*), um coleóptero (*Tenebrio molitor*) e um lepidóptero (*Bombyx mori*). As seqüências referentes aos himenópteros formaram dois grupos irmãos principais, um referente às espécies de abelhas, com alto suporte nodal (100% e 70%), e outro formado por *A. rosae* e *P. niponica*. Entretanto, os valores de *bootstrap* deste último e do ramo formado pelos himenópteros são baixos (59% e 43%, respectivamente).


```

msvg -----ACGAC
fvvg -----ACGAC
amvg AAGGCGTCTGAAGATTATCGCTACTCCGTTTCGCGGTCTCTGCGGCAATTCGACCACGAC
spvg -----ACGAA
          ****

msvg TCGACCAACGACTTCGTGGGACCCAAGAAGTGCCTGTTTCTGAAAAGCCCGAACACTTCGTA
fvvg TCGACCAACGACTTCGTGGGACCCAAGAAGTGCCTGTTTCTGAAAAGCCCGAACACTTCGTA
amvg TCGACCAACGACTTCGTGGGACCCAAGAAGTGCCTGTTTCTGAAAAGCCCGAACACTTCGTA
spvg AGGAACGGTCAATTCCTCGGTGGTGGAAACAGGTTTCTGGCTGAGGTCAGGATTGGCGCC
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

msvg GCCAGCTACGCTTTGATCAGTAACCAATGCGAGGGCGACTCGTTGAACGTGGCGAAATCT
fvvg GCCAGCTACGCTTTGATCAGTAACCAATGCGAGGGCGACTCGTTGAACGTGGCGAAATCT
amvg GCCAGCTACGCTTTGATCAGTAACCAATGCGAGGGCGACTCGTTGAACGTGGCGAAATCT
spvg CTTCTCGATTCTCTTCTTCAGCTTCATCGCGGCCTCGTTCTTCTCCATGCAATGGAATCT
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

msvg CTTCAGGATCACGATTGCATC-CGACAGGAGAGGACCCAGCAGAGAAACGTGATCAGCGA
fvvg CTTCAGGATCACGATTGCATC-CGACAGGAGAGGACCCAGCAGAGAAACGTGATCAGCGA
amvg CTTCAGGATCACGATTGCATC-CGACAGGAGAGGACCCAGCAGAGAAACGTGATCAGCGA
spvg GTACGGCTTC--GATTCGTCTCGACGGCGGTGCAACCAGACGCGCAA-GAGACCACTGG
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

msvg CAGCGAATCGGGACGATTGGACACCGAGATGTCGACCTGGGGTTACCACCATAACGTTAA
fvvg CAGCGAATCGGGACGATTGGACACCGAGATGTCGACCTGGGGTTACCACCATAACGTTAA
amvg CAGCGAATCGGGACGATTGGACACCGAGATGTCGACCTGGGGTTACCACCATAACGTTAA
spvg ACGCATGGTGAAGCAGAT-----
      * * * * *

msvg CAAACATTGCATGATCCACAGGACCCAGGTAAAGGAGACCGACGATAAGATCTGCTTCAC
fvvg CAAACATTGCATGATCCACAGGACCCAGGTAAAGGAGACCGACGACAAGATCTGCTTACAC
amvg CAAACATTGCATGATCCACAGGACCCAGGTAAAGGAGACCGACGACAAGATCTGCTTCAC
spvg -----

msvg CATGCGTCCAGTGGTCTCTTGCGCGTCTGGTTGCACCGCCGTCGAGACGAAATCGAAGCC
fvvg CATGCGTCCAGTGGTCTCTTGCGCGTCTGGTTGCACGGCCGTCGAGACGAAATCGAAGCC
amvg CATGCGTCCAGTGGTCTCTTGCGCGTCTGGTTGCACGGCCGTCGAGACGAAATCGAAGCC
spvg -----

msvg GTACAAGTTCCATTGCATGGA-GAAGAACGAGGCCGCGATGAAGCTGAAGAAGAGAATCG
fvvg GTACAAGTTCCATTGCATGGAAGAAGAACGAGGCCGCGATGAAGCTGAAGAAGAGAATCG
amvg GTACAAGTTCCATTGCATGGA-AAAGAACGAGGCCGCGATGAAGCTGAAGAAGAGAATCG
spvg -----

msvg AGAAGGGCGCCAATCCTG-ACCTCAGCCAGAAACCTGTTTCCACCACCGAGG-----
fvvg AGAAGGGCGCCAATCCTGGACCTCAGCCAGAAACCTGTTTCCACCACCGAGGAATTGAC-
amvg AGAAGGGCGCCAATCCTG-ACCTCAGCCAGAAACCTGTTTCCACCACCGAGGAATTGACC
spvg -----

msvg -----
fvvg -----
amvg GTTCCTTTAATC
spvg -----

```

Figura 3: Alinhamento com programa ClustalW dos fragmentos de vg obtidos a partir do cDNA de operárias nutridoras de *F. varia* (fvvg), *M. scutellaris* (msvg) e *S. postica* (spvg) com o mRNA de *A. mellifera* (Amvg). Notar a alta conservação entre as seqüências (asteriscos abaixo dos nucleotídeos), sobretudo entre amvg, fvvg e msvg (nucleotídeos destacados em cinza). O nucleotídeos destacados em preto (letra branca) são comuns somente às espécies de meliponíneos.

AmVg	DRFIGLTSDKFDVSLALDGERVMLKASEDYRYSVRGLCGNFDH	DSTNDFVGPKNCLFRKP
SpVg	-----	-----
MsVg	-----	DSTNDFVGPKNCLFRKP
FvVg	-----	DSTNDFVGPKNCLFRKP
AmVg	EHFVASYALISNQCEGDSLNVAKSLQDHCIRQERTQQRNVISDSESGRLDTEMSTWGYH	
SpVg	-----	-----
MsVg	EHFVASYALISNQCEGDSLNVAKSLQDHCIRQERTQQRNVISDSESGRLDTEMSTWGYH	
FvVg	EHFVASYALISNQCEGDSLNVAKSLQDHCIRQERTQQRNVISDSESGRLDTEMSTWGYH	
AmVg	HNVNKHCTIHRTQVKETDDK	ICFTMRPVSVCASGCTAVETKSKPYKFHCMEKNEAAMKLK
SpVg	-----	ICFTMRPVSVCASGCTAVETKSKPYKFHCMEKNEAAMKLK
MsVg	HNVNKHCTIHRTQVKETDDK	ICFTMRPVSVCASGCTAVETKSKPYKFHCMEKNEAAMKLK
FvVg	HNVNKHCMIHRTQVKETDDK	ICYTMRPVSVCASGCTAVETKSKPYKFHCMEEERGRDEAE
		** * * * * *
AmVg	KRIEKGANPDL	SQKPVSTTEELTVPFVCKA
SpVg	KRIEKGANPDL	SQKPVSTTEELTVPF----
MsVg	KRIEKGANPDL	SQKPVSTTE-----
FvVg	EENREGRQSWTSARNLFPPPRN	-----
	*	*

Figura 4: Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas da vitelogenina com programa ClustallW, baseados na tradução dos fragmentos obtidos de *F. varia* (FvVg), *M. scutellaris* (MsVg) e *S. postica* (SpVg) com Vg de *A. mellifera* (AmVg). Os aminoácidos destacados pelo asteriscos referem-se às regiões conservadas nas quatro espécies, ao passo que os em preto (*A. mellifera*, *F. varia* e *M. scutellaris*) e cinza (*A. mellifera*, *M. scutellaris* e *S. postica*) referem-se regiões comuns apenas três das espécies.

Figura

5:

Dendrograma de similaridade gerado a partir de seqüências de aminoácidos deduzidas de vitelogenina de abelhas e outros insetos. Seqüências utilizadas: *Apis mellifera* (AmVg), *Frieseomelitta varia* (FvVg), *Melipona scutellaris* (MsVg), *Scaptotrigona postica* (SpVg), *Pimpla niponica* (PnVg), *Athalia rosae* (ArVg), *Tenebrio molitor* (TnVg), *Anopheles gambiae* (AgVg), *Aedes aegypti* (AaVg), *Bombyx mori* (BmVg). Como grupo externo foi utilizada a seqüência do precursor Vg de *Caenorhabditis elegans* (CeVg). Os valores de *Bootstrap* (suporte nodal) estão indicados nos nódulos.

4.2. Abundância do cDNA de *vg*

Uma vez confirmado que os cDNAs isolados das espécies de meliponíneos tinham identidade com o gene codificador de vitelogenina, sua expressão foi caracterizada no corpo gorduroso de pupas e operárias adultas das espécies estudadas, por RT-PCR semiquantitativa seguida de análise em géis de agarose e brometo de etídeo. O cDNA de uma actina de *A. mellifera* (Genbank, número de acesso AB023025) que se expressa constitutivamente, foi utilizado como controle da amplificação e para a padronização da análise em géis de agarose.

Com a finalidade de estabelecer as condições ideais de PCR, fora dos limites de saturação, foram testados diversos protocolos de PCR variando-se o número de ciclos. As curvas obtidas são mostradas na Figura 6. O número de ciclos definido como ideal para amplificação do cDNA da vitelogenina foi de 36 para *F. varia* e *S. postica* (Figuras 6A e C) e de 42 para *M. scutellaris*, enquanto para *actina* o número de ciclos foi 31 para todas as espécies (Figura 6).

Figura 6: Determinação do número de ciclos para as reações de PCR (Testes de saturação). Géis de agarose corados com brometo de etídeo. Amostras de cDNA para vitelogenina de **(A)** *Frieseomelitta varia* (*fvvg*), **(B)** *Melipona scutellaris* (*msvg*), **(C)** *Scaptotrigona postica* (*spvg*) e de actina (*act*, *housekeeping gene*) obtidos por transcrição reversa do RNA total e amplificação por PCR utilizando-se diferentes números de ciclos. Os números abaixo das bandas indicam os ciclos de amplificação. M = Marcador de 100 pares de bases.

Nas operárias de *F. varia* e *S. postica* (Figura 7A e C), o gene codificador de vitelogenina é caracterizado por expressão constitutiva ao longo das fases do desenvolvimento estudadas. Já para *M. scutellaris* (Figura 7B), verifica-se discreta redução na quantidade de transcrito em fases pupais intermediárias e aparente aumento da abundância de transcritos nas operárias adultas nutridoras. O perfil de expressão do gene codificador de vitelogenina em *M. scutellaris* é mais similar ao de *A. mellifera* que os perfis das outras duas espécies de meliponíneos, muito embora transcritos para esta proteína não sejam detectados nas pupas iniciais e intermediárias de *A. mellifera*.

Figura 7: Perfil de abundância do gene da vitelogenina ao longo do desenvolvimento pupal e adulto de operárias de **(A)** *Frieselomelitta varia* (*fvvg*), **(B)** *Melipona scutellaris* (*msvg*) e **(C)** *Scaptotrigona postica* (*spvg*). A expressão constitutiva de um gene de actina (*act*) foi utilizada para comparação. Produto de RT-PCR em gel de agarose 1% corado com EtBr. L = larva de último instar; Pw = pupa de olho branco; Pp = pupa de olho rosa; Pb = pupa de olho marrom com cutícula não pigmentada; Pbl = pupa de olho marrom com cutícula levemente pigmentada; Pbm = pupa de olho marrom com cutícula medianamente pigmentada; Pbd = pupa de olho marrom com cutícula fortemente pigmentada; Re = operária adulta recém-emergida; N = operária adulta nutridora; F = operária adulta forrageira.

4.3. Influência da alimentação e confinamento na abundância de *vg* em zangões e operárias *F. varia*

No intuito de verificar a influência da dieta alimentar como um possível modulador da transcrição do gene codificador de vitelogenina em meliponíneos, operárias e zangões de *F. varia* foram alimentados com dietas contendo ou não proteínas. Ambos os indivíduos mostraram um discreto aumento, porém consistente, na abundância de transcritos em resposta à alimentação com a dieta rica em proteínas, contendo pólen (a fonte de proteínas para as abelhas) e açúcar que em relação à dieta

constituída somente de açúcar (Figura 8). Este resultado mostra que a dieta protéica desempenha um importante papel na atividade do gene da vitelogenina em adultos desta espécie.

Figura 8: Perfil de abundância do gene da vitelogenina de operárias e zangões de *Frieseomelitta varia* (*fvvg*) alimentados com diferentes dietas. A expressão constitutiva de um gene de actina (*act*) foi utilizada para comparação. Análise do produto de RT-PCR em gel de agarose 1% corado com EtBr. M = marcador de 100 pares de bases; Controle = operárias com 4 dias de idade; 6d e 12d = abelhas alimentadas por 6 ou 12 dias pós-emergência com Xarope = solução de água + açúcar 50%; Pólen = xarope 50% + pólen (*beebread*) 30%.

4.4. Proteína total e acúmulo de Vg na hemolinfa de operárias de meliponíneos ao longo do desenvolvimento pupal e adulto

As alíquotas de hemolinfa coletadas de operárias de *F. varia*, *M. scutellaris* e *S. postica* foram processadas para a quantificação de proteína total para subsequente análise por SDS-PAGE e detecção de vitelogenina por Western blot utilizando soro anti-vitelogenina de *A. mellifera*.

A banda de 180 kDa correspondente à vitelogenina de *A. mellifera* foi detectada em todas as espécies de meliponíneos estudadas (Figura 9). Porém a quantidade desta proteína na hemolinfa das abelhas sem ferrão, aparentemente, é menor que em *A. mellifera*. Assim, uma quantidade de proteína total cerca de dez vezes maior que a de *A. mellifera* sempre resultou em uma banda mais discreta de vitelogenina em amostras de hemolinfa de meliponíneos submetidas a SDS-PAGE que a banda correspondente à de *A. mellifera*.

Figura 9: Perfil protéico da hemolinfa ao longo do desenvolvimento de operárias de (A) *Frieseomelitta varia*, (B) *Melipona scutellaris* e (C) *Scaptotrigona postica*. SDS-PAGE corado com nitrato de prata (AgNO_3). Amostras de hemolinfa contendo 2 μg de proteína total. As setas indicam a banda de vitelogenina. Controle = hemolinfa de operária nutridora *Apis mellifera* (0,5 μg de proteína total); Larva = larva de último instar; Pw = pupa de olho branco; Pp = pupa de olho rosa; Pdp = pupa de olho rosa escuro; Pb = pupa de olho marrom com cutícula não pigmentada; Pbl = pupa de olho marrom com cutícula levemente pigmentada; Pbm = pupa de olho marrom com cutícula medianamente pigmentada; Pbd = pupa de olho marrom com cutícula fortemente pigmentada; Re = operária adulta recém-emergida; N = operária adulta nutridora; F = operária adulta forrageira.

Além destas diferenças quantitativas em relação ao título de proteínas entre meliponíneos, foi possível notar variação temporal no acúmulo de vitelogenina entre estas espécies de abelhas. As análises por Western blot utilizando soro anti-vitelogenina de *A. mellifera* revelaram que esta proteína está presente em fases do

desenvolvimento pupal e adulto de *F. varia* (Figura 10C). Esta proteína aparece na hemolinfa já no início do período pupal. Assim, tanto o transcrito (Figura 7A) quanto a proteína correspondente (Figura 10C) foram detectados durante o estágio pupal de *F. varia*. Em *S. postica* e *M. scutellaris*, a vitelogenina foi detectada somente em operárias adultas nutridoras (Figura 10A e B).

Figura 10: Western blot de amostras de hemolinfa de operárias de **(A)** *Scaptotrigona postica*, **(B)** *Melipona scutellaris* e **(C)** *Frieseomelitta varia* ao longo do desenvolvimento. 5 μ g de proteína total foram aplicados aos géis para SDS-PAGE subsequentemente exposto a anti-soro contra vitelogenina de *A. mellifera*. Controle = hemolinfa de operária nutridora *Apis mellifera* (1,0 μ g de proteína total); Pw = pupa de olho branco; Pbl = pupa de olho marrom com cutícula levemente pigmentada; Pbm = pupa de olho marrom com cutícula medianamente pigmentada; Pbd = pupa de olho marrom com cutícula fortemente pigmentada; Re = operária adulta recém-emergida; N = operária adulta nutridora; F = operária adulta forrageira.

Aparentemente não há acúmulo de vitelogenina em extratos do corpo gorduroso larval e pupal de *M. scutellaris*, uma vez que esta proteína não foi detectada por

Western blot em amostras de proteínas extraídas com TRIzol[®]. Provavelmente, Isto é consequência de biossíntese seguida de secreção imediata de vitelogenina para a hemolinfa. Entretanto, a banda de 180 kDa relativa à vitelogenina de *A. mellifera* foi observada em corpo gorduroso de operárias adultas nutridoras por SDS-PAGE (Figura 11). Isto possivelmente se deve à menor especificidade do anti-soro em relação à vitelogenina de *A. mellifera*.

Figura 11: Perfil protéico do corpo gorduroso ao longo do desenvolvimento de operárias *Melipona scutellaris*. SDS-PAGE corado com nitrato de prata. Amostras de corpo gorduroso contendo 2 µg de proteína total. As setas indicam a banda de vitelogenina. Controle = hemolinfa de operária nutridora *Apis mellifera* (0,5 µg de proteína total); Larva = larva de último instar; Pw = pupa de olho branco; Pp = pupa de olho rosa; Pb = pupa de olho marrom com cutícula não pigmentada; Pbl = pupa de olho marrom com cutícula levemente pigmentada; Pbd = pupa de olho marrom com cutícula fortemente pigmentada; Re = operária adulta recém-emergida; F = operária adulta forrageira.

5. Discussão

Os resultados da clonagem e seqüenciamento dos fragmentos de cDNA de vitelogenina isolados de operárias nutridoras das três espécies de abelhas sem ferrão estudadas mostraram grande identidade destas seqüências (de aproximadamente 500 pares de bases referentes à região N-terminal da proteína) com a seqüência homóloga de *A. mellifera*. Mesmo entre insetos pertencentes a diferentes ordens, esta precursora da principal proteína constituinte do vitelo é bastante conservada (Trewitt *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1994; Kageyama *et al.*, 1994; Yano *et al.*, 1994; Romans *et al.*, 1995; Hiremath e Lehtoma, 1997; Nose *et al.*, 1997; Piulachs *et al.*, 2003).

O alinhamento das seqüências parciais de cDNA obtidas para as espécies de meliponíneos com a seqüência de vitelogenina de *A. mellifera*, confirmam a grande identidade destas seqüências em abelhas. Além disso, o alinhamento destas com seqüências de vitelogenina de outros insetos permitiu a construção de um dendograma de similaridade, o qual evidenciou uma relação mais próxima e consistente entre as espécies de abelhas, que se agrupam formando um ramo bem suportado por altos valores de *bootstrap*. Entretanto, ao contrário do observado por Piulachs *et al.* (2003), o ramo formado pelas abelhas e outros himenópteros possui valor de suporte nodal estatisticamente baixos (43%). Neste caso, torna-se necessária uma análise mais acurada, considerando-se um maior número de espécies e a utilização de seqüências completas de vitelogenina.

A abundância do mRNA codificador de vitelogenina de *A. mellifera* varia durante a ontogênese e, pelo menos para alguns períodos de desenvolvimento, esta variação aparentemente tem correlação com os títulos de hormônio juvenil e ecdisteróides. Assim, em pupas de operárias, os níveis deste transcrito diminuem quando o título de ecdisteróides atinge altos valores, sugerindo inibição da transcrição por altos níveis

destes hormônios (Guidugli, 2004). Nas operárias de *F. varia* e *S. postica* aqui analisadas, a abundância do mRNA da vitelogenina não varia ao longo do desenvolvimento pupal e adulto, apesar das diferenças com relação à divisão do trabalho reprodutivo entre estas espécies, pois enquanto as operárias *F. varia* jamais põem ovos, as de *S. postica* contribuem efetivamente para a geração dos machos da colônia.

Para melhor interpretar estes dados, deve-se levar em consideração o fato de que a RT-PCR mostra a abundância de transcrito em um momento pontual, impossibilitando identificar reciclagem e longevidade do mRNA da vitelogenina. Assim, a presença do transcrito nem sempre é indicativo de que esteja ocorrendo transcrição.

Em operárias de *M. scutellaris*, todavia, verificamos discreta redução da abundância do transcrito para vitelogenina ao final do estágio pupal. Os níveis mais baixos deste transcrito foram detectados em pupas Pbd prestes a emergir. O subsequente aumento de transcritos na fase adulta está provavelmente relacionado à potencial capacidade das operárias de ativar seus ovários e produzir ovos, como em *A. mellifera*. Quando isto ocorre, as operárias participam do trabalho reprodutivo que então deixa de ser exclusivo de rainhas.

Radioimunoensaios delineados para quantificação de ecdisteróides em operárias *Melipona quadrifasciata* mostraram que o perfil de variação do título destes hormônios durante o estágio pupal se assemelha ao de operárias *A. mellifera* (Pinto *et al.*, 2002). É provável que o mesmo perfil de acúmulo de ecdisteróides na hemolinfa ocorra em *M. scutellaris*, concorrendo assim para um esquema de regulação da expressão de vitelogenina semelhante ao proposto para *A. mellifera* (Barchuk *et al.*, 2002; Piulachs *et al.*, 2003). Assim, para ambas espécies, o declínio do título de ecdisteróides, da metade

para o final do estágio pupal, constituiria o sinal para o início da biossíntese de vitelogenina. Porém, as semelhanças entre estas duas espécies não se estendem ao período larval, visto que as larvas *M. scutellaris* de último estágio não têm vitelogenina na hemolinfa (ver resultados), ao contrário do observado em larvas de operárias *A. mellifera* (Guidugli *et al.*, manuscrito em preparação). Outra diferença entre estas duas espécies reside no período pupal. O mRNA da vitelogenina não é detectado no início deste estágio em *A. mellifera*, mas somente ao final, e continua presente por quase toda a vida adulta da abelha operária (Piulachs *et al.*, 2003). Em *M. scutellaris*, o transcrito é abundante no início do estágio pupal, diminui nas pupas mais avançadas e torna a aumentar nas operárias adultas.

Hartfelder e Rembold (1991) determinaram os títulos de hormônio juvenil e ecdisteróides para uma subespécie de *S. postica* (*S. postica depilis*). A variação dos títulos destes hormônios durante os estágios larval e pupal não modifica a abundância dos transcritos para vitelogenina, cuja expressão, infere-se, é constitutiva. As operárias nutridoras de *S. postica* produzem a maior fração dos machos da colônia mesmo na presença de rainha (Sakagami e Zucchi, 1966; Beig, 1972; Staurengo da Cunha, 1977) e, portanto, esperava-se encontrar acentuado aumento da abundância de transcritos, semelhante ao observado em operárias órfãs de *A. mellifera* (Guidugli *et al.*, informação pessoal).

Já em *F. varia*, não existem dados sobre dosagem de hormônios ecdisteróides ou juvenil que possibilitem uma análise comparativa com os perfis de cDNA (mRNA) de vitelogenina e da própria proteína. Entretanto, o fato de não haver variação na abundância do transcrito nas fases analisadas, inclusive durante o estágio pupal, que nos insetos em geral é marcado por um pico de ecdisteróides, praticamente descarta a

possibilidade de regulação do gene da vitelogenina de *F. varia* por este hormônio. Perante a condição de esterilidade permanente das operárias desta espécie (Staurengo da Cunha *et al.*, 1986; Staurengo da Cunha e Campos, 1993; Boleli *et al.*, 1999), é de se esperar que não haja aumento da expressão do gene da vitelogenina ou da respectiva proteína em abelhas adultas e, realmente, os níveis do transcrito não variam nestas abelhas adultas. Por outro lado, uma dieta rica em proteínas promoveu um aumento na abundância do transcrito para vitelogenina em operárias e zangões de *F. varia*, permitindo inferir que este gene é nutricionalmente regulado nos adultos. Todos estes fatos contribuem com mais um indicativo para uma função alternativa da vitelogenina, independente da vitelogênese e crescimento de ovócitos.

Os meliponíneos são singulares no que diz respeito aos sinais responsáveis por mudanças no programa endócrino que refletirão no sistema de diferenciação de castas e, conseqüentemente, na divisão do trabalho reprodutivo, bastante diversificado nestas abelhas. Em espécies do gênero *Melipona*, por exemplo, Kerr (1950) propôs um mecanismo genético responsável por dirigir as mudanças que originarão operárias e rainhas. Mais tarde esta hipótese foi modificada de modo a incluir a modulação trofогênica desta base genética que resulta na diferenciação das castas de abelhas deste gênero (Kerr, 1974). Para as demais espécies de abelhas sem ferrão o sinal para a diferenciação de castas é trofогênico e advém da quantidade de alimento oferecido às larvas (Hartfelder e Rembold, 1991).

O transcrito e a proteína vitelogenina foram detectados nas operárias nutridoras das espécies de meliponíneos estudadas independentemente do *status* reprodutivo que as caracterizam, o que reforça a proposta de Amdam *et al.* (2003) de que a vitelogenina é importante na alimentação das larvas. Porém, os perfis de abundância do transcrito e

de acúmulo de vitelogenina na hemolinfa ao longo do desenvolvimento pupal mostraram diferenças entre as espécies de abelhas sem ferrão estudadas, sugerindo que estas espécies diferem quanto à utilização desta proteína.

A vitelogenina de uma série de vertebrados e insetos foi bioquimicamente caracterizada, todavia os trabalhos sobre esta proteína em abelhas estão focados em *Apis mellifera*, na qual está descrita como uma glicolipoproteína de 180 kDa (Wheeler e Kawooya, 1990), produzida pelos trofócitos do corpo gorduroso e secretada na hemolinfa, de onde são seqüestradas pelos ovócitos em desenvolvimento por endocitose mediada por receptores. Wheeler e Kawooya (1990) especularam a possibilidade da vitelogenina não ser um monômero, mas sim um dímero facilmente dissociável, visto que a determinação da massa molecular desta proteína por cromatografia resultou em quase o dobro do valor verificado por SDS-PAGE (300 kDa). Independentemente disso, foi possível notar nos experimentos de SDS-PAGE que a vitelogenina de abelhas sem ferrão apresenta-se também como uma banda única de massa molecular similar à de *A. mellifera*, porém a quantidade de proteína acumulada na hemolinfa aparentemente é muito menor. Os Western blots também sugeriram menor quantidade de vitelogenina na hemolinfa das abelhas sem ferrão que em *A. mellifera*. Mas o antisoro utilizado nos Western blots, preparado contra ovos de *A. mellifera* e, talvez, com menor especificidade para as abelhas sem ferrão estudadas, podem ter contribuído para reforçar esta sugestão.

A vitelogenina de *F. varia* foi detectada em um período de desenvolvimento no qual, geralmente, não há esta proteína na hemolinfa, isto é, no início do estágio pupal. Este padrão difere daquele observado em operárias *A. mellifera*, nas quais a vitelogenina é detectada somente no final do período pupal (Barchuk *et al.*, 2002).

Nas operárias das outras duas espécies de meliponíneos estudadas, a vitelogenina foi detectada somente no estágio adulto, nas nutridoras. Neste aspecto, estas operárias se assemelham às de *A. mellifera*, nas quais os níveis maiores de vitelogenina também foram detectados nas nutridoras. No entanto, Western blots de hemolinfa de abelhas operárias *A. mellifera*, realizados com anti-soro específico, revelaram vitelogenina, embora em níveis mais baixos, já ao final do estágio pupal (Barchuk *et al.*, 2002). Os Western blots de hemolinfa de pupas *S. postica* e *M. scutellaris* não detectaram vitelogenina neste estágio, portanto, neste aspecto estas espécies de abelhas sem ferrão diferem de *Apis mellifera*. Aqui é necessário comentar que os Western blots foram eficientes em revelar uma banda bem marcada de vitelogenina nas operárias nutridoras de *S. postica* e *M. scutellaris*, mesmo utilizando-se o anti-soro inespecífico. Isto nos assegura que se houvesse vitelogenina na hemolinfa das pupas destas espécies de abelhas, ela seria passível de detecção nos Western blots.

Estas evidências corroboram as observações de Engels e Engels (1977), que detectaram por eletroforese em *cellogel* uma proteína do vitelo de ovos tróficos de *S. postica*, a qual chamaram de vitelogenina, e mostraram que na hemolinfa, o perfil temporal desta proteína assemelhava-se ao de operárias *A. mellifera*. Foi demonstrado que esta proteína aparece em pequena quantidade na hemolinfa pouco depois da emergência das operárias e aumenta bastante enquanto elas exercem a função de nutridoras, diminuindo com o passar da idade e transição de funções, mas ainda sendo encontrada em operárias com até 20 dias de idade (Engels, 1987).

A vitelogenina não foi detectada em larvas de último estágio de qualquer das espécies de abelhas sem ferrão estudadas, o que representa outra divergência em

relação a *A. mellifera*, uma vez que larvas de 5º estágio e pré-pupas desta espécie têm vitelogenina, embora em quantidade muito menor que a detectada nas operárias adultas (Guidugli *et al.*, manuscrito em preparação).

Pelo menos para *M. scutellaris*, a vitelogenina foi pesquisada também no sítio de sua biossíntese, isto é, no corpo gorduroso. Esta proteína foi detectada no corpo gorduroso das operárias adultas analisadas, mas não nestes órgãos extraídos e pupas. Estes dados corroboram aqueles originados da pesquisa de vitelogenina na hemolinfa desta mesma espécie. Assim, tanto no corpo gorduroso quanto na hemolinfa, a vitelogenina foi detectada somente no estágio adulto, sugerindo que sua biossíntese é logo sucedida por secreção.

Os dados aqui obtidos, relativos à abundância do cDNA da vitelogenina em meliponíneos e ao perfil de acúmulo desta proteína, levantam questões sobre a regulação da transcrição e biossíntese de vitelogenina nas espécies de abelhas sem ferrão. Em *A. mellifera*, evidências apontam a ação hormonal como mecanismo de controle, uma vez que o surgimento da vitelogenina na hemolinfa de rainhas e operárias coincide com um pequeno pico de hormônio juvenil e com o decaimento do título de ecdisteróides que acontecem ao final do estágio pupal (Barchuk *et al.*, 2002). Isto sugere que o hormônio juvenil induz a iniciação da biossíntese de vitelogenina no período em que os ecdisteróides pupais atingem níveis basais. Experimentos de manipulação hormonal, isto é, tratamento de pupas com estes hormônios, seguido da investigação da presença de vitelogenina na hemolinfa por Western blots, reforçaram contundentemente esta hipótese (Barchuk *et al.*, 2002). No entanto, os hormônios podem apresentar efeitos diversos dependendo do estágio de desenvolvimento em que atuam. Por exemplo, conforme avançam em idade, as operárias forrageiras apresentam

um progressivo aumento do título de hormônio juvenil (Rutz *et al.*, 1976) e isto coincide com o declínio do título de vitelogenina na hemolinfa. Nesta etapa do desenvolvimento, portanto, altos títulos de hormônio juvenil pareciam afetar negativamente a biossíntese e acúmulo de vitelogenina. Este fato foi comprovado experimentalmente, cultivando-se corpo gorduroso em presença de um análogo de hormônio juvenil. Estes experimentos *in vitro* mostraram que doses altas deste hormônio inibem a biossíntese de vitelogenina (Pinto *et al.*, 2000), assim corroborando o que se observa *in vivo* nas operárias forrageiras.

Não sabemos se a variação dos títulos hormonais afeta a biossíntese de vitelogenina nas espécies de meliponíneos aqui estudadas. Dosagens de ecdisteróides somente foram realizadas em larvas e pupas de *Scaptotrigona postica depilis* (Hartfelder e Rembold, 1991) e *Melipona quadrifasciata* (Pinto *et al.*, 2002). Durante o período pupal, as curvas destes hormônios apresentam um perfil semelhante, apresentando o maior pico em pupas intermediárias, seguido de queda durante a fase de pigmentação do tegumento, ao final do estágio pupal. Entretanto, os títulos hormonais diferem entre rainhas e operárias e em associação aos programas casta-específicos de cada espécie, assim como ao tempo de duração deste estágio, maior nos meliponíneos. É provável que em operárias adultas *S. postica* e *M. scutellaris*, títulos baixos de ecdisteróides e de hormônio juvenil também sejam requeridos para a biossíntese de vitelogenina, assim como comprovado para *A. mellifera*. No entanto, os níveis invariáveis do transcrito *per se* descarta qualquer influência da variação temporal do título destes hormônios sobre a expressão do gene da vitelogenina nas duas espécies de meliponíneos.

Para os insetos em geral, o estágio pupal é caracterizado por aumento do título de ecdisteróides até um valor máximo, alcançado aproximadamente na metade deste período, seguido de diminuição da concentração destes hormônios na hemolinfa até que níveis basais sejam atingidos ao final deste estágio. Esta variação do título de ecdisteróides que certamente ocorre em *F. varia*, não influencia a abundância relativa do transcrito da vitelogenina e nem o acúmulo desta proteína na hemolinfa ao longo do estágio pupal.

A influência da alimentação diferencial na modulação dos títulos de hormônio juvenil e ecdisteróides de larvas de *A. mellifera* foi deduzida da comparação entre as concentrações destes hormônios na hemolinfa de larvas presuntivas de operárias e rainhas (Rembold, 1987; Rachinsky *et al.*, 1990; Hartfelder e Engels, 1998). Entretanto, operárias adultas desta espécie de abelha, alimentadas com diferentes dietas, não mostraram diferenças significantes em relação aos respectivos títulos de hormônio juvenil, embora uma dieta rica em pólen resulte em aumento de vitelogenina na hemolinfa em relação àquela que carece deste nutriente (Bitondi e Simões, 1996).

Em *A. mellifera*, além da alimentação, há outro fator regulador do sistema endócrino que são os feromônios produzidos pela rainha (Hoover *et al.*, 2003), que inibem a ativação dos ovários de operárias e, portanto, atuam de forma indireta no processo de biossíntese de vitelogenina e vitelogênese. Entretanto, para a maioria das espécies de meliponíneos parece não haver a produção de substâncias que inibam o desenvolvimento ovariano de operárias (Zucchi, 1993; Cruz-Landim, 2000), muito embora Cruz-Landim (2000) acredite que a presença da rainha possivelmente estimule a deposição de vitelo nos ovócitos e a ovulação de ovos tróficos. A postura de ovos tróficos parece ser atributo das operárias com função de nutridoras mais jovens, que

estabelecem um contato mais próximo à rainha, ao passo que aquelas mais velhas, que desempenham a mesma função, realizariam postura de ovos funcionais ou reprodutivos na periferia dos favos de cria.

Nas espécies do gênero *Frieseomelitta*, o sistema de diferenciação de castas também é dirigido por um mecanismo trófico (Faustino *et al.*, 2002), atribuído à maior quantidade de alimento recebido pelas larvas destinadas a se desenvolverem em rainhas, mas resulta no mais completo monopólio reprodutivo por parte destas. Os níveis constantes de vitelogenina na hemolinfa das operárias desta espécie já durante o estágio pupal, também excluem a possibilidade de modulação da tradução desta proteína por hormônios, e talvez da transcrição, reforçando os dados da literatura que indicam outras funções essenciais para a vitelogenina além de constituir o vitelo (Amdam *et al.*, 2004).

Uma vez esclarecido o perfil de acúmulo de vitelogenina nas três espécies de meliponíneos estudadas, a relação deste com a atividade reprodutiva tornou-se mais simples para *M. scutellaris* e *S. postica*. A destacada presença de vitelogenina na hemolinfa de operárias nutridoras permite relacionar o acúmulo desta proteína com o início da produção de ovos tróficos e reprodutivos. Mas, alternativamente, também é possível estabelecer um paralelo com o processo de alimentação, uma vez que Amdam *et al.* (2003) encontraram vitelogenina nas glândulas hipofaríngeas de operárias nutridoras *A. mellifera* e inferiram sua utilização como fonte de aminoácidos para a alimentação dos demais indivíduos da colônia.

Considerando-se os resultados obtidos dos perfis temporais de abundância de transcritos do gene da vitelogenina e de acúmulo da respectiva proteína na hemolinfa, além da relação destes com a variação dos títulos dos hormônios morfogenéticos,

pode-se inferir que, apesar de apresentar-se bastante conservada em abelhas, a vitelogenina é regulada de maneira diferencial nas três espécies de meliponíneos estudadas. As análises de biologia molecular aqui empregadas permitiram relacionar esta proteína com o tipo de reprodução em operárias de abelhas sem ferrão. Também permitiram a identificação de perfis temporais de mRNA e vitelogenina distintos, sobretudo nas operárias estéreis. Isto pode ser um reflexo do surgimento de diferentes estratégias no processo de diferenciação de castas, gerando as particularidades inerentes a cada uma destas espécies com respeito ao papel das operárias na divisão do trabalho reprodutivo.

6. Conclusões

Os resultados apresentados permitem concluir que:

1. Os cDNAs parciais isolados, clonados e seqüenciados utilizando-se *primers* específicos para a vitelogenina são bastante conservados entre *F. varia*, *S. postica* e *M. scutellaris* e mostram alta identidade (93%-100%), em relação à região 3'-terminal do cDNA da vitelogenina de *A. mellifera*;
2. A expressão do gene codificador de vitelogenina é constitutiva durante as fases de pupa e nas operárias adultas de *F. varia* e *S. postica*, enquanto em *M. scutellaris* ocorre uma pequena diminuição da abundância do transcrito do meio para o final do período pupal. Assim, pelo menos durante o estágio pupal, os perfis de abundância do mRNA da vitelogenina diferem entre estas espécies de abelhas e diferem também daquele que caracteriza as pupas de *A. mellifera*, nas quais transcritos para vitelogenina são encontrados somente ao final do estágio pupal;
3. Um aumento consistente de expressão do gene da vitelogenina foi observado em operárias *F. varia* alimentadas com uma dieta rica em proteínas em relação àquelas alimentadas sem este nutriente, indicando que a transcrição deste gene é nutricionalmente regulada;
4. A vitelogenina é acumulada na hemolinfa de *F. varia* desde o início do período pupal até o estágio adulto, enquanto em *M. scutellaris* e *S. postica* ela somente é observada na hemolinfa de operárias nutridoras. O acúmulo de vitelogenina em

operárias nutridoras *M. scutellaris* e *S. postica* aparentemente está relacionado à produção de ovos tróficos e/ou reprodutivos. Em operárias *F. varia*, as quais nunca põem ovos, a função da vitelogenina, não ligada à reprodução, ainda é especulativa.

7. Referências bibliográficas

AMDAM, G. V.; NORBERG, K.; HAGEN, A.; OMHOLT, S. T. Social exploitation of vitellogenin. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, vol.100, n. 4, p. 1799-1802, 2003.

AMDAM, G. V.; SIMÕES, Z. L. P.; HAGEN, A.; NORBERG, K.; SCHRODER, K.; MIKKELSEN, O.; KIRKWOOD, T. B. L.; OMHOLT, S. W. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. **Exper. Gerontol.**, vol. 39, p. 767-773, 2004.

ASHBURNER, M. Patterns of puffing activity in the salivary glands of *D. melanogaster* cultured in vitro. **Chromossoma**, vol. 38, p. 255-281, 1972.

ASHBURNER, M. Puffs, genes, and hormones revisited. **Cell**, vol. 61, p. 1- 3, 1990.

BARCHUK, A. R.; BITONDI, M. M. G.; SIMÕES, Z. L. P. Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. **J. Insect Sci.**, 2.1. (available on line: <http://insectscience.org/2.1>), 2002.

BARCHUK, A. R.; MALESCA, R.; SIMÕES, Z. L. P. *Apis mellifera* ultraspiracle: cDNA sequence and rapid up-regulation by juvenile hormone. **Insect Mol. Biol.**, vol. 13, n. 5, p. 459-467, 2004.

BEGO, L. R. **Aspectos da regulação social em *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. 1977, 181 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1977.

BEGO, L. R.; SIMÕES, D.; ZUCCHI, R. On some structures in *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille (Hymenoptera, Meliponinae). **Bolm. Zool. Univ. São Paulo**, vol. 6, p. 79-88, 1983.

BEIG, D. The production of males in queen right colonies of *Trigona (Scaptotrigona) postica*. **J. Apic. Res.**, vol. 11, p. 33-39, 1972.

BITONDI, M. M. G.; SIMÕES, Z. L. P. The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in africanized *Apis mellifera* workers. **J. Apicult. Res.**, vol. 35, p. 27-36, 1996.

BOLELI, I. C.; SIMÕES, Z. L. P.; BITONDI, M. M. G. Cell death in ovarioles causes permanent sterility in *Frieseomelitta varia* worker bees. **J. Morphol.**, vol. 242, p. 271-282, 1999.

BOWNES, M. The roles of juvenile hormone, ecdysone and the ovary in the control of *Drosophila* vitellogenesis. **J. Insect Physiol.**, vol. 35, p. 409-413, 1989.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, vol. 72, p. 248-254, 1976.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; GREESHOFF, P. M. Staining nucleic acids with silver: An alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. **Promega News Magazine**, vol.45, p. 13-21, 1994.

CHEN, J. S.; CHO, W. L.; RAIKHEL, A. S. Analysis of mosquito vitellogenin cDNA: Similarity with vertebrate phosvitins and arthropod serum proteins. **J. Mol. Biol.**, vol. 237, p. 641-647, 1994.

CHEN, J.S.; SAPPINGTON, W.; RAIKHEL, A. S. Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals common ancestral. **J. Mol. Evol.**, vol. 44, p. 440-451, 1997.

CHINZEI, Y.; WHITE, B. N.; WYATT, G. R. Vitellogenin mRNA in locust fat body: Identification, isolation, and quantitative changes induced by juvenile hormone. **Can. J. Biochem.**, vol. 60, p. 243-251, 1982.

CRUZ-LANDIM, C. Ovarian development in meliponine bees (Hymenoptera: Apidae): The effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. **Gen. Mol. Biol.**, vol. 23, n. 1, p. 83-88, 2000.

DAVIS, R. E.; KELLY, T. J.; MASLER, E. P.; FESCEMYER, H. W.; THYAGARAJA, B. S.; BORKOVEC, A. B. Hormonal control of vitellogenesis in the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.): Suppression of haemolymph vitellogenin by the juvenile hormone analogue, methoprene. **J. Insect Physiol.**, vol. 36, p. 231-238, 1990.

DEDEJ, S.; HARTFELDER, K; AUMEIER, P.; ROSENKRANZ, P.; ENGELS, W. Caste determination is a sequential process: Effect of larval age at grafting on ovariole

number, hind leg size and cephalic volatiles in honey bee (*Apis mellifera carnica*). **J. Apicult. Res.**, vol. 37, p. 183-190, 1998.

DEITSCH, K. W., CHEN, J. S., RAIKHEL, A. S. Indirect control of yolk protein genes by 20-hydroxyecdysone in the fat body of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, vol. 25, n. 4, p. 449-54, 1995.

EDWARDS, G. C.; BRAUN, R. P.; WYATT, G. R. Induction of vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria* by juvenile hormone analog, pyroproxifen. **J. Insect Physiol.**, vol. 37, p. 609- 614, 1993.

ENGELS, W. Occurrence and significance of vitellogenin in female castes of social Hymenoptera. **Am. Zool.**, vol. 14, p. 1229-1237, 1974.

ENGELS, W. Reproduction and caste development in social bees. In: Eder, J.; Rembold, H. **Chemistry and biology of social insects**. München, Verlag J. Peperny, 1987.

ENGELS, W., ENGELS, E. Vitellogenin und fertilität bei stachellosen bienen. **Insectes Soc.**, vol. 24, p. 71-94, 1977.

ENGELS, W.; KAATZ, H.; ZILLIKENS, A.; SIMÕES, Z. L. P.; TRUBE, A.; BRAUN, R.; DITTRICH, F. Honey bee reproduction: Vitellogenin and caste- specific regulation of fertility. **Adv. Invert. Reprod.**, vol. 5, p. 495-501, 1990.

FANG, F.; XU, Y.; JONES, D.; JONES, G. Interactions of ultraspiracle with ecdysone receptor in the transduction of ecdysone- and juvenile hormone-signaling. **FEBS J.**, vol. 272, n. 7, p. 1577-1589, 2005.

FAUSTINO, C. D.; SILVA-MATOS, E. V., MATEUS, S.; ZUCCHI, R. First record of emergency queen rearing in stingless bees (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Insectes Soc.**, vol.49, p. 111-113, 2002.

FLURI, P.; LÜSCHER, M.; WILLE, H.; GERIG, L. Changes in weight of the pharyngeal gland and the hemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. **J. Insect Physiol.**, vol. 28, p. 61-68, 1982.

FREE, J. B. **A organização das abelhas (*Apis*)**. Edusp, São Paulo, 1980.

GIRAY, T.; ROBINSON, G. E. Effects of intracolony variability in behavioral development on the plasticity of division of labor in the honeybee colonies. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, vol. 35, p. 13-20, 1994.

GORDON, D. M. The organization of work in social insect colonies. **Nature**, vol. 380, p. 121-124, 1996.

GUIDUGLI, K. R. **Expressão do gene da vitelogenina nas castas e sexos de *Apis mellifera***. 2001. 75 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 75 p., 2001.

GUIDUGLI, K. R. Functional versatility of *Apis mellifera* vitellogenin: A multipurpose protein in the honeybee life cycle. In: SYMPOSIUM OF THE 8TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON TROPICAL BEES AND IV ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 2004, Ribeirão Preto. **Proceedings of the 8th International Conference on Tropical Bees and IV Encontro sobre Abelhas**, Ribeirão Preto: Funpec, 2004.

HAGEDORN, H. H.; KUNKEL, J. G. Vitellogenin and vitellin in insects. **Ann. Rev. Entomol.**, vol. 24, p. 475-505, 1979.

HAMILTON, W. D. Altruism and related phenomena mainly in social insects. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, vol. 3, p. 193-232, 1972.

HARTFELDER, K.; REMBOLD, H. Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. **J. Comp. Physiol. B**, vol. 160, p. 617-620, 1991.

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

HIREMATH, S.; LEHTOMA, K. Complete nucleotide sequence of the vitellogenin mRNA from the gypsy moth: Novel arrangement of the subunit encoding regions. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, vol. 27, p. 27-35, 1997.

[HOOVER, S. E.](#); [KEELING, C.I.](#); [WINSTON, M. L.](#); [SLESSOR, K. N.](#) The effect of queen pheromones on worker honey bee ovary development. **Naturwissenschaften**, vol. 90, n. 10, p. 477-80, 2003.

HUANG, Z. Y.; ROBINSON, G. E.; TOBE, S. S.; YAGI, K. J.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A.; STAY, B. Hormonal regulation of behavioural development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. **J. Insect Physiol.**, vol. 37, p. 733-741, 1991.

JONES, G.; JONES, D. Considerations on the structural evidence of a ligand-binding function of ultraspiracle, an insect homologue of vertebrate RXR. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, vol. 30, p. 671-679, 2000.

JONES, G.; SHARP, P. A. Ultraspiracle: An invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 94, p. 13499-13503, 1997.

JONES, G.; WOZNIAK, M.; CHU, Y.; DHAR, S.; JONES, D. Juvenile hormone III - dependent conformational changes of the nuclear receptor ultraspiracle. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, vol. 32, p. 33-49, 2001.

KAGEYAMA, Y.; KINOSHITA, T.; UMESONO, Y.; HATAKEYAMA, M.; OISHI, K. Cloning of cDNA for vitellogenin of *Athalia rosae* (Hymenoptera) and characterization of the vitellogenin gene expression. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, vol. 24, p. 599-605, 1994.

KERR, W. E. Evolution of the mechanisms of caste determination in the genus *Melipona*. **Evolution**, vol. 4, p. 7-13, 1950.

KERR, W. E. Sex determination in bees. III: Caste determination and genetic control in *Melipona*. **Insect Sociaux**, vol. 21, p. 357-368, 1974.

KOEDAM, D.; CONTRERA, F. A. L.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Clustered male production by workers in the stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponinae). **Insectes soc.**, vol. 46, p. 387-391, 1999.

KOKOZA, V. A.; MARTIN, D.; MIENALTOWSKI, M. J.; AHMED, A.; MORTON, C. M.; RAIKHEL, A. S. Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade. **Gene**, vol. 274, p. 47-65, 2001.

KORB, J.; HEINZE, J. Multi-level selection and social evolution of insect societies. **Naturwissenschaften**, vol. 91, p. 291-304, 2004.

KROPÁCHOVÁ, S.; HASLBACHOVÁ, H. The development of ovaries in worker honeybees in a queenright colony. **J. Apic. Res.**, vol. 8, p. 57-61, 1969.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. **Mega2: Molecular evolutionary genetics analysis software**, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, vol. 227, p. 680-685, 1970.

LIN, H.; WINSTON, M. L. The role of nutrition and temperature in the ovarian development of the worker honey bee (*Apis mellifera*). **Can. Ent.**, vol. 130, p. 883-891, 1998.

MICHENER, C. D. **The social behavior of the bees**. Cambridge, Harvard University Press, 1974.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. Baltimore and London, The John Hopkins University Press, 2000.

MONTAGUE, C. E.; OLDROYD, B. P. The evolution of worker sterility in honey bees: An investigation into a behavioral mutant causing failure of worker policing. **Evolution**, vol. 52, n. 5, p. 1408-1415, 1998.

NIJHOUT, H. F. Control mechanisms of polyphenic development in insects. **Bioscience**, vol. 49, p. 181-192, 1999.

NOSE, Y.; LEE, J. M.; UENO, T.; HATAKEYAMA, M.; OISHI, K. Cloning of cDNA for vitellogenin of the parasitoid wasp, *Pimpla niponica* (Hymenoptera: Apocrita: Ichneumonidae): vitellogenin primary structure and evolutionary considerations. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, vol. 27, p. 1047-1056, 1997.

PINTO, L. Z.; BITONDI, M. M. G.; SIMÕES, Z. L. P. Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. **J. Insect Physiol.**, vol. 46, p. 153-160, 2000.

PINTO, L. Z.; HARTFELDER, K.; BITONDI, M. M. G.; SIMÕES, Z. L. P. Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. **J. Insect Physiol.**, vol. 48, p. 783-790, 2002.

PIULACHS, M. D.; GUIDUGLI, K. R.; BARCHUK, A. R.; CRUZ, J.; SIMÕES, Z. P. L.; BELLÉS, X. The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. **Insect Bioc. Mol. Biol.**, vol. 33, n. 4, p. 459-65, 2003.

RACHINSCKY, A.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A.; HARTFELDER, K. Caste and metamorphosis – hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroid in last instar honeybee larvae. **Gen. Comp. Endocrinol.**, vol. 79, p. 31-38, 1990.

REMBOLD, H. Caste-specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. **Insect Biochem.**, vol. 17, p. 1003-1006, 1987.

RICHARDS, G. Switching partners? **Curr. Biol.**, vol. 2, p. 657-658, 1992.

ROMANS, P.; TU, Z.; KE, Z.; HAGEDORN, H. H. Analysis of a vitellogenin gene of the mosquito, *Aedes aegypti* and comparisons to vitellogenins from other organisms. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, vol. 25, p. 939-958, 1995

RUTZ, W.; GERIG, L.; WILLE, H.; LÜCHER, M. The function of juvenile hormone in adult worker honeybees, *Apis mellifera*. **J. Insect Physiol.**, vol. 22, p. 1485-1491, 1976.

SAKAGAMI, S. F. Stingless bees. In: Hermann, R. H. **Social Insects**. New York: Academic Press, 1982, p. 316- 423.

SAKAGAMI, S. F.; ZUCCHI, R. Estudo comparativo do comportamento de várias espécies de abelhas sem ferrão, com especial referência ao processo de aprovisionamento e postura das células. **Ciência e Cultura**, vol. 18, n. 3, p. 283- 296, 1966.

SAKAGAMI, S. F.; BEIG, D.; ZUCCHI, R.; AKAHIRA, Y. Occurrence of ovary developed workers in queenright colonies of stingless bees. **Rev. Brasil. Biol.**, vol. 23, n. 2, p. 115-129, 1963.

SAPPINGTON, T. W.; RAIKHEL, A. S. Molecular characteristics of insects vitellogenins and vitellogenin receptors. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, vol. 28, p. 277-300, 1998.

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. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, vol. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

STAURENGO DA CUNHA, M. A. Ovarian development in *Scaptotrigona postica* Latr. 1807 (Hym.: Apidae). I. A morphological study. **Dusenía**, vol. 10, p. 205-215, 1977.

STAURENGO DA CUNHA, M. A.; CAMPOS, L. A. O. Desenvolvimento ovariano em operárias de *Frieseomelitta varia varia* (Lep. 1836) (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Brasil. Biol.**, vol. 53, n. 1, p. 63-69, 1993.

STAURENGO DA CUNHA, M. A.; GOMES, G. M.; CAMPOS, L. A. O. Desenvolvimento ovariano em operárias adultas de *Frieseomelitta silvestri languida* (Hymenoptera, Apidae) sob condições normais e de orfandade. **Ciência e Cultura**, vol. 38, n. 10, p. 1725-1731, 1986.

TERADA, Y. **Contribuição ao estudo da regulação social em *Leurotrigona muelleri* e *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae)**. 1974. 96 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1974.

TÓTH, E.; STRASSMANN, J. E.; NOGUEIRA-NETO, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; QUELLER, D. C. Male production in stingless bees: Variable outcomes of queen-worker conflict. **Molec. Ecol.**, vol. 11, p. 2661-2667, 2002.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 76, p. 4350-4354, 1979.

TREWITT, P. M.; HEILMANN, L. J.; DEGRUGILLIER, S. S.; KUMARAN, A. K. The boll weevil vitellogenin gene: nucleotide sequence, structure, and evolutionary relationship to nematode and vertebrate vitellogenin genes. **J. Mol. Evol.**, vol. 34, n. 6, p. 478-92, 1992.

VALLE, D. Vitellogenesis in insects and other groups - A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol. 88, p. 1-26, 1993.

WHEELER, D. E.; KAWOOYA, J. K. Purification and characterization of honey bee vitellogenin. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, vol. 14, p. 253- 267, 1990.

WYATT, G. R. Vitellogenin synthesis and the analysis of juvenile hormone action in locust fat body. **Can. J. Zool.**, vol. 66, p. 2600-2610, 1988.

WOSNIAK, M.; CHU, Y.; FANG, F.; XU, Y.; RIDDIFORD, L.; JONES, D.; JONES, G. Alternative farnesoid structures induce different conformational outcomes upon the *Drosophila* ortholog of the retinoid X receptor, ultraspiracle. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, vol. 34, p. 1147-1162, 2004.

YANO, K.; TORIYAMA-SAKURAI, M.; IZUMI, S.; TOMINO, S. Vitellogenin gene of the silkworm, *Bombyx mori*: Structure and sex-dependent expression. **FEBS Lett.**, vol. 156, p. 207-211, 1994.

ZUCCHI, R. **Aspectos etológicos da bionomia dos Meliponinae (Hymenoptera, Apidae)**. 1977. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1977.

ZUCCHI, R. Ritualized dominance, evolution of queen-worker interactions and related aspects in stingless bees (Hymenoptera, Apidae). In: INOUE, T.; YAMANE, S. **Evolution of insect societies**. Tokyo, Hakunin-sha, 1993, p. 207-249.