

APARECIDA DAS DORES TEIXEIRA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DA GLÂNDULA DE DUFOUR EM OPERÁRIAS
NUTRIDORAS E CAMPEIRAS DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA:
APIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

T266a
2016
Teixeira, Aparecida das Dores, 1980-
Análise proteômica da glândula de Dufour em operárias
nutridoras e campeiras de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera:
Apidae) / Aparecida das Dores Teixeira. – Viçosa, MG, 2016.
vi, 60f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.39-60.

1. Abelhas. 2. *Apis mellifera*. 3. Glândula de Dufour.
4. Proteínas. 5. Metabolismos proteico. 6. Espectrometria de
massa. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular
e Estrutural. II. Título.


CDD 22. ed. 595.799

APARECIDA DAS DORES TEIXEIRA

ANÁLISE PROTEÔMICA DA GLÂNDULA DE DUFOUR EM OPERÁRIAS
NUTRIDORAS E CAMPEIRAS DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA:
APIDAE)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 4 de março de 2016.



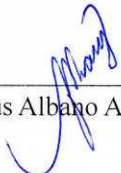
Leandro Licursi de Oliveira



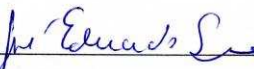
Maria Cristina Baracat Pereira



Weyder Cristiano Santana



Vinícius Albano Araújo



José Eduardo Serrão
(Orientador)

A Deus, pela presença constante em minha vida.

A meus pais Geraldo (*in memoriam*) e Geralda, por sempre me ensinarem o que é amor e respeito.

Aos meus irmãos e irmãs, José Maria, Luís, Paulinho, Arlindo, Helena, Fátima, Maria José e Rose, pelo apoio incondicional.

Aos meus queridos sobrinhos e sobrinhas, pelo carinho.

Ao meu namorado Giovani, pelo carinho de sempre.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Universidade Estadual do Kansas, pela oportunidade de adquirir novas experiências.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NUBIOMOL) da Universidade Federal de Viçosa, pelas condições oferecidas para a realização do doutorado, em especial ao Edvaldo, que sempre se mostrou muito prestativo.

Ao professor José Eduardo Serrão, pela excelente orientação, acolhida e amizade, e por sempre estar pronto a ajudar.

À Dra. Patricia Dias Games, por ter me auxiliado pacientemente e prontamente em todas as técnicas necessárias para a realização deste trabalho, e claro, pela imensa amizade conquistada durante esse período.

À secretária do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Beth, pela presteza de sempre.

Ao técnico José Luís Monteiro, pela ajuda e amizade.

Ao técnico Gelcemino Corrêa, Lulu, do Apiário Central do Departamento de Entomologia, por toda a ajuda e presteza na coleta das abelhas.

Aos amigos do Laboratório Ultraestrutura Celular e adjacências, que fizeram ou ainda fazem parte da minha vida André, Aline, Débora, Déia, Dhiego, Douglas, Glenda, Helen, Jamile, Karen, Kenner, Lenise, Luís, Luiza, Madu, Mary, Marcelo, Maria Luisa, Polyana, Renata, Virgínia e Wagner.

Aos meus amigos da UFV, Andreia, Ciro, Eduardo, Igor, João Paulo, Juliana, Luiza, Raquel, Rodrigo e Rúdo.

Aos amigos de longa data, Elenice, Juninho, Maria do Carmo, Mônica e Vanessa.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Hymenoptera	4
3.2. Abelhas	4
3.3. Glândula de Dufour	6
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1. Coleta e dissecação das glândulas de Dufour	10
4.2. Extração proteica	10
4.3. Quantificação proteica	10
4.4. Eletroforese unidimensional	10
4.5. Eletroforese bidimensional	11
4.6. Obtenção e análise das imagens	11
4.7. Digestão das amostras	12
4.8. Espectrometria de massas	12
4.9. Identificação das proteínas	12
5. RESULTADOS	14
6. DISCUSSÃO	25
6.1. Aspectos quantitativo-qualitativos da glândula de Dufour	25
6.2. Proteínas identificadas	25
6.3. Interações proteína-proteína	34
7. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

RESUMO

TEIXEIRA, Aparecida das Dores, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2016. **Análise proteômica da glândula de Dufour em operárias nutridoras e campeiras de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae).** Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadora: Patricia Dias Games.

Em abelhas eussociais, que inclui *Apis mellifera*, a colônia é constituída por uma rainha, com função reprodutiva, e de operárias estéreis ou semi-estéreis, que exercem as demais funções dentro da colônia como cuidados com a prole e busca por alimento. Associada ao aparelho do ferrão há a glândula de Dufour, que dentre outras funções, desempenha importante papel na comunicação entre os membros da colônia. Esta glândula libera substâncias químicas, mas a natureza e a função dos compostos variam em diferentes táxons. O objetivo deste estudo foi identificar proteínas com abundância diferencial nas glândulas de Dufour de operárias nutridoras e campeiras de *A. mellifera*. As glândulas de Dufour foram dissecadas, e as proteínas, extraídas. Os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese bidimensional em gel. Spots diferencialmente abundantes foram digeridos e os peptídeos analisados no espectrômetro de massas MALDI/TOF-TOF. Os espectros de fragmentação (MS/MS) foram pesquisados em bancos de dados usando a ferramenta Mascot, e as proteínas identificadas foram validadas usando o software Scaffold. Um total de 131 spots apresentou abundância diferencial entre nutridoras e campeiras, sendo identificadas 28 proteínas distintas. Destas 28 proteínas identificadas, 21 foram mais abundantes em nutridoras e sete proteínas foram mais abundantes em campeiras. As proteínas identificadas pertencem a diferentes categorias funcionais envolvidas nos metabolismos proteico, energético, lipídico e de carboidratos, detoxificação, homeostase, comunicação celular, citoesqueleto, proteínas constitutivas e alergênicas. Os dados obtidos neste estudo trazem novas informações que contribuem para a compreensão das funções biológicas da glândula de Dufour e seu papel na organização social das abelhas.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Aparecida das Dores, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2016. **Proteomic analysis of the Dufour gland in nurse and forager workers of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)**. Adviser: José Eduardo Serrão. Co-adviser: Patricia Dias Games.

The colony of the eusocial bee *Apis mellifera* has a reproductive queen and sterile workers that make many tasks as brood care and foraging. The chemical communication has a crucial role for the maintenance of sociability in bees and many compounds are released by exocrine glands. The Dufour's gland is a non-paired gland associated with the sting apparatus with important function in the communication between members of the colony. This gland release chemicals, but the nature and function of the compounds varies in workers playing different tasks. The objective of this study was to identify differentially expressed proteins in the Dufour's glands in forager and nurse workers of *A. mellifera*. The Dufour's glands of both honeybee workers were dissected and proteins were extracted. The protein content was submitted to 2D-gel electrophoresis, differentially expressed spots were digested and peptides analyzed in MALDI TOF-TOF mass spectrometer. Fragmentation spectra (MS/MS) were searched in databases by using the Mascot algorithm and proteins identified were validated through Scaffold software. A total of 131 spots showed different expression between forager and nurse bees, and 28 proteins were identified. Among them, 21 proteins were upregulated in nurses and 7 ones in foragers bees. The identified proteins have different functions as protein, energy, lipid and carbohydrate metabolism, detoxification, homeostasis, cell communication, cytoskeleton, constitutive proteins and allergen. This study provides new insights contributing to the comprehension of the biological functions of the Dufour's gland in honey bees.

1- INTRODUÇÃO

As abelhas são insetos que se destacam por desempenharem papel fundamental na agricultura e ecossistemas globais, especialmente na polinização de plantas e geração de produtos de alto valor econômico (Free, 1993; Kevan, 1999; Porrini et al., 2003; Steffan-Dewenter et al., 2005; Calderone, 2012; Garibaldi et al., 2016).

As abelhas apresentam vários padrões com relação à socialidade, que vão desde hábitos solitários até o mais complexo nível de organização social. Neste último destaca-se as abelhas eussociais, cuja colônia é constituída por uma rainha, com função reprodutiva, e de operárias estéreis ou semi-estéreis, exercendo as demais funções da colônia (Michener, 1974; Winston, 1987).

Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apidae), espécie de abelha originária da Ásia, é um modelo de organismo eussocial, que foi introduzido no Brasil para produção comercial de mel (Silveira et al., 2002), e exibe uma notável divisão do trabalho dentro da colônia (Lattorff & Moritz, 2013). No período de duas a três semanas da vida adulta destes insetos, as operárias desenvolvem basicamente as tarefas dentro do ninho, incluindo cuidados com a prole, as quais são chamadas nutridoras. Após esse período, as operárias realizam tarefas fora do ninho, durante a última fase da vida (uma a duas semanas), como a busca por néctar e pólen e por isso elas são chamadas campeiras ou forrageiras (Winston, 1987).

A organização social das abelhas é mantida por um complexo de sistema de comunicação que envolve a liberação de feromônios produzidos por diversas glândulas exócrinas (Cruz-Landim, 2009). Dentre as glândulas exócrinas das abelhas, estão aquelas anexas ao aparelho do ferrão, que incluem a glândula de veneno e a glândula de Dufour (Martin et al., 2005). A glândula de veneno é originada das glândulas associadas ao ovopositor dos himenópteros ancestrais não aculeados, enquanto a glândula de Dufour é homóloga às glândulas colaterais dos outros insetos, sendo encontrada em todas as fêmeas dos himenópteros (Cruz-Landim, 1996; Grimaldi & Engel, 2006).

Um conjunto de funções tem sido atribuído à glândula de Dufour em diferentes himenópteros. Os produtos de sua secreção podem ser utilizados no revestimento das células de cria, na construção de ninhos, alimentação larval, além do seu papel na comunicação, que se estende à marcação de possíveis hospedeiros, reconhecimento do ninho e de membros da mesma colônia, sinal de fertilidade, feromônios de trilha (Mitra, 2013) e sexual (Katzav-Gozansky et al., 2002; Malka et al., 2008). No entanto, o papel

da glândula de Dufour nas diferentes castas nas quais as operárias de abelhas desempenham diferentes tarefas precisa ser investigado.

Estudos envolvendo o proteoma de algumas estruturas de *A. mellifera* têm sido realizados, incluindo a glândula salivar (Fujita et al., 2010; Feng et al., 2013), fluido seminal (Baer et al., 2012), cérebro e ovário (Cardoen et al., 2012) e ovo (Fang & Li, 2010). As proteínas presentes na glândula de Dufour podem desempenhar diversas funções, porém não existem relatos envolvendo a identificação de proteínas nesta glândula. Portanto, este trabalho teve por objetivo realizar um estudo inédito do proteoma da glândula de Dufour de *A. mellifera*, contribuindo para a elucidação das principais funções biológicas desta glândula nesta abelha.

2- OBJETIVO

Identificar e caracterizar as proteínas diferencialmente abundantes presentes na glândula de Dufour de operárias nutridoras e campeiras de *A. mellifera*.

3-REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Hymenoptera

Os insetos Hymenoptera formam um grupo diverso, com cerca de 115.000 espécies descritas (Hanson & Gauld, 1995), distribuídas em 99 famílias taxonômicas (Goulet & Huber, 1993), compreendendo aproximadamente 10% da diversidade de espécies no planeta, que incluem abelhas, formigas e vespas, insetos que afetam diretamente a saúde humana e a agricultura (Munoz-Torres et al. 2011).

3.2. Abelhas

As abelhas (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila) surgiram no período Cretáceo, há aproximadamente 140-110 milhões de anos, coincidentemente com a origem e a diversificação das plantas com flores (Danforth et al. 2013). Abelhas, que compreendem cerca de 20000 espécies descritas (Ascher & Pickering, 2012), são de importância econômica, tanto por sua atuação na polinização de áreas nativas, como de culturas agrícolas, e estima-se que um terço da dieta humana é derivado de frutas, legumes e sementes que dependem da polinização desses insetos (Klein et al. 2007). Do ponto de vista econômico, o valor das culturas geradas pela polinização das abelhas é 100 vezes maior do que o valor gerado com a produção de mel por estes insetos (Morse & Calderone, 2000).

As abelhas apresentam diferentes e complexos níveis de organização social. Algumas espécies são solitárias enquanto outras exibem um alto nível de socialidade (eusocialidade), com um grande número de indivíduos de diferentes idades e uma notável divisão do trabalho entre os membros da colônia (Michener, 1974; Page, 1980).

As abelhas são classificadas dentro de sete famílias e 25 subfamílias (Michener, 2007), sendo a família Apidae a mais numerosa, com cerca de 5700 espécies descritas em três subfamílias, 34 tribos e 209 gêneros (Ascher & Pickering, 2012). Abelhas da família Apidae são amplamente distribuídas geograficamente, mas sua maior diversidade tem sido observada nas regiões neotropical e oriental (Danforth et al. 2013).

3.2.1. *Apis mellifera*

Muitas subespécies de *A. mellifera* ocorrem em uma ampla gama de distribuição natural, e diferem umas das outras em muitos aspectos morfológicos e comportamentais (Tofilski, 2008). Durante o processo de colonização das Américas, essas abelhas foram

submetidas a várias forças evolucionárias incluindo seleção natural e artificial (Michener, 1975; Ratnieks, 1991; Diniz-Filho & Malaspina, 1995).

Apis mellifera foi inicialmente introduzida no Brasil durante o século XIX por padres jesuítas europeus durante o processo de colonização. Por volta de 1956, *A. mellifera* de origem africana também foi introduzida no Brasil, e desde então, um grupo originário do cruzamento entre abelhas de origem europeia e africana tem se estabelecido no país (Nunes et al. 2012). Os híbridos resultantes são correntemente conhecidos como abelhas africanizadas por apresentarem maior similaridade com as abelhas africanas do que com as europeias, em termos de morfologia, bioquímica, hidrocarbonetos cuticulares, frequência alélica e isoenzimas (Diniz-Filho & Malaspina, 1995). A condição ambiental similar entre Brasil e África facilitou a adaptação e dispersão das abelhas africanizadas no Brasil, em adição à capacidade da subespécie africana imprimir alguma vantagem adaptativa ao híbrido, garantindo a expansão desta abelha pelas Américas (Garcia & Couto, 2005).

3.2.2. Operárias Nutridoras e Campeiras

Uma característica primária da vida eussocial é a divisão do trabalho (Pankiw, 2004; Michener, 1969; Wilson, 1971; Hölldobler & Wilson, 2009). Nos insetos altamente eussociais, existe um dimorfismo de casta, com rainhas morfológica e fisiologicamente distintas, exercendo basicamente funções reprodutivas, e operárias, essencialmente estéreis, realizando as demais tarefas dentro da colônia (Michener 1974), embora recentemente esta esterilidade das operárias venha sendo questionada (Woyciechowski & Kuszewska, 2012, Naeger et al., 2013; Tan et al., 2015).

Em *A. mellifera*, esse dimorfismo é bastante evidente quando se comparam rainhas e operárias, consistente com os papéis que cada uma assume dentro da colônia. As operárias têm menor massa corporal, um par de ovários pequenos contendo pouco ovariolos, uma espermoteca vestigial, um ferrão farpado usado na defesa do ninho, além de estruturas nas patas medianas e traseiras adaptadas para a coleta e o transporte do pólen. Rainhas, por outro lado, tem um par de ovários maior contendo muitos ovariolos, ferrão pouco farpado e ausência de estruturas para a coleta de pólen (Linksvayer et al. 2011; Leimar et al., 2012).

Numa colônia de *A. mellifera*, a divisão do trabalho está intimamente relacionada à idade das abelhas operárias (Robinson & Huang, 1998). As operárias mais jovens geralmente realizam diferentes tarefas no ninho (limpeza das células, criação dos

imaturos, construção do favo de mel, desidratação do néctar, ventilação do ninho, cuidados com a rainha e com os machos, etc.) durante as primeiras duas a três semanas após a emergência como indivíduos adultos. Então, após esse período, elas começam a exercer novas tarefas que consistem na defesa do ninho (guardas), na busca e coleta de alimento no campo (néctar, pólen, água e resina) sendo denominadas de campeiras (Kolmes et al., 1989; Huang & Robinson, 1992; Robinson & Huang, 1998).

Operárias nutridoras alimentam diferencialmente as larvas e, assim, controlam as respostas diferenciais de desenvolvimento das mesmas, resultando nos fenótipos rainha ou operárias (Michener, 1974; Evans & Wheeler, 2001). A quantidade e o conteúdo de açúcar dos alimentos fornecidos às larvas modulam a produção de hormônios de desenvolvimento, tais como hormônio juvenil (JH) e ecdisteróides, que afetam na diferenciação do tecido no final da muda (Leimar et al., 2012).

A divisão do trabalho na colônia, no entanto, não é rígida (Robinson & Huang, 1998; Leoncini et al., 2004). As operárias podem acelerar, retardar, e até mesmo reverter seu status comportamental em resposta a mudanças na colônia ou condições ambientais (Huang & Robinson, 1992, 1996). A remoção de campeiras de uma colônia estimula as abelhas mais jovens a começarem precocemente na busca por alimento fora do ninho (algumas abelhas começam a forragear aos cinco dias de idade), enquanto que a adição de campeiras promove o efeito contrário; e a remoção de nutridoras reverte as campeiras a realizarem tarefas de nutridoras (Huang & Robinson, 1996; Leoncini et al., 2004; Pankiw, 2004b).

A transição de nutridoras para campeiras envolve mudanças na expressão gênica, nas atividades neuroquímicas e endócrinas, e estrutura do cérebro (Robinson, 2002). Mudanças na expressão gênica no cérebro são resultantes de diferenças específicas no padrão de metilação do DNA, que regula genes importantes para a indução da mudança do fenótipo, resultando em fenótipos comportamentais complexos e distintos (Herb et al. 2012) que podem incluir as glândulas exócrinas que apresentam importante papel na comunicação química entre os indivíduos da colônia (Cruz-Landim, 2009).

3.3. Glândula de Dufour

A glândula de Dufour foi descrita por Dufour (1841), sendo uma glândula abdominal não pareada, localizada próxima à extremidade do abdômen, especificamente na base do ferrão, descrita por alguns autores como sendo homóloga às glândulas

colaterais de outros insetos e uma glândula acessória reprodutiva (Billen, 1987; Abdalla & Cruz-Landim, 2001a,b).

De origem ectodérmica e anteriormente designada glândula básica em razão do pH de sua secreção (Cruz-Landim, 2009), a glândula de Dufour termina em diferentes locais entre os himenópteros: em formigas, esta se abre na base do aparelho do ferrão; em abelhas e vespas, a glândula de Dufour se abre na parede dorsal da vagina, sendo circundada por fibras musculares (Billen, 1987; Martin et al., 2005; Fortunato & Turillazzi, 2012).

A morfologia da glândula de Dufour pode variar entre as espécies, mas ela é essencialmente um tubo epitelial de camada única de células cuja superfície luminal é revestida por uma fina cutícula, enquanto que, externamente ao epitélio, uma camada irregular de fibras musculares, traqueíolos e nervos a recobrem (Abdalla et al. 1999a; Abdalla & Cruz-Landim 2004a,b).

As células da glândula de Dufour são abundantes em retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e grânulos elétron densos, além de invaginações basais e apicais da membrana plasmática, consistente com o seu papel na secreção de substâncias no lúmen da glândula e absorção de precursores e/ou componentes da secreção da própria glândula diretamente da hemolinfa (Billen, 1986, 1987; Abdalla & Cruz-Landim, 2001a,b).

A composição química da secreção da glândula varia entre os himenópteros, e se estende desde hidrocarbonetos de cadeia longa (saturados e/ou insaturados) até vários outros compostos voláteis, semivoláteis e não voláteis como terpenóides, álcoois, ésteres, ácidos graxos de cadeia longa, açúcares, quinonas, vários compostos aromáticos, traços de colesterol, triglicerídeos e aldeídos (Vinson et al. 1978; Duffield et al. 1984, Kronenberg & Hefetz, 1984; Hefetz 1987, Syvertsen et al. 1995; Katzav-Gozansky et al. 1997; Sledge et al. 2000; Abdalla et al. 2004; Amsalem et al. 2009; Cardinal et al. 2010, Mitra et al. 2011; Bonckaert et al. 2012).

Em *A. mellifera*, a composição química da glândula de Dufour é afetada pela posição, tarefa e idade das abelhas dentro da colônia (Le Conte & Hefetz, 2008). A glândula de Dufour desta espécie contém uma mistura de ésteres que são sintetizados pela própria glândula (Katzav-Gozansky et al., 1997a) e hidrocarbonetos que são transportados para o interior da glândula via hemolinfa (Schal et al. 1998; Katzav-Gozansky et al., 2000; Abdalla & Cruz-Landim, 2001b; Blomquist et al., 2012).

A glândula de ambas, rainhas e operárias, apresentam hidrocarbonetos na sua secreção, mas somente as rainhas produzem ésteres (Katzav-Gozansky et al., 1997a; Martin & Jones, 2004). Contudo, em operárias férteis, a secreção da glândula de Dufour torna-se qualitativa e quantitativamente similar à da rainha (Katzav-Gozansky et al., 1997b; Katzav-Gozansky et al., 2004; Katzav-Gozansky et al., 2007), sugerindo que o perfil químico da glândula está relacionado ao desenvolvimento do ovário e potencial reprodutivo das abelhas (Cruz-Landim, 2009; Richard et al., 2011).

Alguns estudos reportam que a glândula de Dufour pode apresentar funções bastante diferenciadas em abelhas. Os produtos da secreção podem atuar como feromônio da rainha (Katzav-Gozansky et al., 2002; Sole et al., 2002; Oldroyd et al., 2002; Katzav-Gozansky et al., 2007; Malka et al., 2008), sinal de fertilidade (Amsalem et al., 2009; Amsalem & Hefetz, 2010), no reconhecimento do ninho (Shimron et al., 1985) e das companheiras do ninho (Tengö et al., 1991; Oldham et al., 1994; Ayasse et al., 1999), no revestimentos das células de cria (Hefetz, 1987; Shimron et al., 1985), como alimento larval (Norden et al., 1980), na marcação do sítio de forrageamento (Frankie & Vinson, 1977; Vinson et al., 1978), além de atuarem como feromônio de alarme e sexual (Katzav-Gozansky et al., 2002; Malka et al., 2008).

Em *A. mellifera*, a glândula de Dufour está envolvida na produção de um feromônio casta-específico que parece sinalizar quanto à fertilidade (Katzav-Gozansky et al., 1997b, 2004; Dor et al., 2005), na marcação de ovos da rainha para que estes não sejam devorados durante as atividades de inspeção de operárias policiais (Katzav-Gozansky et al., 1997a; Martin et al., 2004), bem como ativar o comportamento de agressão durante a competição reprodutiva entre operárias (Malka et al., 2008).

A glândula de Dufour é mais desenvolvida nas espécies solitárias do que nas espécies sociais. Esta glândula apresenta um ciclo de funcionamento correlacionado ao estado reprodutivo das rainhas e ao desenvolvimento do ovário, sendo mais ativa nas rainhas fecundadas que nas virgens (Cruz-Landim, 2009). Nas espécies eussociais com ferrão como *A. mellifera* e *Bombus terrestris*, a glândula é mais desenvolvida nas rainhas do que nas operárias, sugerindo especificidade de casta (Katzav-Gozansky et al., 1997; Abdalla & Cruz-Landim, 2001a).

Dados os poucos estudos sobre a glândula de Dufour e o interesse no conhecimento do comportamento dessas abelhas, as glândulas de Dufour devem ser analisadas quanto à sua constituição proteica, o que fornecerá novas informações que

contribuirão para a compreensão das funções biológicas da glândula de Dufour e seu papel na organização social das abelhas.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta e dissecação das glândulas de Dufour

Exemplares de *A. mellifera* foram coletados no Apiário da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. Para o presente estudo, foram analisadas operárias nutridoras com seus ovários ativados (avaliados durante a dissecação) e operárias campeiras, cujos ovários estavam degenerados. Operárias nutridoras foram coletadas próximas às áreas de cria, no interior do ninho, enquanto as operárias campeiras foram coletadas na entrada da colônia. As abelhas foram obtidas em diferentes colônias e em datas variáveis. Cerca de 200 operárias nutridoras e 200 operárias campeiras foram crio-anestesiadas, dissecadas e as glândulas de Dufour foram retiradas e armazenadas em solução aquosa de inibidores de proteases (P2714 SIGMA) 1% (v/v), a -20°C para uso posterior.

4.2. Extração proteica

O material contendo as glândulas de Dufour foi seco em speedVac e ressuspendido em 100 µL de tampão de lise (ureia 7 M, tiourea 2 M, 3-[(3Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 4% (p/v), Ditiotretol (DTT) 40 mM). Em seguida, o material foi submetido a sucessivos pulsos de ultrassom (2 min) intercalados por banhos no gelo, até a completa solubilização do material. As amostras foram centrifugadas a 15.000 x g durante 30 minutos a 4 °C, e o sobrenadante coletado.

4.3. Quantificação proteica

A concentração de proteínas totais do extrato obtido foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

4.4. Eletroforese unidimensional

A caracterização inicial das proteínas presentes na glândula de Dufour de *A. mellifera* foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 14%, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com a metodologia de Laemmli (1970). Amostras contendo 25 µg de proteínas foram submetidas à eletroforese. O gel foi corado em solução de Coomassie Blue Coloidal, que continha Coomassie Blue G-250 0,2% (v/v), etanol 48% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) seguido de fotodocumentação e

cálculo das massas moleculares das bandas obtidas com base em padrão de massa molecular (BioRad).

4.5. Eletroforese bidimensional

Fitas Immobiline DryStrip, 7 cm, pH 3-10 (GE Healthcare, EUA) foram reidratadas por 10 h com 125 µL de solução de reidratação. A solução de reidratação foi composta de 150 µg de proteína da glândula de Dufour, tampão de gradiente imobilizado de pH 3 a 10 (IPG buffer) 2,5% (v/v), DTT 40 mM e solução Destreak (GE-Healthcare, EUA). A focalização isoeétrica foi realizada em equipamento IPGphor Ettan III, com modo linear de voltagem (step 1: 300 V por 12 h; 2 gradiente: 1000 V por 30 min; 3 gradiente: 5000 V por 1:20 h; step 4: 5000 V por 25 min).

Após a focalização, as fitas Immobiline DryStrip pH 3-10 foram alquiladas e reduzidas em solução de equilíbrio (ureia 6 M; Tris-HCl 75 mM pH 8,8; glicerol 29,3% (v/v); dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% (p/v); azul de bromofenol 0,002% (p/v)) contendo, respectivamente, DTT 1% (p/v) e iodoacetamida 2,5% (p/v), sob agitação a 15 min cada.

A segunda dimensão foi realizada em cuba de eletroforese vertical Mini Protean II (Bio Rad, EUA), em gel de poliacrilamida 14%, sob corrente elétrica de 100 V por 10 min, 80 V por 40 min e 60 V até o término da corrida. Foram realizados dois géis para cada tratamento (nutridoras e campeiras).

Para a coloração dos géis, estes foram mantidos sob agitação em solução fixadora (ácido acético 10% (v/v), metanol 40% (v/v) por 30 min e em seguida corados com solução de coomassie blue coloidal contendo Coomassie Brilliant Blue G-250 0,08% (p/v), sulfato de amônio 8% (p/v), ácido fosfórico 0,8% (v/v) e metanol 20% (v/v) por 36 h. Posteriormente os géis foram armazenados em solução de ácido acético 5% (v/v).

4.6. Obtenção e análise das imagens

A digitalização dos géis foi realizada em equipamento Image Scanner III (GE-Healthcare, EUA) em modo de transparência 16 bit nas cores vermelha-azul e verde-azul e 600 dpi de resolução. As imagens foram analisadas utilizando o programa Image Master Platinum v.7 (GE-Healthcare, EUA). Os géis das amostras de abelhas nutridoras e campeiras foram comparados e os spots diferencialmente abundantes,

identificados a partir do teste de análise de variância (ANOVA apresentando $p < 0,05$) e diferença de abundância de pelo menos 1,2 vezes, foram excisados.

4.7. Digestão das amostras

Os spots excisados foram colocados em solução de acetonitrila (ACN) 100% (v/v), e incubados, sequencialmente, em solução de DTT 65 mM por 30 min a 56 °C e em solução de iodoacetamida 55 mM por 20 min em temperatura ambiente no escuro, seguido de lavagem em ACN 100% (v/v).

Os fragmentos dos géis foram tratados com solução de bicarbonato de amônio 100 mM contendo enzima tripsina ($25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) (Promega, Sequencing Grade Modified Trypsin®), e incubados a 37 °C por 16 h. A extração dos peptídeos dos fragmentos dos géis foi realizada em ácido fórmico 5% (v/v) e ACN 50% (v/v). O extrato obtido foi seco em SpeedVac® (Thermo Savant, EUA) e ressuscitado em 10 μL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v). As amostras foram dessalinizadas utilizando ponteiros ZipTip com resina C18 (Millipore, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, secas a vácuo e ressuscitadas em 10 μL de TFA .

4.8. Espectrometria de massas

As amostras foram analisadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemanha) usando ácido α -4-hidroxicinâmico como matriz (10 mg mL^{-1} em ACN 50% (v/v), TFA 0,1% (v/v)). As amostras foram aplicadas em placa de aço MTP Anchor Chip TM 600/384 TF (Bruker Daltonics, Alemanha) na proporção 1:1 (1 μL de amostra para 1 μL de matriz). O método de análise para MS foi RP PepMix (500 a 3500 Da) que corresponde ao modo de detecção refletivo para íons com polaridade positiva, e o método de fragmentação para MS/MS foi o LIFT.

4.9. Identificação das proteínas

Os espectros de massas foram processados utilizando o software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha) para a remoção de contaminantes e obtenção da lista de massas que foi submetida à identificação no programa MASCOT (Mascot Daemon). O banco de dados para *A. mellifera* foi extraído do Uniprot (uniprot.org, última atualização em 15 de maio de 2015). Os parâmetros de busca utilizados foram enzima tripsina com uma clivagem perdida, carbamidometilação da cisteína e oxidação da metionina como modificação fixa e variável, respectivamente, tolerância da massa do

peptídeo foi de 0,5 Da para MS e 0,2 Da para MS/MS. As proteínas identificadas foram validadas pelo software Scaffold 4.0, com no mínimo um peptídeo único e 90% de probabilidade de identificação. As proteínas identificadas pelo Mascot e que não foram passíveis de validação pelo Scaffold foram analisadas no software Peaks 7.5 (Bioinformatics Solutions Inc, Canadá) e no software Bioedit (Biological sequence alignment editor v.7.2.5). As proteínas identificadas e validadas foram analisadas usando o banco de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) e STRING (<http://www.string-db.org/>) para inferir funções biológicas e interação proteína-proteína, respectivamente. Os softwares CELLO v.2.5 (subcellular localization predictor - <http://cello.life.nctu.edu.tw/>) e SIGNAL P 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) foram utilizados na predição da localização subcelular e presença de peptídeo sinal, respectivamente.

5- RESULTADOS

A concentração de proteínas totais obtidas nos extratos das glândulas de Dufour de operárias campeiras e nutridoras foi $3,02 \pm 0,22 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ e $5,19 \pm 0,27 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente.

A eletroforese unidimensional evidenciou proteínas desde 17 kDa até 200 kDa, com uma maior concentração daquelas acima de 30 kDa para ambas as operárias, nutridoras e campeiras, sendo em maior número nas operárias nutridoras que nas campeiras (Fig. 1).

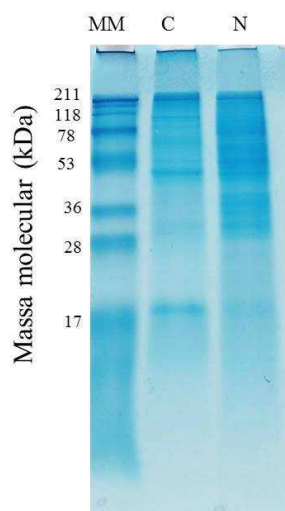


Figura 1 – Eletroforese unidimensional das proteínas das glândulas de Dufour de operárias campeiras (C) e operárias nutridoras (N) de *Apis mellifera*. MM corresponde ao marcador de massa molecular em kDa.

A eletroforese bidimensional comparando operárias nutridoras e campeiras permitiu identificar proteínas diferencialmente expressas nas glândulas de Dufour com diferentes pontos isoelétricos (pI) e massas moleculares (MM) (Fig. 2). Ocorreu maior concentração das proteínas com ponto isoelétrico entre 5 e 7 nas operárias nutridoras e entre 4 e 8 nas operárias campeiras (Tabela 1).

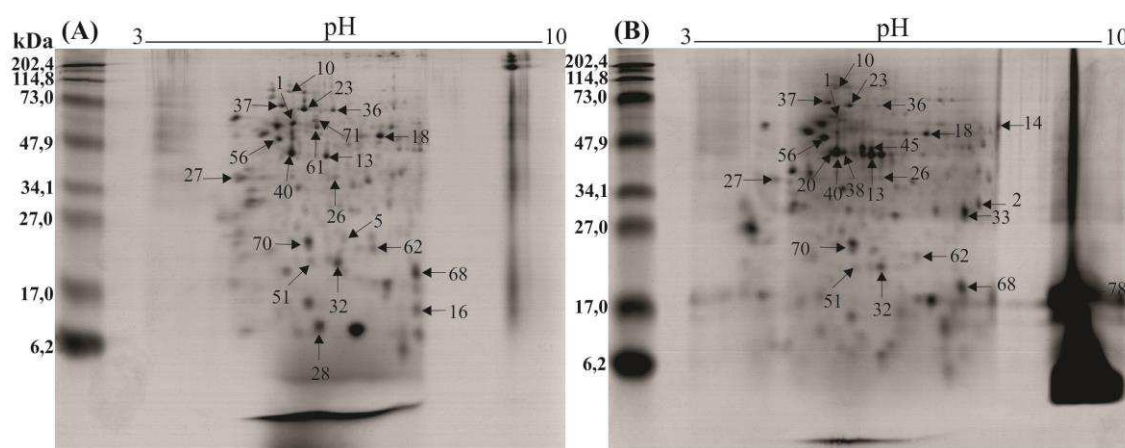


Figura 2 – Eletroforese bidimensional das proteínas das glândulas de Dufour de operárias nutridoras (A) e operárias campeiras (B) em *Apis mellifera*. Os spots identificados por MALDI-TOF/TOF estão numerados e suas identificações estão listadas na tabela 2.

Um total de 279 spots foram diferencialmente abundantes nas glândulas de Dufour de operárias nutridoras e campeiras (Fig. 2). Desses 279 spots, apenas aqueles que apresentaram diferença significativa na expressão (ANOVA, $P < 0,05$), foram analisados, totalizando 131 spots. Desses 131 spots, 77 apresentaram maior abundância (up regulados) em operárias nutridoras quando comparado a operárias campeiras, enquanto 55 apresentaram menor abundância (down reguladas) em nutridoras. Dos 131 spots, 80 foram possíveis de serem excisados dos géis e 28 foram identificados (Tabela 1).

Tabela 1: Proteínas identificadas nas glândulas de Dufour de operárias nutridoras e campeiras de *A. mellifera* por MALDI-TOF-TOF e Mascot

Spot ^a	Nº de acesso	Proteína Identificada	Massa experimental / massa teórica (Da)	pI experimental / pI teórico	Score ^b
1	V9II55_APICE	Proteína do choque térmico (HSP60)	57139/60546	5.61/5.64	82
2	A0A088A4K0_APIME	Fosfoglicerato mutase	31688/35396	7.77/9.36	156
5	J7F0F7_APICC	Ferritina	23473/25718	6.42/5.9	79
10	V9II68_APICE	ATPase do retículo endoplasmático transicional	86885/89467	5.57/5.18	74
13	A0A088ARZ8_APIME	Arginina quinase	42360/43726	6.16/6.11	414
14	V9II98_APICE	Proteína Idgf4 tipo quitinase	56395/48921	8.13/8.06	162
16	Q76LA4_APIME	Proteína de ligação a ácidos graxos	10636/15140	7.66/6.37	61
18	A0A088AST9_APIME	Enolase	49088/39821	7.10/6.54	336
20	V9IE14_APICE	Actina-42A	45085/42121	5.27/5.3	169
23	V9IEZ2_APICE	Proteína do choque térmico (HSP70)	65541/71383	5.80/5.43	504

26	A0A088ATC7_APIME	Subunidade tipo alfa do proteassomo	36131/31250	6.31/5.78	56
27	A0A088AJH1_APIME	Anexina	35612/36088	4.53/4.6	108
28	Q1W641_APIME	Proteína de ligação ao odorante 13 (OBP 13)	7873/15494	5.95/6.37	123
32	G0WRL1_APICC	Tiorredoxina peroxidase 1 (TPX)	20221/22065	6.31/5.82	106
33	L0HT99_APICE	Actina (Fragmento)	30141/31458	7.54/4.94	41
36	V9IK10_APICE	Proteína do estresse-70 (HSP70)	65221/75642	6.30/6.38	114
37	V9IGA1_APICE	Proteína regulada por glicose (HSP70)	68495/72878	5.44/5.29	298
38	V9IE14_APICE	Actina-42A	44934/42121	5.51/5.3	94
40	V9IE14_APICE	Actina-42A	43919/42121	5.57/5.3	253
45	ACPH1_APIME	Fosfatase ácida do veneno AcpH-1	46005/45588	5.99/5.63	135
51	V9IJF3_APICE	Glutationa S-transferase	22562/22997	5.81/5.49	245
56	A0A088AMB8_APIME	Subunidade beta da ATP sintase	48372/55096	5.37/5.25	471
61	A0A088A7Y2_APIME	Proteína dissulfeto-isomerase	55213/56220	6.0/5.57	157
62	V9IG54_APICE	Proteína letal (2) essencial para a vida (HSP20)	21819/21882	6.93/6.32	86
68	I1VC86_APIME	Fosfolipase A2	18400/19585	7.66/7.05	50
70	V9IJF3_APICE	Glutationa S-transferase	23544/22997	5.80/5.49	141
71	A0A088A9C4_APIME	Hidrolase do éster carboxílico	59133/59330	5.97/5.55	139
78	I1VC86_APIME	Fosfolipase A2	18302/19585	9.30/7.05	107

^a Números dos Spot como mostrado no gel de referência 2D (ver Fig. 2).

^b Mascot score; Score dos íons individuais (MS/MS) > 27 indica identidade ou homologia (p<0,05).

De todas as proteínas identificadas, 21 foram up reguladas em operárias nutridoras em relação a operárias campeiras, e sete proteínas foram down reguladas em operárias nutridoras (Tabela 2). As proteínas identificadas foram classificadas em categorias funcionais, sendo proteínas que apresentaram maior abundância em operárias nutridoras envolvidas nos metabolismos proteico (spots 1, 23, 26, 36, 37, 61 e 62), carboidratos (spot 18), energético (spots 10, 13 e 56) e lipídico (spots 16, 68 e 71), além de proteínas do citoesqueleto (spot 40) e vias de detoxificação (spots 32, 51 e 70), homeostase (spot 5), proteína constitutiva (spot 27) e comunicação celular (spot 28) (Tabela 2, Fig. 3A). As proteínas com abundância diminuída ou nenhuma expressão em operárias nutridoras estão envolvidas no metabolismo de carboidratos (spots 2 e 14), lipídico (spot 78), proteínas do citoesqueleto (spots 20, 33 e 38) e uma alergênica (spot 45) (Tabela 2, Fig. 3B).

Tabela 2: Proteínas identificadas nas glândulas de Dufour de operárias nutridoras e campeiras de *A. mellifera* com seus valores de abundância, categorias funcionais, localização subcelular e presença/ausência de peptídeo sinal.

N° do Spot	Nome da Proteína	Categoria funcional	Abundância ^a	Localização subcelular	Peptídeo sinal
1	Proteína do choque térmico (HSP60)	Metabolismo proteico	+16,49	Citoplasma	Não
23	Proteína do choque térmico (HSP70)	Metabolismo proteico	+ 7,41	Citoplasma	Não
26	Subunidade tipo alfa do proteassomo	Metabolismo proteico	+ 5,21	Citoplasma/ Núcleo	Não
36	Proteína do estresse-70 (HSP70)	Metabolismo proteico	+ 9,92	Mitocôndria	Não
37	Proteína regulada por glicose (HSP70)	Metabolismo proteico	+ 2,93	Retículo Endoplasmático	Não
61	Proteína dissulfeto-isomerase	Metabolismo proteico	+	Retículo Endoplasmático	Sim
62	Proteína letal (2) essencial para a vida (HSP20)	Metabolismo proteico	+ 2,89	Mitocôndria/ Citoplasma	Não
2	Fosfoglicerato mutase	Metabolismo de carboidrato	-	Citoplasma	Não
14	Proteína Idgf4 tipo quitinase	Metabolismo de carboidrato	-	Extracelular	Sim
18	Enolase	Metabolismo de carboidrato	+ 4,7	Citoplasma	Não
10	ATPase do retículo endoplasmático transicional	Metabolismo energético	+ 2,46	Retículo endoplasmático	Não
13	Arginina quinase	Metabolismo energético	+ 1,84	Citoplasma	Não
56	Subunidade beta da ATP sintase	Metabolismo energético	+ 1,54	Mitocôndria	Não
16	Proteína de ligação a ácidos graxos	Metabolismo de lipídio	+	Citoplasma	Não
68	Fosfolipase A2	Metabolismo de lipídio	+ 2,62	Extracelular	Sim
71	Hidrolase do éster carboxílico	Metabolismo de lipídio	+	Citoplasma	Não
78	Fosfolipase A2	Metabolismo de lipídio	-	Extracelular	Sim
20	Actina-42A	Citoesqueleto	-	Citoplasma	Não
33	Actina (Fragmento)	Citoesqueleto	-	Citoplasma	Não
38	Actina-42A	Citoesqueleto	-	Citoplasma	Não
40	Actina-42A	Citoesqueleto	+ 3,49	Citoplasma	Não
32	Tiorredoxina peroxidase 1 (TPX-1)	Detoxificação	+ 3,23	Citoplasma	Não
51	Glutationa S-transferase	Detoxificação	+ 1,67	Citoplasma	Não
70	Glutationa S-transferase	Detoxificação	+ 4,79	Citoplasma	Não
5	Ferritina	Homeostase	+	Extracelular	Sim
27	Anexina	Proteína constitutiva	+ 3,16	Citoplasma	Não
28	Proteína de ligação ao odorante 13 (OBP 13)	Comunicação celular	+	Extracelular	Sim
45	Fosfatase ácida do veneno Acph-1	Alérgeno	-	Extracelular	Sim

^a O valor da abundância que foi calculado na razão entre o volume do spot de operárias nutridoras e seu correspondente em operárias campeiras. (+): Proteínas presentes apenas nas glândulas de Dufour de nutridoras, (-): Proteínas presentes apenas nas glândulas de Dufour de campeiras.

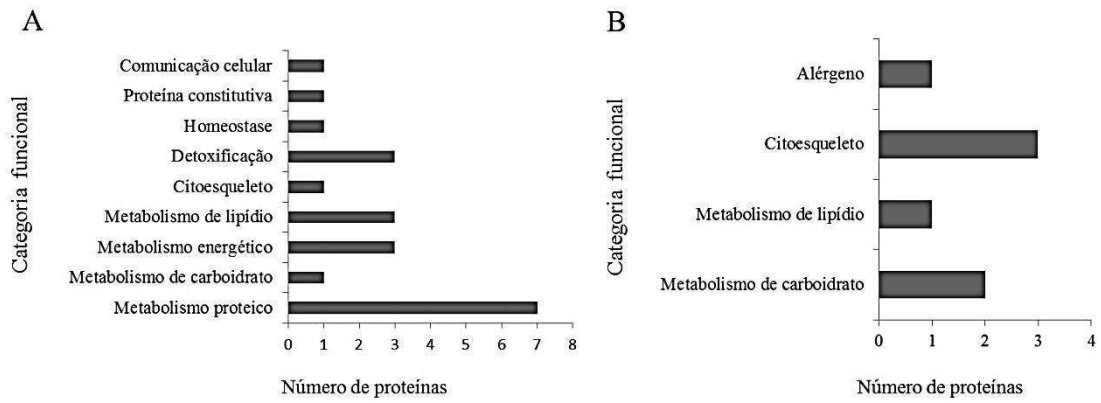


Figura 3. Proteínas identificadas da glândula de Dufour de operárias de *Apis mellifera* (A) Up reguladas e (B) Down reguladas, em nutridoras quando comparadas com campeiras. A classificação em categorias funcionais foi obtida do banco de dados do Uniprot.

Informações relativas à localização subcelular e à presença de peptídeo sinal nas proteínas identificadas foram avaliadas neste estudo levando em consideração o caráter secretor da glândula de Dufour. Uma grande parte das proteínas identificadas apresentou localização subcelular no citoplasma (Tabela 2, Fig. 4A). Em adição, apenas um pequeno grupo das proteínas identificadas apresentou peptídeo sinal que pode ou não conduzir essas proteínas a vias secretórias (Fig. 4B).

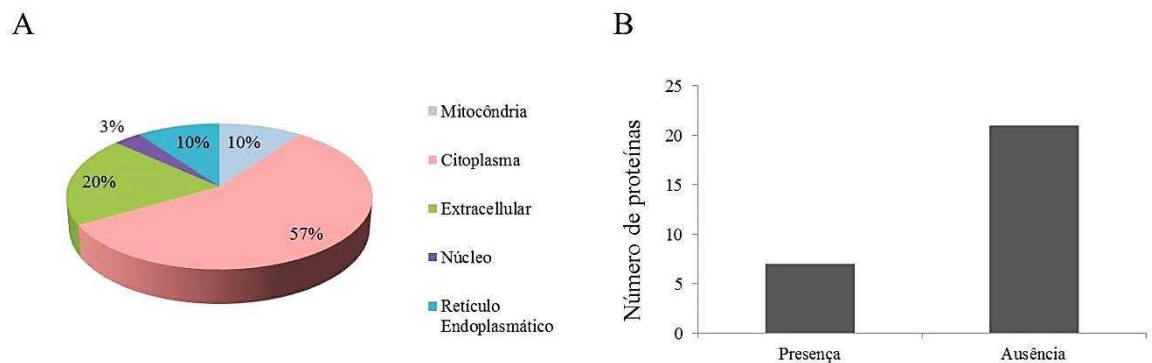


Figura 4: Proteínas identificadas nas glândulas de Dufour de operárias nutridoras e campeiras de *Apis mellifera*. (A) Classificação quanto à localização subcelular usando o software CELLO subcellular localization predictor. (B) Classificação quanto à presença ou ausência de peptídeo sinal pelo software SIGNAL P 4.1.

Interações proteína-proteína foram avaliadas usando o banco de dados STRING visando obter informações adicionais sobre os papéis das proteínas da glândula de Dufour de operárias de *A. mellifera*.

A maior parte das proteínas up reguladas nas glândulas de Dufour de operárias nutridoras exibiram interações funcionais entre si, com uma maior ou menor intensidade: proteína do choque térmico (LOC409384), ferritina (Fer1HCH), ATPase do retículo endoplasmático transicional (TER94), enolase (LOC552678), actina-42A (Arp1), proteína do choque térmico (Hsc70-4), subunidade tipo alfa do proteassomo (LOC552654), tioredoxina peroxidase 1 (Tpx-1), proteína do estresse-70 (Hsc70-5), proteína regulada por glicose (Hsc70-3), subunidade beta da ATP sintase (Atp5b), proteína dissulfeto isomerase (ERp60) e proteína letal (2) essencial para a vida (LOC410087) (Fig. 5A).

A proteína do choque térmico (LOC409384) exibiu interações funcionais com grande parte das proteínas da rede de interação, mas houve um predomínio de interações mais fortes com a proteína regulada por glicose (Hsc70-3), proteína do choque térmico (Hsc 70-4) e proteína do estresse-70 (Hsc70-5), todas pertencentes à família de proteínas do choque térmico (HSPs), além da interação com a proteína mitocondrial, a subunidade beta da ATP sintase (Atp5b) (Fig. 5A).

A proteína tioredoxina peroxidase 1 (Tpx-1), dentre outras interações, exibiu forte interação com a proteína dissulfeto isomerase (ERp60), que por sua vez apresentou interações com as proteínas do choque térmico (Hsc70-3 e Hsc70-4) (Fig. 5A).

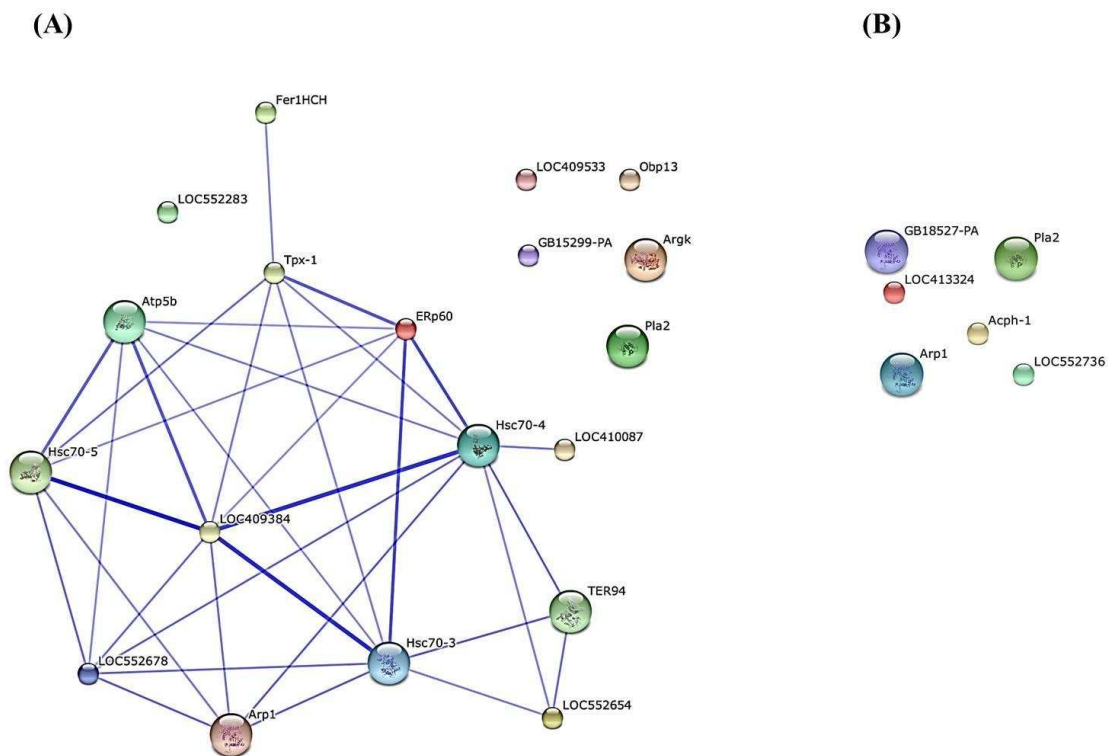


Figura 5. Rede de interações funcionais das proteínas up reguladas nas glândulas de Dufour de operárias nutridoras de *Apis mellifera*. As proteínas foram analisadas usando o banco de dados STRING. As letras seguidas de números correspondem ao número de acesso das proteínas no banco de dados do Uniprot. A rede de interações é mostrada no “confidence view” onde as interações mais fortes e mais fracas são representadas por linhas mais espessas e mais finas, respectivamente.

Algumas proteínas como a anexina (LOC409533), a proteína de ligação a ácidos graxos (GB15299-PA), a glutatona S-transferase (LOC552283), a arginina quinase (Argk), a fosfolipase A2 (Pla2) e a OBP 13 (Obp13) não apresentaram nenhuma interação funcional com os grupos descritos acima e foram submetidas individualmente a análises de interação.

A proteína anexina (LOC409533) exibiu interações funcionais com a proteína do choque térmico 90 (Hsp 90), com a N-miristoil transferase (Nmt), com a abstrakt helicase de RNA dependente de ATP (abs) e com as proteínas da família das caspases (LOC412235, LOC411381 e LOC410394) (Fig. 6).

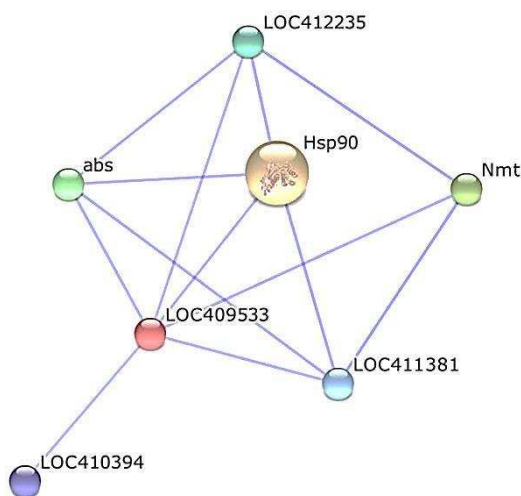


Figura 6. Interações individuais proteína-proteína da anexina (LOC409533). As proteínas foram analisadas usando a base de dados STRING. As letras seguidas de números correspondem ao número de acesso das proteínas no banco de dados do Uniprot e estão descritas no texto. A rede de interações é mostrada no “confidence view” onde as interações mais fortes e mais fracas são representadas por linhas mais espessas e mais finas, respectivamente.

Glutationa S-transferase (LOC552283) interagiu funcionalmente, com forte associação com a proteína JNK MAP quinase basket (bsk). Interações menos intensas foram com as demais proteínas: glutatona S-transferase Z1(GstZ1), glutatona S-

transferase T1 (GstT1), ypsilon schachtel (yps) e 3-oxoácidoCoA-transferase (LOC409157) (Fig 7A).

A proteína de ligação a ácidos graxos (GB15299-PA) apresenta interações funcionais fortes com a proteína Paired box 6 (GB12355-PB), com uma proteína não caracterizada (GB11714-PA), com o fator de transcrição homólogo a HNF-4 (LOC725032), com a proteína dedo de zinco associada a O/E (Oaz) e com a proteína seven up (SVP) (Fig. 7B).

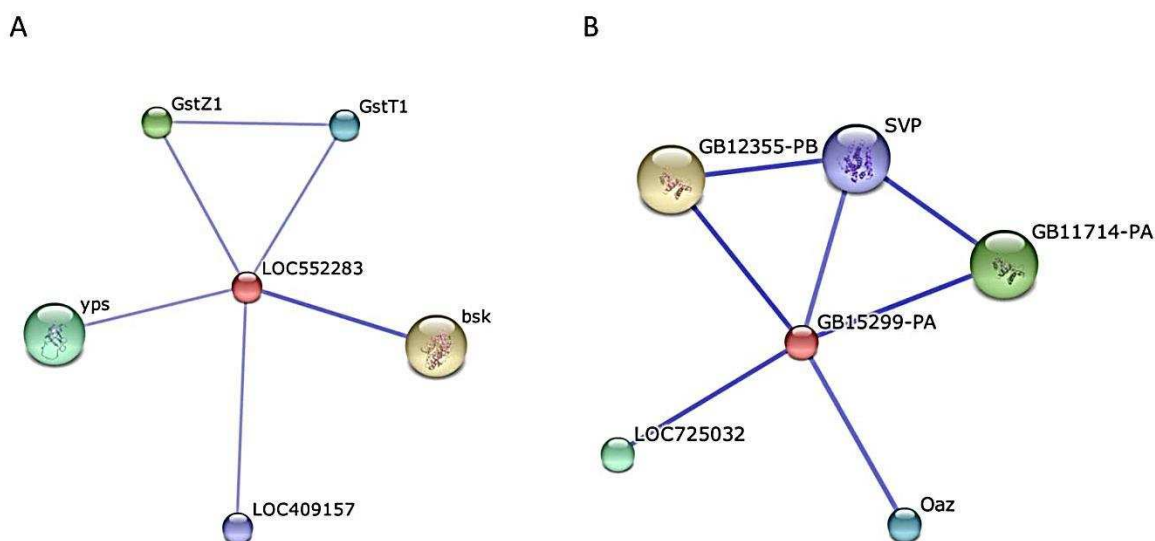


Figura 7. Interações individuais proteína-proteína da glutationa S-transferase (A) e proteína de ligação a ácidos graxos (B). As proteínas foram analisadas usando a base de dados STRING. As letras seguidas de números correspondem ao número de acesso das proteínas no banco de dados do Uniprot e estão descritas no texto. A rede de interações é mostrada no “confidence view” onde as interações mais fortes e mais fracas são representadas por linhas mais espessas e mais finas, respectivamente.

Arginina quinase (Argk) exibiu interações funcionais com uma proteína homóloga da peptidase B caseinolítica (GB10557-PA), com a proteína de determinação miogênica nautilus (nau), com a proteína não caracterizada (LOC726147), com a N-miristoil transferase (Nmt), com a DNA-directed RNA polymerase (RpII215), sendo que as interações mais fortes foram com as proteínas GB10557-PA e nau (Fig. 8A).

A fosfolipase A2 (Pla2) interagiu apenas com uma proteína não caracterizada (Top1) (Fig. 8B).

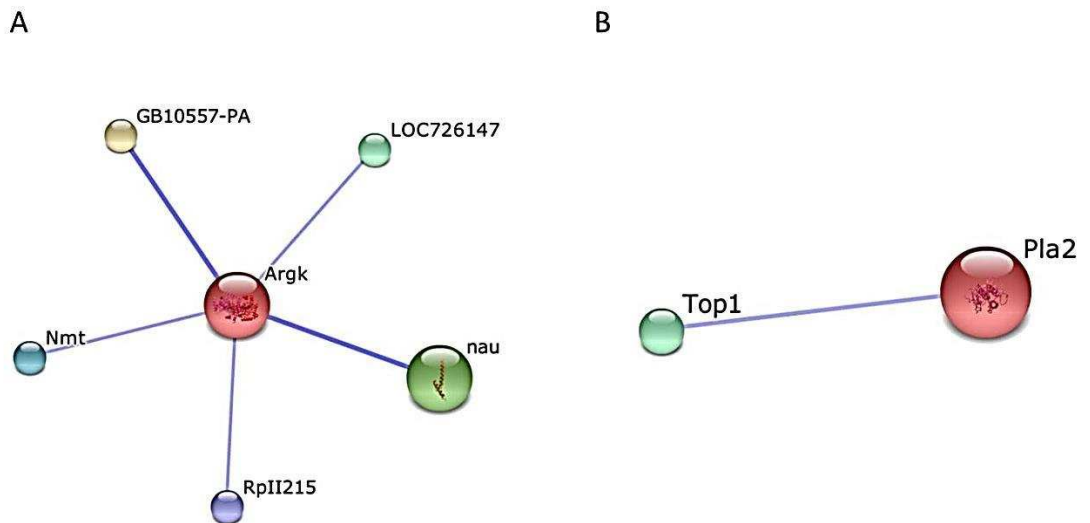


Figura 8. Interações individuais proteína-proteína da arginina quinase (Argk; A) e fosfolipase A2 (Pla2; B). As proteínas foram analisadas usando a base de dados STRING. As letras seguidas de números correspondem ao número de acesso das proteínas no banco de dados do Uniprot e estão descritas no texto. A rede de interações é mostrada no “confidence view” onde as interações mais fortes e mais fracas são representadas por linhas mais espessas e mais finas, respectivamente.

OBP 13 (Obp13) não apresentou interações funcionais individuais com outras proteínas de acordo com o banco de dados do STRING (Fig. 5A).

Nenhuma das proteínas do grupo das proteínas down reguladas nas glândulas de Dufour de nutridoras, ou seja, aquelas proteínas que apresentaram maior abundância nas glândulas de campeiras exibiram interações funcionais entre si (Fig. 5B). Sendo assim, estas proteínas que incluem a proteína fosfatase ácida do veneno Acph-1(Acph-1), a fosfoglicerato mutase (LOC552736), a proteína Idgf4 tipo quitinase (LOC413324) e as actinas (Arp 1 e GB18527-PA) foram examinadas de acordo com suas interações individuais (Fig. 5B).

A proteína fosfatase ácida do veneno Acph-1(Acph-1) exibiu interações funcionais com uma proteína não caracterizada (GB19209-PA), com a proteína tipo fosfatase fosfotirosina de baixo peso molecular (LOC727300) e com a fosfoglicomutase 1 (Pgm1) (Fig. 9A).

A fosfoglicerato mutase (LOC552736) por sua vez exibiu interações funcionais fortes com a fosfoglicerato quinase (Pgk), com a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (Gapdh), com a triosefosfato isomerase (Tpi), com a glicose-6-fosfato isomerase (LOC551154) e com a histona H4 (LOC411541) (Fig. 9B).

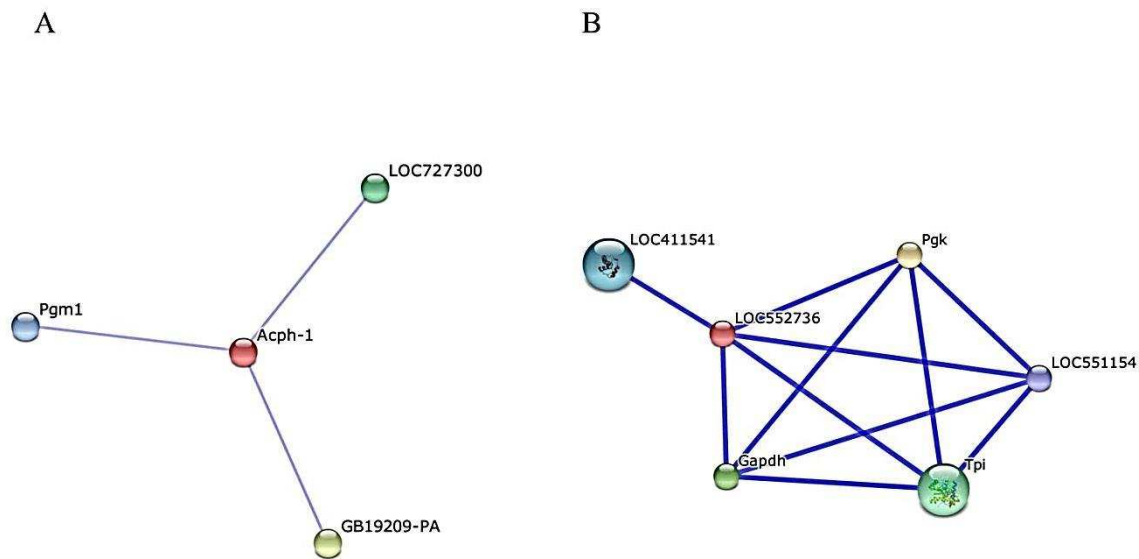


Figura 9. Interações individuais proteína-proteína da fosfatase ácida do veneno Acph-1(Acph-1; A) e fosfoglicerato mutase (LOC552736; B). As proteínas foram analisadas usando a base de dados STRING. As letras seguidas de números correspondem ao número de acesso das proteínas no banco de dados do Uniprot e estão descritas no texto. A rede de interações é mostrada no “confidence view” onde as interações mais fortes e mais fracas são representadas por linhas mais espessas e mais finas, respectivamente.

A proteína Idgf4 tipo quitinase (LOC413324) exibiu interações com as proteínas não caracterizadas GB19496-PA e GB10536-PA, com as proteínas de ligação a FK506 (FK506-bp1 e GB12767-PA) e com a enolase K01689 (LOC552678) (Fig 10A).

A actina (Arp 1), por sua vez, interagiu funcionalmente com a profilina (PRF), com a fimbrina (Fim), com a proteína de interação com actina 1 (flr), com a twinfilin (twf) e com a proteína de interação huntingtin 1(Hip1) (Fig 10B).

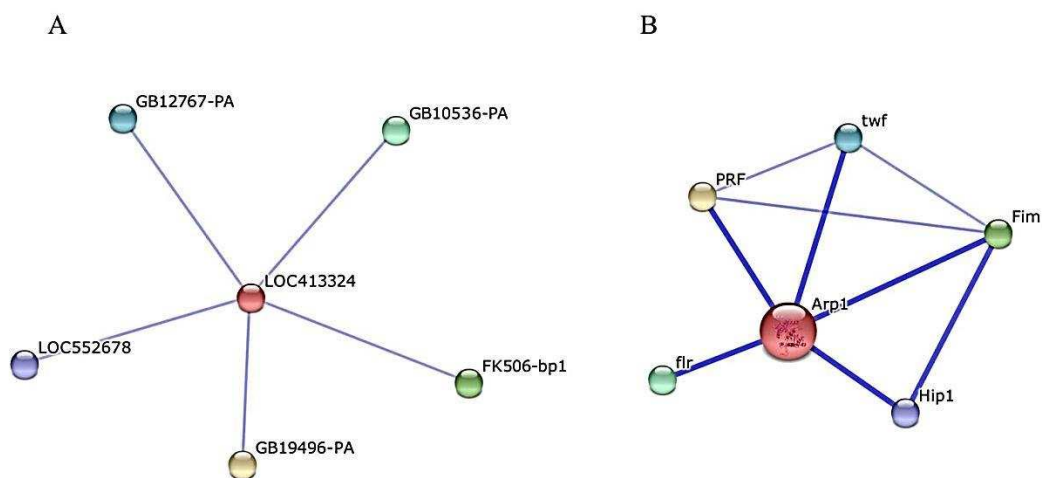


Figura 10. Interações individuais proteína-proteína da Idgf4 tipo quitinase (LOC413324; A) e actina (Arp 1; B). As proteínas foram analisadas usando a base de dados STRING. As letras seguidas de números correspondem ao número de acesso das proteínas no banco de dados do Uniprot e estão descritas no texto. A rede de interações é mostrada no “confidence view” onde as interações mais fortes e mais fracas são representadas por linhas mais espessas e mais finas, respectivamente

6- DISCUSSÃO

6.1. Aspectos quantitativo/qualitativos da glândula de Dufour

As glândulas de Dufour de operárias campeiras apresentaram um conteúdo total de proteínas 40% menor do que as glândulas de Dufour de operárias nutridoras. Esse resultado sugere que a glândula em operárias com diferentes funções dentro da colônia sintetizam diferentes proteínas com diferentes concentrações refletindo demandas metabólicas diferenciadas. Dados morfológicos apontam que as glândulas de Dufour, operárias nutridoras de *A. mellifera* tratadas com hormônio juvenil, mas não campeiras, apresentam retículo endoplasmático liso bem desenvolvido, complexo de Golgi e muitas mitocôndrias polimórficas espalhadas randomicamente pelo citosol celular, consistente com a natureza lipídica da secreção da glândula (Abdalla & Cruz-Landim, 2004 a,b). Portanto, uma maior concentração proteica nas glândulas de Dufour de operárias nutridoras pode estar relacionada ao potencial reprodutivo que essas abelhas apresentam, uma vez que a glândula de Dufour apresenta ciclo de funcionamento correlacionado ao estado reprodutivo e desenvolvimento do ovário (Cruz-Landim, 2009).

6.2. Proteínas identificadas

6.2.1. Metabolismo proteico

As proteínas identificadas neste estudo referentes ao metabolismo proteico foram up reguladas nas glândulas de Dufour de abelhas nutridoras. As demais proteínas, pertencem, em sua maioria, à superfamília das proteínas do choque térmico (HSPs): proteína do choque térmico (HSP60) (spot 1), proteína do choque térmico (HSP70) (spot 23), proteína do estresse-70 (spot 36), proteína regulada por glicose (spot 37), proteína letal (2) essencial para a vida (HSP20) (spot 62).

As HSPs são proteínas chaperonas expressas na maioria dos organismos. Tipicamente, as HSPs são classificadas de acordo com os seus pesos moleculares em Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 e as pequenas Hsps (sHsps), massa molecular estendendo de 12 a 43 kDa) (Kim et al., 1998; Feder & Hofmann, 1999; Sørensen et al., 2003; Mizrahi et al., 2010).

De uma maneira geral, as HSPs são responsáveis por mediar atividades essenciais para as células tais como o dobramento, a localização e a degradação de proteínas (King & MacRae, 2015) e são abundantemente expressas em insetos, sendo geralmente induzidas e moduladas em resposta a estresses abióticos tais como o calor, o

frio, a radiação ultravioleta, os pesticidas químicos, bem como estresses bióticos causados por vírus, bactérias, fungos e outros insetos (Zhao & Jones, 2012), e também em além da alta densidade populacional de indivíduos na colônia (Wang et al., 2007).

A proteína letal (2) essencial para a vida é uma chaperonina pertencente à família HSP20, do grupo das sHSPs. Estudos com *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) demonstraram que essa chaperonina é expressa durante todo o desenvolvimento destes indivíduos, embora níveis superiores de expressão são alcançados durante o desenvolvimento larval (Kurzik-Dumke & Lohmann, 1995). Em *A. mellifera*, essa proteína foi up regulada no cérebro de operárias campeiras (Kucharski & Maleszka, 2002; Garcia et al., 2009). Garcia et al. (2009), portanto, sugerem que a proteína letal (2) essencial para a vida pode estar de alguma forma envolvida na regulação da idade em abelhas. Estudos adicionais sobre o papel dessa proteína na glândula de Dufour de operárias de *A. mellifera* são necessários.

A proteína dissulfeto-isomerase (PDI) (spot 61) é uma enzima do retículo endoplasmático que catalisa a formação e quebra de ligações dissulfeto entre resíduos de cisteína das proteínas durante o seu dobramento (Wilkinson & Gilbert, 2004; Hatahet & Ruddock, 2009). A PDI é uma proteína multifuncional envolvida no dobramento, montagem e modificações pós-traducionais das proteínas nas quais ela atua (Goo et al., 2002). Essa chaperona parece estar envolvida em outros processos celulares como polimerização dos filamentos de actina, expressão gênica e interações célula-célula (Tabb et al., 1998; Frand et al., 2000).

A subunidade tipo alfa do proteassoma (spot 26), também identificada neste estudo como pertencente ao grupo de proteínas do metabolismo proteico, faz parte de um complexo proteolítico multicatalítico, o proteassoma. Proteínas danificadas ou não necessárias para as células são previamente ubiquitinadas e então, direcionadas para o proteassoma para serem degradadas (Coux et al., 1996).

As proteínas acima estão envolvidas nos processos de síntese de proteínas pelas células e embora os produtos liberados pela glândula de Dufour das abelhas sejam em sua maioria de natureza lipídica (Katzav-Gozansky et al., 1997a,b; Abdalla et al., 2004a), essas proteínas podem estar envolvidas na síntese daquelas envolvidas em rotas metabólicas de produção de hidrocarbonetos, álcoois e ésteres que são comumente identificados na secreção dessa glândula em operárias nutridoras (Katzav-Gozansky et al., 1997b; Katzav-Gozansky et al., 2000; Martin & Jones, 2004; Richard et al., 2011).

6.2.2. Metabolismo de carboidratos

Das proteínas identificadas no grupo de metabolismo de carboidratos que inclui a fosfoglicerato mutase (spot 2), proteína Idgf4 tipo quitinase (spot 14) e enolase (spot 18), as duas primeiras foram observadas apenas nas glândulas de Dufour de campeiras, enquanto a última teve maior abundância nas glândulas de Dufour de nutridoras.

A fosfoglicerato mutase atua na conversão de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato na via glicolítica, que resulta na produção de energia na forma de ATP e NADH, utilizada em vários processos celulares (Boiteux & Hess, 1974, 1981; Nelson & Cox, 2014). A proteína Idgf 4 tipo quitinase pertence a família de fatores de crescimento do disco imaginal (Idgfs), que são estruturalmente relacionada a quitinases, mas ao contrário destas, proteínas Idgf 4 tipo quitinase não possuem atividade hidrolase. As Idgfs são secretadas e transportadas para os tecidos-alvo via hemolinfa (Erban et al., 2014). Em *Drosophila*, em cooperação com insulina, Idgfs estimulam a proliferação, polarização e motilidade das células do disco imaginal (Kawamura et al., 1999). Idgf4 é considerada uma proteína relacionada ao desenvolvimento em larvas de *A. mellifera* (Li et al., 2010a, b).

Enolase é a enzima responsável pela conversão de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato durante a oxidação da glicose (Nelson & Cox, 2014), que é o principal substrato energético para vários tecidos em abelhas (Gmeinbauer & Crailsheim, 1993; Becker et al., 1996; Blatt & Roces, 2001). Em adição à sua essencial função metabólica na glicólise, outros estudos revelaram novos papéis para as enolases na regulação transcricional (Kim & Dang, 2005), como atuação como proteína do choque térmico (Aaronson et al., 1995), e ligação a polinucleotídeos e proteínas do citoesqueleto (Al-Giery & Brewer, 1992). Algumas enolases estão localizadas extracelularmente (Falabella et al. 2009) e está associada com uma proteína de ligação a ácido graxo extracelular na vespa parasita *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) (Falabella et al., 2005).

A maior abundância de proteínas geradoras de energia proveniente do metabolismo de carboidrato nas glândulas de Dufour de operárias campeiras (fosfoglicerato mutase) e nutridoras (enolase) sugere que a glândula de Dufour de ambas operárias participa de processos celulares com alto consumo energético, mostrando que a glândula de Dufour permanece ativa por toda a vida da abelha (Abdalla & Cruz-Landim, 2001b), talvez em grau variável. A proteína Idgf 4 tipo quitinase foi up regulada na hemolinfa de *A. mellifera* e *A. cerana* nos estágios larvais e de pupa (Feng

et al., 2014). O papel desta proteína na glândula de Dufour de campeiras precisa de investigações adicionais.

6.2.3. Metabolismo energético

Proteínas relacionadas ao metabolismo energético como arginina quinase (spot 13), subunidade beta da ATP sintase (spot 56) e ATPase do retículo endoplasmático transicional (spot 10) foram up reguladas nas glândulas de Dufour de nutridoras.

Arginina quinase catalisa a transferência reversível do grupo fosforil do ATP para arginina resultando em uma fosfoarginina, um composto que atua como um reservatório de alta energia na forma de ligação fosfato (Nelson & Cox, 2014). Essas reações regulam os níveis de fosfato inorgânico (que afetam a glicogenólise e o tamponamento de prótons) e o transporte de energia intracelular (Erban et al., 2014). Muitas argininas quinases são encontradas na forma de monômeros com massa molecular relativa de aproximadamente 40 kDa. Mas em casos raros, a forma dimérica dessas proteínas foi observada (van Thoai, 1968; Morrison, 1973). Embora arginina quinase seja considerada uma proteína tipicamente citoplasmática, evidências experimentais baseadas em atividade enzimática e imunofluorescência sugerem a presença da arginina quinase em mitocôndrias de certos artrópodes (Hird & McLean, 1983; Hird & Robin, 1985; Doumen & Ellington, 1990; Ellington & Hines, 1991; Chamberlin, 1997; Pineda & Ellington, 1998). Arginina quinase foi up regulada em adultos de *Apis cerana cerana* quando as mesmas foram submetidas a situação de estresse biótico e abiótico (Chen et al., 2015).

A subunidade beta da ATP sintase é parte de um complexo proteico (ATP sintase) que sintetiza ATP acoplado ao transporte de prótons através da membrana mitocondrial interna (Nelson & Cox, 2014).

A ATPase do retículo endoplasmático transicional (TER ATPase), a despeito de pertencer ao grupo de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, parece desempenhar papéis bem diversos dos descritos para as proteínas acima. Ela pertence à família das AAA ATPase (ATPases associadas com várias atividades), uma grande família de ATPases envolvidas em vários processos celulares (Erdmann et al., 1991), dentre os quais incluem endocitose mediada por receptores, tráfego intracelular de membrana, degradação de proteínas e transporte acoplado (Forgac, 1998; Inoue et al., 2005; Wilkens et al., 2005). A TER ATPase é necessária para a fragmentação das pilhas membranosas do complexo de Golgi durante a mitose e sua remontagem após a mitose

ter se completado, além de estar envolvida na formação do retículo endoplasmático transicional (tER) Wilkens et al., 2005).

Essas enzimas podem estar relacionadas, dentre outras funções, à grande demanda de energia requerida para o transporte de substâncias provenientes da hemolinfa, que medeia trocas químicas entre tecidos e órgãos, além de servir como reservatório de água (Leta et al., 1996; Lavine & Strand, 2002; Hrasnigg et al., 2003; Chan et al., 2006; Burmester & Hankeln, 2007) ou até mesmo o processamento desses produtos pelas células glandulares para a posterior liberação no lúmen da glândula. Análises morfológicas das células que constituem a glândula de Dufour de rainhas e operárias de algumas espécies de abelhas, incluindo *A. mellifera*, sugerem que as mesmas são capazes de captarem substâncias da hemolinfa, como ácidos graxos circulantes (Barrows et al., 1986; Abdalla et al., 1999a,b; Abdalla & Cruz-Landim, 2002, 2001b,c, 2004a,b, 2005; Abdalla, 2002), que podem ser usados como substratos na produção de hidrocarbonetos e ésteres, presentes na secreção da glândula de Dufour desta abelha (Katzav-Gozansky et al., 1997a; Martin & Jones, 2004).

6.2.4. Metabolismo de lipídios

Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídios como proteína de ligação a ácidos graxos (spot 16), fosfolipase A2 (spots 68 e 78) e hidrolase do éster carboxílico (spot 71) foram up reguladas nas glândulas de Dufour de abelhas nutridoras, o que era esperado dada a principal função da glândula de Dufour como sintetizadora de secreções de caráter lipídico como feromônio casta-específico para sinalizar fertilidade (Katzav-Gozansky et al., 1997, 2004; Dor et al., 2005), bem como ativar o comportamento de agressão durante a competição reprodutiva entre operárias (Malka et al., 2008). As nutridoras aqui estudadas apresentavam ovários ativados, indicando um potencial para a produção de ovos.

Proteínas de ligação a ácidos graxos (spot 16) representam um grupo de pequenas proteínas solúveis (14-15 kDa), que podem se ligar de forma reversível e com alta afinidade a ligantes hidrofóbicos tais como ácidos graxos de cadeias longas saturadas ou insaturadas (≥ 14 carbonos) e outras substâncias lipofílicas, incluindo eicosanoides e retinoides (Furuhashi & Hotamisligil, 2008; Goh & Li, 2011). A esta classe de proteínas foi proposta a facilitação e o transporte do ácido graxo de cadeia longa insolúvel no ambiente aquoso do citosol celular (Zimmerman & Veerkamp, 2002; Haunerland & Spener, 2004a; Haunerland & Spener, 2004b; Esteves & Ehrlich, 2006;

Furuhashi & Hotamisligil, 2008), transferindo os ácidos graxos para as membranas celulares e mediando o efeito dos ácidos graxos na expressão gênica em diferentes tecidos (Roat et al., 2014). Proteínas de ligação a ácidos graxos têm sido reportadas no intestino médio de *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) (Smith et al., 1992), um órgão que usualmente processa grandes quantidades de lipídios. Expressão diferencial de proteínas de ligação a ácidos graxos entre castas foi observada por Evans & Wheeler (1999), que demonstraram que essas proteínas são expressas em larvas de operárias, mas não em larvas de rainhas. Mais recentemente, diferenças na expressão de proteínas de ligação a ácidos graxos foram encontradas em estudos do proteoma das antenas de rainhas, operárias e zangões de *Apis* (Fang et al., 2012).

Hidrolases do éster carboxílico, também chamadas de carboxilesterases catalisam a hidrólise de um éster carboxílico gerando como produtos álcool e carboxilato (Krisch, 1971). Elas são capazes de hidrolisar vários xenobióticos e substratos endógenos contendo éster, tioéster e ligações amida, além de atuarem no metabolismo de certas drogas e lipídios endógenos (Sato, 1987).

Katzav-Gozansky et al (2003, 2004) propôs um possível mecanismo para a produção de ésteres, um dos principais componentes químicos que diferenciam a glândula de Dufour de rainhas e operárias de *A. mellifera*. Segundo esses autores os ésteres são formados pela elongação de cadeias de ácidos graxos a grupos acil de cadeia longa, e estes, por sua vez, são modificados a diferentes produtos finais, incluindo redução a álcoois e subsequente esterificação por algumas acil-CoAs de ácidos graxos. Álcool eicosanol, um feromônio de alarme (Pickett et al., 1982; Martin & Jones, 2004) em operárias de *A. mellifera*, é sugerido por Abdalla (2006) como uma substância intermediária da via sintética de éster presente na secreção da glândula de Dufour. Na presença da rainha, esta via é interrompida, e as operárias produzem apenas os precursores dos ésteres, como o eicosanol, mas se as condições forem favoráveis para as operárias (colônia sem rainha), a via sintética de éster prossegue e produz ésteres de álcoois precursores. Isso poderia explicar o aumento da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídios na glândula de Dufour em operárias nutridoras, que são potencialmente produtoras de ovos na ausência da rainha, uma vez que a secreção da glândula de Dufour pode estar relacionada ao estado reprodutivo das abelhas eussociais (Abdalla, 2006). A proteína de ligação a ácidos graxos e a hidrolase do éster carboxílico, pelo menos em parte, podem atuar de forma direta ou indireta nessa via sintética de éster.

Fosfolipases A2 (PLA2) são uma superfamília de enzimas lipolíticas que catalisam a hidrólise da ligação sn-2 acil de glicerofosfolipídio para liberar ácidos graxos livres e lisofosfolipídios (Mingarro et al., 1995, Six & Dennis, 2000). PLA2s desempenham importantes funções nos processos que modulam a liberação de ácido araquidônico e o precursor de eicosanoides de potentes mediadores inflamatórios (Rodriguez de Turco et al., 2002). Adicionalmente, as PLA2s atuam na defesa do hospedeiro, em processos de transdução de sinal e remodelagem da membrana (Murakami & Kudo, 2002; Dennis, 1994, 1997). Em abelhas do gênero *Apis*, PLA2 tem sido reportada como um dos principais componentes do veneno (uma mistura de peptídeos e proteínas), usados pelas abelhas para sua própria defesa e a da colônia (Kuchler et al., 1989; Shen et al., 2002; Li et al., 2005). O papel da PLA2 na glândula de Dufour onde ela foi expressa tanto em nutridoras quanto campeiras ainda não está claro.

6.2.5. Citoesqueleto

As proteínas do citoesqueleto identificadas nesse estudo foram todas da família das actinas (spot 33) com predomínio da Actina-42A (spots 20, 38 e 40), presentes tanto nas glândulas de Dufour de nutridoras quanto de campeiras. Actinas são umas das proteínas mais abundantes e conservadas evolutivamente na maioria dos eucariotos. Elas interagem com um grande número de proteínas, e estão envolvidas numa variedade de processos biológicos, incluindo contração muscular, motilidade celular, divisão celular, movimento de organelas e vesículas, endocitose e sinalização celular (Pollard & Cooper, 2009; Dominguez & Holmes, 2011). Dada a sua abundância e atuação em diversos processos celulares, estas proteínas devem estar relacionadas a diferentes atividades celulares da glândula de Dufour.

6.2.6. Detoxificação

Proteínas associadas à detoxificação e ao estresse oxidativo, que incluem tiorredoxina peroxidase-1 (TPX-1) (spot 32) e glutathione S-transferase (GST) (spots 51 e 70) foram up reguladas nas glândulas de Dufour de nutridoras.

TPXs e GSTs compreendem um grupo de proteínas envolvidas na degradação de substâncias potencialmente danosas para as células, desempenhando papel crucial na manutenção da homeostase redox e na proteção dos organismos contra o acúmulo de moléculas tóxicas como as espécies reativas de oxigênio (ROS) (Yao et al., 2014), detoxificação de compostos endógenos e xenobióticos. Também desempenham funções

no transporte intercelular, biossíntese de hormônios e resistência dos insetos contra inseticidas (Enayati et al., 2005; Konus et al., 2013). Algumas glutathionas são conhecidas em abelhas por terem alta atividade por produtos de peroxidação lipídica (Singh et al., 2001) e foram observadas no músculo do vôo e veneno (Peiren et al., 2008).

O aumento da expressão de proteínas de detoxificação em operárias nutridoras, principalmente de agentes oxidantes, pode ser devido à maior atividade metabólica desta glândula nestas operárias que nas campeiras, pois o metabolismo celular geralmente resulta na produção de espécies reativas de oxigênio que são tóxicas para as células (Alberts et al., 2015).

6.2.7. Homeostase

Ferritina (spot 5) foi up regulada nas glândulas de Dufour de nutridoras. Em insetos, essa proteína é constituída por 12 cadeias leves e 12 cadeias pesadas (21-36 kDa) e apresenta peptídeo sinal, que presumivelmente a conduz para vias secretórias (Pham & Winzerling, 2010), consistente com os dados encontrados neste estudo. As ferritinas compreendem uma família de proteínas que transportam íons ferro, contribuindo para a homeostase desse íon dentro da célula (Zhou et al., 2007). Os íons ferro funcionam como cofatores em vários processos celulares, incluindo síntese de nucleotídeos, metabolismo do oxigênio, ciclo do ácido cítrico, produção de esteroides e aminoácidos nas células (Andrews, 2008), bem como significativo papel na resposta imune (Paskewitz & Shi, 2005; Altincicek et al., 2008). Assim, a maior expressão nas operárias nutridoras indica uma maior atividade das células nestas abelhas que nas campeiras.

6.2.8. Proteína constitutiva

As anexinas (spot 27) pertencem a uma grande família de proteínas de ligação a fosfolipídios de maneira cálcio-dependente (Gerke & Moss, 2002). Elas interagem com vários componentes da membrana celular que estão envolvidos em vários processos celulares como organização estrutural da célula, sinalização intracelular, modulação de enzimas e fluxo de íons, controle do crescimento, e podem ainda atuar como canais de cálcio atípicos (Moss & Morgan, 2004). Elas foram reportadas em *D. melanogaster* desempenhando importante papel durante o desenvolvimento embrionário desse inseto (Konsolaki & Schupbach, 1998; Bejarano et al., 2008). No entanto, a presença de

anexinas na glândula de Dufour de operárias nutridoras de *A. mellifera*, com maior abundância, sugere a participação destas proteínas em outras funções metabólicas relativas à atividade da glândula.

6.2.9. Comunicação celular

Proteína de ligação ao odorante OBP-13 (spot 28) pertence a uma classe de proteínas de ligação ao odorante (OBPs) que desempenha importante papel na comunicação química entre abelhas. Essa proteína foi up regulada na glândula de Dufour de operárias nutridoras. O genoma de *A. mellifera* compreende 21 OBPs (OBP 1-21) (Foret & Maleszka, 2006; Schwaighofer et al., 2014) que são moléculas pequenas e solúveis em água, capazes de se ligar de forma reversível a moléculas mensageiras tais como odorantes e feromônios, que são geralmente moléculas hidrofóbicas e de baixa solubilidade (Horst et al., 2001; Pelosi et al., 2005). Embora as OBPs sejam comumente expressas em órgãos sensoriais dos insetos como as sensilas gustatórias e olfatórias (Pelosi et al., 2005), estudos com *A. mellifera* demonstraram a presença de OBPs em antenas, ovários, cérebro, cutícula (Forêt & Maleszka, 2006), glândula mandibular (Iovinella et al., 2011), hemolinfa (Eban et al., 2014) e cabeça de pupa (Zheng et al., 2011) e na glândula salivar da cabeça de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Elias-Santos et al., 2013). As OBPs podem estar envolvidas em diversas funções fisiológicas, sequestrando ou liberando mensageiros químicos, feromônios, dependendo do estado fisiológico e comportamento das abelhas e sua maior expressão nas operárias nutridoras pode estar associada à maior produção de feromônios pela glândula de Dufour nestas abelhas.

6.2.10. Alergênica

Uma intrigante proteína identificada neste estudo foi a fosfatase ácida do veneno Acph-1. Esta proteína foi caracterizada como um componente do veneno em abelhas (Peiren et al., 2005, 2008; de Abreu et al., 2010; Kim & Jin, 2014) e pertence a um grupo de enzimas que hidrolisam fosfomonoésteres em pH ácido. A Acph-1 atua como um potente alérgeno, desencadeando fortes reações em humanos (Hoffman, 1977; Barboni et al., 1987; Grunwald et al., 2006). A presença dessa proteína na glândula de Dufour de operárias campeiras poderia sugerir alguma contaminação a partir da glândula de veneno. Entretanto durante a retirada das glândulas de Dufour não

ocorreram rupturas dos reservatórios das glândulas de veneno. Assim, esta proteína talvez atue em outros processos celulares nestas abelhas.

6.3. Interações proteína-proteína

A maior parte das proteínas identificadas nas glândulas de Dufour de operárias de *A. mellifera* e que foram up reguladas exibiu uma intrincada rede de interações funcionais entre si sugerindo que essas proteínas podem estar associadas direta ou indiretamente, participando de uma mesma via de sinalização ou processos celulares.

As proteínas relacionadas ao metabolismo proteico também interagiram com praticamente todas as proteínas da rede de interação, mas interações entre elas reforçam a função dessas proteínas nos processos de dobramento, localização e degradação de proteínas (Goo et al., 2002; King & MacRae, 2015)

As proteínas que não apresentaram nenhuma interação funcional com as proteínas foram submetidas individualmente a análises de interação.

A proteína anexina (LOC409533), por sua vez, interagiu com as proteínas do choque térmico 90 (Hsp 90), proteína chaperona que atua prevenindo a agregação de proteínas desnaturadas, assistindo o dobramento correto de proteínas recém-sintetizadas, e guiando proteínas dobradas incorretamente à degradação mediada pelo proteossoma (Iwama et al., 1998). Hsp90 tem como principais alvos receptores de hormônios esteróides, quinases de vias de sinalização e vários fatores de transcrição (Young et al., 2001). Além do mais, Hsp90 atua na regulação da transdução de sinal, controle do ciclo celular, apoptose e resposta imune (Whitesell & Lindquist, 2005). Outra interação funcional da anexina acontece com N-miristoil transferase (Nmt), que promove miristoilação da proteína alvo, processo que consiste no ancoramento de ácidos graxos saturados de 14 carbonos (ácido mirístico) ao N-terminal de resíduos de glicina da proteína (Farazi et al., 2001; Martin et al., 2011). Proteínas miristoiladas desempenham papel importante em várias vias de transdução de sinal, tais como proteínas quinases, fosfatases, proteínas de ligação ao nucleotídeo guanina, e proteínas regulatórias do citoesqueleto (Wright et al., 2010). Anexina também interage funcionalmente com Abstrakt helicase de RNA dependente de ATP (abs), que é membro de uma família de ATPases dependente de RNA chamada proteínas DEAD-box (Irion et al., 2004), que regulam aspectos da polaridade celular em ovócitos e embriões de *Drosophila* (Irion & Leptin, 1999; Irion et al., 2004). Por fim, a anexina interage funcionalmente com proteínas da família das caspases (LOC412235, LOC411381 e LOC410394), que atuam

nos processos de morte celular programada por apoptose. Em organismos multicelulares, apoptose é um mecanismo essencial requerido para remodelar tecidos e eliminar células indesejáveis durante o desenvolvimento e/ou células contendo patógenos intracelulares ou células com DNA danificado bem como células que estão proliferando inapropriadamente (Benedict et al., 2002; Teodoro & Branton, 1997).

Arginina quinase (Argk) exibe interações funcionais particularmente fortes com uma proteína homóloga da peptidase B caseinolítica (caseinolytic peptidase B protein homolog) (GB10557-PA), uma chaperona pertencente a uma família de ATPases associadas a várias atividades celular, que inclui controle de qualidade da proteína, fusão de membrana e replicação de DNA (Fernández-Higuero et al., 2011) e com myogenic-determination protein nautilus (nau), proteína envolvida na formação do músculo embrionário em *Drosophila* (Misquitta & Paterson, 1999). Interações de arginina quinase (Argk) com N-miristoil transferase (Nmt), que também exibiu interação com a anexina, descrita previamente, também foi observada neste estudo. RNA polimerase dependente de DNA (RpII215), um complexo enzimático contendo múltiplas subunidades (Chambon, 1975), é análoga a polimerases de outros eucariotos em suas propriedades enzimáticas e estruturais (Greenleaf, 1975).

Glutathione S-transferase (GST) (LOC552283) interagiu fortemente com a proteína JNK MAP kinase basket (bsk), que induz apoptose na asa e tecidos neurais em *Drosophila* (Terashima & Bownes, 2005). Interações menos intensas foram realizadas com as demais proteínas como aquelas responsáveis pela detoxificação celular, glutathione S-transferase Z1 (GstZ1) e glutathione S-transferase T1 (GstT1), e as proteínas ypsilon schachtel (yps) e 3-oxoácido CoA-transferase (LOC409157). As GSTs têm sido bastante estudadas em insetos, em parte pelo envolvimento dessas proteínas na detoxificação de uma variedade de compostos endógenos e exógenos danosos para a célula, tais como produtos de peroxidação de lipídios, metabólitos secundários de plantas e inseticidas (Després et al., 2007; Enayati et al., 2005; Hemingway & Ranson, 2000). Ypsilon schachtel (yps), produto do gene yps (Thieringer et al., 1997; Wilhelm et al., 2000), pertence à família de proteínas Y-box que são proteínas de ligação a ácidos nucleicos (Graumann & Marahiel, 1998; Matsumoto & Wolffe, 1998). Todos os membros desta família têm um domínio de ligação a ácidos nucleicos e um domínio de choque frio (Schindelin et al., 1993; Schindelin et al., 1994; Schroder et al., 1995). A proteína YPS parece regular a localização de RNA subcelular em ovários de *Drosophila* (Wilhelm et al., 2000).

A proteína de ligação a ácidos graxos (GB15299-PA) apresenta interações funcionais com Paired box gene 6 (GB12355-PB), fator de transcrição homólogo a HNF-4 (LOC725032), proteína dedo de zinco associada a O/E (Oaz) e seven up (SVP). Paired box gene 6 são membros de uma família de fatores de transcrição (família Pax) que desempenham papel crucial em processos de desenvolvimento, tais como a morfogênese do olho e desenvolvimento neural, organogênese e segmentação em *Drosophila* (Halder et al., 1995). O fator de transcrição homólogo a HNF-4 é membro de uma superfamília de receptores de hormônios esteróides (Costa et al., 1989; Sladek et al., 1990; Mietus-Snyder et al., 1992). Em embriões de *Drosophila* em desenvolvimento, HNF4 é expressa no intestino médio, corpo gorduroso e túbulos de Malpighi, suportando o papel essencial de HNF-4 na formação inicial do intestino e na organogênese (Zhong et al. 1993). A família de proteínas dedo de zinco associada a O/E (Oaz), é parte de uma superfamília de fatores de transcrição, dedo de zinco tipo C2H2 (ZF) (Blitz & Cho, 2009). Esta proteína atua no desenvolvimento do espiráculo posterior, um órgão modelo na investigação das bases genéticas da morfogênese (Krattinger et al. 2007). A proteína seven up (SVP) é um fator de transcrição que participa, em *Drosophila*, do controle da proliferação celular nos túbulos de Malpighi (Kerber et al. 1998) e inibe a transcrição dependente de ecdsona (Zelhof et al. 1995).

A proteína fosfatase ácida do veneno Acph-1 (Acph-1) exibiu interações funcionais com proteína tipo fosfatase fosfotirosina de baixa massa molecular (LOC727300), que assim como a Acph-1 também apresenta atividade de fosfatase ácida. Essa enzima catalisa a hidrólise de grupos fosfatos de resíduos de fosfotirosina, resultando em tirosina e ortofosfatos. Esta enzima foi reportada em alguns agentes infecciosos que acometem alguns insetos, atuando em processos que permitem que a partícula infecciosa escape da resposta imune do inseto (Ahmed et al., 2008; Wang et al., 2016). Acph-1 também exibiu interação funcional com a fosfoglicomutase 1 (Pgm1), uma enzima que catalisa a interconversão bidirecional de glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato (G-6-P) via um intermediário glicose-1,6-bifosfato, uma enzima essencial tanto para a glicogenólise quanto para a glicogênese (Marchler-Bauer et al., 2013). Em insetos, G-6-P pode entrar na via glicolítica ou na via de síntese da trealose, açúcar presente na hemolinfa (Meyer-Fernandes et al., 2001) ou pode ser usada na síntese de quitina (Muthukrishnan et al., 2012).

A fosfoglicerato mutase (LOC552736) exibiu interações funcionais bastante fortes com a fosfoglicerato quinase (Pgk), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (Gapdh),

triosefosfato isomerase (Tpi), glicose-6-fosfato isomerase (LOC551154), condizente com o papel essencial destas enzimas na via glicolítica (Nelson & Cox, 2014). Em adição, a fosfoglicerato mutase também interagiu funcionalmente com a histona H4 (LOC411541), proteína pertencente ao octâmero de histonas que formam o nucleossomo que constitui a cromatina (Alberts et al., 2015).

A proteína Idgf4 tipo quitinase (LOC413324) exibiu interações funcionais com as proteínas de ligação a FK506 (FK506-bp1e GB12767-PA). Estas proteínas são receptores intracelulares do imunossupressor FK506 e possuem um domínio peptidil prolil cis-trans isomerase (PPIase) N-terminal, sendo altamente conservadas evolutivamente (Golbik et al., 2005). O papel destas proteínas em insetos ainda não está claro. Idgf4 tipo quitinase também exibiu interação com a enolase K01689, proteína essencial nas vias glicolíticas e gliconeogênicas (Nelson & Cox, 2014).

A composição química da secreção da glândula de Dufour foi identificada principalmente por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa, como sendo composta por hidrocarbonetos de cadeia longa saturados ou insaturados, embora outros compostos também possam ocorrer nesta glândula (Vinson et al., 1978; Duffield et al., 1984; Kronenberg & Hefetz, 1984; Hefetz, 1987; Syvertsen et al., 1995; Katzav-Gozansky et al., 1997; Sledge et al., 2000; Abdalla et al., 2004; Amsalem et al., 2009; Cardinal et al., 2010; Mitra et al., 2011; Bonckaert et al., 2012). As principais enzimas para a biossíntese de hidrocarbonetos são ácido graxo sintases, elongases, desaturases, redutases e P450 descarboxilase (Blomquist et al., 2012). Em *A. mellifera* há seis genes para desaturases e 10 para elongases, sendo que alguns deles têm sido diferencialmente expressos em operárias nutridoras e campeiras (Falcón et al., 2014). Entretanto, estas enzimas do metabolismo de hidrocarbonetos não foram identificadas neste estudo, talvez porque houve falhas em detectar formas pequenas de proteínas usando MALDI-TOF/TOF ou também porque foram analisados apenas aqueles spots com diferença significativa na eletroforese bidimensional, sendo que estas enzimas podem ter o mesmo nível de expressão nas glândulas de Dufour de operárias nutridoras e campeiras. Este resultado sugere a necessidade de mais estudos para identificar a biblioteca completa de proteínas da glândula de Dufour de *A. mellifera*.

7- CONCLUSÃO

Neste estudo foi comparado o perfil proteico das glândulas de Dufour de operárias nutridoras e campeiras de *A. mellifera*. A composição proteica da glândula variou entre as operárias. Um total de 28 proteínas foi identificado sendo que 21 delas foram mais abundantes em nutridoras e sete, em campeiras. As proteínas identificadas foram categorizadas em diferentes grupos funcionais, incluindo aquelas envolvidas nos metabolismos proteico, energético, lipídico e de carboidratos, nos processos de detoxificação, na homeostase, na comunicação celular, no citoesqueleto, proteínas constitutivas e alergênicas. Os dados obtidos destacam a plasticidade funcional da glândula de Dufour em operárias de diferentes idades e funções.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaronson, R.M.; Graven, K.K.; Tucci, M.; McDonald, R.J.; Farber, H.W. 1995. Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein. *Journal of Biological Chemistry* 270: 27752–27757.
- Abdalla, F.C.; Velthuis, H.; Cruz-Landim, C.; Duchateau, M.J. 1999a. Changes in the morphology and ultrastructure of the Dufour's gland during the life cycle of the bumble bee queen, *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Bombini). *Netherlands Journal of Zoology* 49: 251–261.
- Abdalla, F.C.; Velthuis, H.; Duchateau, M.J.; Cruz-Landim, C. 1999b. Secretory cycle of the Dufour's gland in workers of bumble bee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Bombini). *Netherlands Journal of Zoology* 49: 139–156.
- Abdalla, F.C.; Cruz-Landim, C.. 2001a. Size differences in the Dufour gland of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) between and within the female castes. *Revista Brasileira de Zoologia* 18: 119–123.
- Abdalla, F.C.; Cruz-Landim, C. 2001b. Changes in the morphology of the Dufour gland of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) during the life stages of the female castes. *Revista Brasileira de Entomologia* 45: 123–129.
- Abdalla, F.C.; Cruz-Landim, C. 2001c. Dufour gland in the Hymenoptera (Apidae, Formicidae, Vespidae): a review. *Revista Brasileira de Biologia* 61: 95–106.
- Abdalla, F.C.; Jones, G.R.; Morgan, D.; Cruz-Landim, C. 2004. Chemical composition of the Dufour gland secretion in queens of *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Meliponini). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 15: 621–625.
- Abdalla, F.C.; Cruz-Landim, C. 2002. Mudanças morfofuncionais e dinâmica do ciclo secretor da glândula de Dufour das abelhas eussociais (*Apis mellifera*, *Bombus terrestris*, *Melipona bicolor*): Um exemplo da plasticidade das células glandulares dos insetos, p. 45–49. In: Bauer, M. E. & E. A. Jecke-Neto (eds.). *Avanços em biologia celular*, EDIPUC-RS, Porto Alegre, 231 p.
- Abdalla, F.C. 2002. Glândula de Dufour, p. 127–149. In: Cruz-Landim, C. & F. C. Abdalla (eds.). *Glândulas exócrinas das abelhas*, FUNPEC-RP, Ribeirão Preto, 181 p.
- Abdalla, F.C.; Cruz-Landim, C. 2004a. A comparative cytochemical study of the Dufour gland in the eusocial bees *Apis mellifera* Linné, 1758 and *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836. *Acta Histochemica et Cytochemica* 37: 65–71.

- Abdalla, F.C.; Cruz-Landim, C. 2004b. Occurrence, morphology and ultrastructure of the Dufour gland in *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Meliponini). *Revista Brasileira de Entomologia* 48: 1–19.
- Abdalla, F.C.; Cruz-Landim, C. 2005. Ocorrência, morfologia e ultra-estrutura da glândula de Dufour de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Meliponini). *Neotropical Entomology* 34: 47–57.
- Abdalla, F.C. 2006. Morphological, chemical and developmental aspects of the Dufour gland in some eusocial bees (Hymenoptera: Apidae): a review. *Revista Brasileira de Entomologia* 50: 153-162.
- de Abreu, R.M.M.; de Moraes, R.L.M.S.; Camargo-Mathias, M.I. 2010. Biochemical and cytochemical studies of the enzymatic activity of the venom glands of workers of honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Micron* 41: 172–175.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M., Roberts, K.; Walter, P. 2015. *Molecular Biology of the Cell*. 6ª Edição. Garland Science, New York.
- Al-Giery, A.G.; Brewer, J.M. 1992. Characterization of the interaction of yeast enolase with polynucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1159: 134-140.
- Altincicek, B.; Knorr, E.; Vilcinskis, A. 2008. Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Developmental & Comparative Immunology* 32: 585–595.
- Amsalem, E.; Twele, R.; Francke, W.; Hefetz, A. 2009. Reproductive competition in the bumblebee *Bombus terrestris*: do workers advertise sterility? *Proceedings of the Royal Society of London B* 276: 1295–1304.
- Amsalem, E.; Hefetz, A. 2010. The appeasement effect of sterility signaling in dominance contests among *Bombus terrestris* workers. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64: 1685–1694.
- Andrews, N.C. 2008. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* 112: 219–230.
- Arakane, Y.; Muthukrishnan, S. 2009. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 201-216.
- Ascher, J.S.; Pickering, J. 2012. *Discover life: bee species guide and world checklist* (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila).
http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species&flags=HAS

- Ayasse, M.; Birnbaum, J.; Tengö, J.; van Doorn, A.; Taghizadeh, T.; Francke, W. 1999. Caste and colony specific chemical signals on eggs of the bumble bee, *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). *Chemoecology* 9: 119–126.
- Baer, B.; Zareie, R.; Paynter, E.; Poland, V.; Millar, A.H. 2012. Seminal fluid proteins differ in abundance between genetic lineages of honeybees. *Journal of Proteomics* 75: 5646-5653.
- Barboni, E.; Kemeny, D.M.; Campos, S.; Vernon, C.A. 1987. The purification of acid phosphatase from honeybee venom (*Apis mellifera*). *Toxicon* 25: 1097-1103.
- Barrows, E.M.; Chapman, G.B.; Zenel, J. E.; Blake, A.S. 1986. Ultrastructure of Dufour's glands in active and inactive horn-faced bees, *Osmia cornifrons* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 59: 480-493.
- Becker A, Schlöder P, Steele JE, Wegener G. 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* 52: 433-439.
- Bejarano, F.; Luque, C.M.; Herranz, H.; Sorrosal, G.; Rafel, N.; Pham, T.T.; Milan, M. 2008. A gain-offunction suppressor screen for genes involved in dorsal–ventral boundary formation in the *Drosophila* wing. *Genetics* 178: 307-323.
- Benedict, C.A.; Norris, P.S.; Ware, C.F. 2002. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nature Immunology* 3:1013–1018.
- Billen, J.P.J. 1987. New structural aspects of the Dufour's gland and venom gland in social insects. *Naturwissenschaften* 74: 340-341.
- Billen, J. 1986. Morphology and ultrastructure of the Dufour's and venom gland in the ant, *Myrmica rubra* (L.) (Hymenoptera: Formicidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 15: 13–25.
- Blatt, J.; Roces, F. 2001. Hemolymph sugar levels in foraging honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on metabolic rate and in vivo measurement of maximal rates of trehalose synthesis. *Journal Experimental Biology* 204: 2709-2716.
- Blitz, I.L.; Cho, K.W. 2009. Finding Partners: How BMPs Select Their Targets. *Developmental Dynamics* 238:1321–1331
- Bonckaert, W.; Drijfout, F.P.; D'Ettorre, P.; Billen, J.; Wenseelers, T. 2012. Hydrocarbon signatures of egg maternity, caste membership and reproductive status in the common wasp. *Journal of Chemical Ecology* 38: 42–51.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Blomquist, G.J.; Jurenka, R.; Schal, C.; Tittiger, C. 2012. Pheromone production: biochemistry and molecular biology; Gilbert LI, editor: Elsevier Academic Press.
- Boiteux, A.; Hess, B. 1974. Kinetics of glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase from yeast. Abstracts, 9th FEB S Meeting, Budapest, s2ai, 36.
- Boiteux, A.; Hess, B. 1981. Design of glycolysis. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences* 293: 5-22.
- Burmester, T.; Hankeln, T. 2007. The respiratory proteins of insects. *Journal of Insect Physiology* 53: 285–294.
- Calderone, N.W. 2012. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992-2009. *PLoS ONE* 7: 1-27.
- Cardinal, S.; Straka, J.; Danforth, B. 2010. Comprehensive phylogeny of apid bees reveals the evolutionary origins and antiquity of cleptoparasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 16207–16211.
- Cardoen, D.; Ernst, U.R.; Boerjan, B.; Bogaerts, A.; Formesyn, E.; Graaf, D.C.; Wenseleers, T.; Schoofs, L.; Verleyen, P. 2012. Worker Honeybee Sterility: A Proteomic Analysis of Suppressed Ovary Activation. *Journal of Proteome Research* 11: 2838-2850.
- Chamberlin, M. 1997. Mitochondrial arginine kinase in the midgut of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*). *Journal of Experimental Biology* 200: 2789–2796.
- Chambon, P. 1975. Eucaryotic nuclear RNA polymerases. *Annual Review of Biochemistry* 44:613-638.
- Chan, Q.W.T.; Howes, C.G.; Foster, L.J. 2006. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. *Molecular & Cellular Proteomics* 5: 2252–2262.
- Chapman, R.F., 2013. *The Insects: Structure and Function*, 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge, 929p.
- Costa, R.H.; Grayson, D.R.; Jr, D.J.E. 1989. Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Molecular and Cellular Biology* 9: 1415-1425.

- Coux, O.; Tanaka, K.; Goldberg, A.L. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual Review of Biochemistry* 65: 801–847.
- Cruz-Landim, C. 2009. *Abelhas: Morfologia e função de sistemas*. Editora UNESP, São Paulo.
- Cruz-Landim, C. 1996. Glândulas tegumentares abdominais de abelhas. Ocorrência e ultra-estrutura. *Anais do Encontro sobre Abelhas, 2, Ribeirão Preto, SP*, pp. 67-75.
- Danforth, B.N.; Cardinal, S.; Praz, C.; Almeida, E.A.B.; Michez, D. 2013. The Impact of Molecular Data on Our Understanding of Bee Phylogeny and Evolution. *Annual Review of Entomology* 58:57–78.
- Dennis, E.A. 1994. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A2. *Journal of Biochemistry* 269: 13057-13060.
- Dennis, E.A. 1997. A growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* 22:1-2.
- Despres, L.; David, J.P.; Gallet, C. 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution* 22: 298–307.
- Diniz-Filho, J.A.F. & Malaspina, O. 1995. Evolution and population structure of Africanized honey bee in Brazil: Evidence from spatial analysis of morphometrical data. *Evolution* 49:1172- 1179.
- Dominguez, R.; Holmes, K.C. 2011. Actin structure and function. *Annual Review of Biophysics* 40: 169-186.
- Dor, R.; Katzav-Gozansky, T.; Hefetz, A. 2005. Dufour's gland pheromone as a reliable fertility signal among honeybee (*Apis mellifera*) workers. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 58: 270–276.
- Doumen, C.; Ellington, W.R. 1990. Mitochondrial arginine kinase from the heart of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Journal of Comparative Physiology B* 160: 449– 457.
- Duffield, R.M.; Wheeler, J.W.; Eickwort, G.C. 1984. Sociochemicals of bees. In: Bell WJ, Cared RT (Eds) *Chemical Ecology of Insects*. Chapman and Hall, London, 387–328.
- Elias-Santos, D.; Fialho, M.C.Q.; Vitorino, R.; Oliveira, L.L.; Zanuncio, J.C.; Serrão J. E. 2013. Proteome of the head and thorax salivary glands in the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Apidologie* 44:684-698.

- Ellington, W.R.; Hines, A.C. 1991. Mitochondrial activities of phosphagen kinases are not widely distributed in the invertebrates. *Biological bulletin* 180: 505– 507.
- Enayati, A.A.; Ranson, H.; Hemingway, J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* 14: 3–8.
- Erban, T.; Petrova, D.; Harant, K.; Jedelsky, P.L.; Titera, D. 2014. Two-dimensional gel proteome analysis of honeybee, *Apis mellifera*, worker red-eye pupa hemolymph. *Apidologie* 45:53–72.
- Erdmann, R.; Wiebel, F.F.; Flessau, A.; Rykta, J.; Beyer, A.; Froëhlich, K.U.; Kunau, W. H. 1991. PAS1, a yeast required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases. *Cell* 64: 499-510.
- Esteves, A.; Ehrlich, R. 2006. Invertebrate intracellular fatty acid-binding proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 142: 262-274.
- Evans, J.D.; Wheeler, D.E. 1999. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5575–5580.
- Evans, J.D.; Wheeler, D.E. 2001. Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. *Bioessays* 23: 62–68.
- Falabella, P.; Perugino, G.; Caccialupi, P.; Riviello, L.; Varricchio, P.; Tranfaglia, A.; Rossi, M.; Malva, C.; Graziani, F.; Moracci, M.; Pennacchio, F. 2005. A novel fatty acid binding protein produced by teratocytes of the aphid parasitoid *Aphidius ervi*. *Insect Molecular Biology* 14: 195–205.
- Falabella, P.; Riviello, L.; De Stradis, M.L.; Stigliano, C.; Varricchio, P.; Grimaldi, A.; de Eguileor, M.; Graziani, F.; Gigliotti, S.; Pennacchio, F. 2009. *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 801–813.
- Falcon, T.; Ferreira-Caliman, M. J.; Nunes, F. M.F.; Tanaka, E. D.; do Nascimento, F.S.; Bitondi, M.M.G. 2014. Exoskeleton formation in *Apis mellifera*: Cuticular hydrocarbons profiles and expression of desaturase and elongase genes during pupal and adult development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 50: 68-81.
- Fang, Y.; Song, F.F.; Zhang, L.; Aleku, D.W.; Han, B.; Feng, M.; Li, J.K. 2012. Differential antennal proteome comparison of adult honeybee drone, worker and queen (*Apis mellifera* L.). *Journal of Proteomics* 75: 756–773.

- Fang, Y.; Li, J.K. 2010. Analysis of Developmental Proteome at Egg Stage of Drone Honeybees (*A. m. ligustica*). *Agricultural Sciences in China* 9: 392-400.
- Feder, M.E.; Hofmann, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* 61:243–282.
- Farazi, T.A.; Waksman, G.; Gordon, J.I. 2001. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *Journal of Biological Chemistry* 276: 39501-39504.
- Feng, M., Ramadan, H., Han, B., Fang, Y., Li, J.K. 2014. Hemolymph proteome changes during worker brood development match the biological divergences between western honey bees (*Apis mellifera*) and eastern honey bees (*Apis cerana*). *BMC Genomics* 15: 563.
- Feng, M.; Fang, Y.; Han, B.; Zhang, L.; Lu, X.; Li, J. 2013. Novel aspects of understanding molecular working mechanisms of salivary glands of worker honeybees (*Apis mellifera*) investigated by proteomics and phosphoproteomics. *Journal of Proteomics* 87: 1-15.
- Fernández-Higuero, J.Á.; Acebrón, S.P.; Taneva, S.G.; del Castillo, U.; Moro, F.; Muga, A. 2011. Allosteric communication between the nucleotide binding domains of caseinolytic peptidase B. *Journal of Biological Chemistry* 286: 25547-25555.
- Forêt, S.; Maleszka, R. 2006. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Research* 16: 1404-1413.
- Forgac, M. 1998. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *FEBS Letters* 440: 258–263.
- Fortunato, A.; Turillazzi, S. 2012. Dufour's gland possible role in the evolution of sting morphology and function in hover wasps (Hymenoptera: Stenogastrinae). *Arthropod Structure & Development* 41: 259-264.
- Frand, A.R.; Cuzzo, J.W.; Kaiser, C.A. 2000. Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends in Cell Biology* 10: 203–210.
- Frankie, G.W.; Vinson, S.B. 1977. Scent marking of passion flowers in Texas by female *Xylocopa virginica texana* (Hymenoptera: Anthophoridae). *Journal of Kansas Entomological Society* 50: 613–625.
- Free, J.B. 1993. *Insect pollination of crops*. San Diego: Academic Press. 544 p.

- Fujita, T.; Kozuka-Hata, H.; Uno, Y.; Nishikori, K.; Morioka, M.; Oyama, M.; Kubo, T. 2010. Functional analysis of the honeybee (*Apis mellifera* L.) salivary system using proteomics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397: 740–744.
- Furuhashi, M.; Hotamisligil, G.S. 2008. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery* 7: 489-503.
- Garcia, L.; Garcia, C.H.S.; Calábria, L.K.; Costa Nunes da Cruz, G.; Puentes, A.S.; Bão, S.N.; Fontes, W.; Ricart, C. A.O.; Espindola, F.S.; Valle de Sousa, M. 2009. Proteomic Analysis of Honey Bee Brain upon Ontogenetic and Behavioral Development. *Journal of Proteome Research* 8: 1464–1473.
- Garcia, R.C.; Couto, R.H.N. 2005. Produção de geléia real por abelhas *Apis mellifera* italianas, africanizadas e descendentes de seus cruzamentos. *Acta Scientiarum, Animal Sciences* 27:17- 22.
- Garibaldi et al. 2016. Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. *Science* 22: 388-391.
- Gerke, V.; Moss, S. 2002. Annexins: form structure to function. *Physiological Reviews* 82: 331-371.
- Gmeinbauer, R.; Craisheim, C. 1993. Glucose utilization during flight of honeybee (*Apis mellifera*) workers, drone and queens. *Journal of Insect Physiology* 39: 959-967.
- Goh, K.S.; Li, C.W. 2011. A Photocytes-Associated Fatty Acid-Binding Protein from the Light Organ of Adult Taiwanese Firefly, *Luciola cerata*. *PLoS ONE* 6: 1-8.
- Golbik R, Yu C, Weyher-Stingl E, Huber R, Moroder L, Budisa N, Schiene-Fischer C. 2005. Peptidyl prolyl cis/trans-isomerases: comparative reactivities of cyclophilins, FK506-binding proteins, and parvulins with fluorinated oligopeptide and protein substrates. *Biochemistry* 44:16026–16034.
- Goo, T.W.; Yun, E.Y.; Hwang, J.S.; Kang, S.W.; Park, S.; You, K.H.; Kwon, O.Y. 2002. Molecular characterization of a *Bombyx mori* protein disulfide isomerase (bPDI). *Cell Stress & Chaperones* 7: 118–125.
- Goulet, H.; Huber, J.T. 1993. Hymenoptera of the world: a guide to identification of families. Agriculture Canada, 668 pp.
- Graumann, P.L.; Marahiel, M.A. 1998. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends in Biochemical Sciences* 23: 286-290.

- Greenleaf, A.L.; Bautz, E.K.F. 1975. RNA Polymerase B from *Drosophila melanogaster* Larvae Purification and Partial Characterization. *European Journal of Biochemistry* 60: 169–179.
- Grimaldi, D.; Engel, M.S. 2006. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Grunwald, T.; Bockisch, B.; Spillner, E.; Ring, J.; Bredehorst, R.; Ollert, M.W. 2006. Molecular cloning and expression in insect cells of honeybee venom allergen acid phosphatase (Api m 3). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 17: 848-854.
- Halder, G.; Callaerts, P.; Gehring, W.J. 1995. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* 267: 1788–1792.
- Hanson, P.E.; Gauld, I.D. 1995. *The Hymenoptera of Costa Rica*. Oxford: Oxford University Press, 893 pp.
- Hatahet, F.; Ruddock, L.W. 2009. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2807–2850.
- Hauerland, N.H.; Spener, F. 2004a. Fatty acid-binding proteins-insights from genetic manipulations. *Progress in Lipid Research* 43: 328-349.
- Hauerland, N.H.; Spener, F. 2004b. Properties and physiological significance of fatty acid-binding proteins. *Advances in Molecular and Cell Biology* 33: 99-122.
- Hefetz, A. 1987. The role of Dufour's gland secretion in bees. *Physiological Entomology* 12: 243–253.
- Hemingway, J.; Ranson, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* 45: 371–391.
- Herb, B.R.; Wolschin, F.; Hansen, K.D.; Aryee, M.J.; Langmead, B.; Irizarry, R.; Amdam, G.V.; Feinberg, A.P. 2012. Reversible switching between epigenetic states in honeybee behavioral subcastes. *Nature neuroscience* 15: 1371-1375.
- Hird, F.J.R.; McLean, R.M. 1983. Synthesis of phosphocreatine and phosphoarginine by mitochondria from various sources. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part B* 76: 41–46.
- Hird, F.J.R.; Robin, Y. 1985. Studies on phosphagen synthesis by mitochondrial preparations. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B* 80: 517–520.
- Hoffman, D.R. 1977. Allergens in bee venom III: identification of allergen B as an acid phosphatase. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 59: 364-366.

- Hölldobler, B.; Wilson, E.O. 2009. The super-organism: The beauty, elegance, and strangeness of insect societies. NY: Norton.
- Horst, R.; Damberger, F.; Luginbuhl, P.; Guntert, P.; Peng, G.; Nikonova, L.; Leal, W.S.; Wuthrich, K. 2001. NMR structure reveals intramolecular regulation mechanism for pheromone binding and release. PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences USA 98: 14374-14379.
- Hrassnigg, N.; Leonhard, B.; Crailsheim, K. 2003. Free amino acids in the haemolymph of honey bee queens (*Apis mellifera* L.). Amino Acids 24: 205–212.
- Huang, Z.Y.; Robinson, G.E. 1992. Honeybee colony integration: Worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 89: 11726–11729.
- Huang, Z.Y.; Robinson, G.E. 1996. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. Behavioral Ecology and Sociobiology 39: 147–158.
- Hunter T. 2000. Signaling–2000 and beyond. Cell 100:113–27.
- Ibrahim, A.M.A.; Kim, Y. 2008. Transient expression of protein tyrosine phosphatases encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus inhibits insect cellular immune responses. Naturwissenschaften 95:25–32.
- Inoue, T.; Wang, Y.; Jefferies, K.; Qi, J.; Hinton, A.; Forgac, M. 2005. Structure and regulation of the V-ATPases. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 37: 393–398.
- Iovinella, I.; Dani, F.R.; Niccolini, A.; Sagona, S.; Michelucci, E.; Gazzano, A.; Turillazzi, S.; Felicioi, A.; Pelosi, P. 2011. Differential expression of odorant-binding proteins in the mandibular glands of the honey bee according to caste and age. Journal of Proteome Research 10: 3439-3449.
- Irion, U.; Leptin, M. 1999. Developmental and cell biological functions of the *Drosophila* DEAD-box protein Abstrakt. Current Biology 9: 1373–1381.
- Irion, U.; Leptin, M.; Siller, K.; Fuerstenberg, S.; Cai, Y.; Doe, C.Q.; Chia, W.; Yang, X. 2004. Abstrakt, a DEAD Box Protein, Regulates Insc Levels and Asymmetric Division of Neural and Mesodermal Progenitors. Current Biology 14: 138–144.
- Iwama, G.K.; Thomas, P.T.; Forsyth, R.H.B.; Vijayan, M.M. 1998. Heat shock protein expression in fish, Reviews in Fish Biology and Fisheries 8: 35–56.
- James, J.M.; Collier, G.E. 1990. Hormonally regulated expression of arginine kinase in *Drosophila melanogaster*. Roux's archives of developmental biology 198: 474–478.

- Jiaan, S.L.Z.C.C. 2002. Cloning and Sequencing of Genes Encoding Phospholipase A2 from the Venom of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology* 1: 007.
- Katzav-Gozansky, T.; Soroker, V.; Hefetz, A. 1997a. The biosynthesis of Dufour's gland constituents in queens of the honeybee (*Apis mellifera*). *Invertebrate Neuroscience* 3: 239-243.
- Katzav-Gozansky, T.; Soroker, V.; Hefetz, A.; Cojocar, M.; Erdmann, D.H.; Francke, W. 1997b. Plasticity of caste-specific Dufour's gland secretion in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Naturwissenschaften* 84: 238-241.
- Katzav-Gozansky, T.; Soroker, V.; Hefetz, A. 2000. Plasticity in caste-related exocrine secretion biosynthesis in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 46: 993-999.
- Katzav-Gozansky, T.; Soroker, V.; Hefetz, A. 2002. Honeybees Dufour's gland-idiiosyncrasy of a new queen signal. *Apidologie* 33: 525-537.
- Katzav-Gozansky, T.; Soroker, V.; Francke, W.; Hefetz, A. 2003. Honeybee egg-laying workers mimic a queen signal. *Insectes Sociaux* 50: 20-23.
- Katzav-Gozansky, T.; Boulay, R.; Soroker, V.; Hefetz, A. 2004. Queen-signal modulation of worker pheromonal composition in honeybees. *Proceedings of the Royal Society of London B* 271: 2065-2069.
- Katzav-Gozansky, T.; Hefetz, A.; Soroker, V. 2007. Brain modulation of Dufour's gland ester biosynthesis in vitro in the honeybee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* 94: 407-411.
- Kawamura, K.; Shibata, T.; Saget, O.; Peel, D.; Bryant, P.J. 1999. A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells. *Development* 126: 211-219.
- Kerber, B.; Fellert, S.; Hoch, M. 1998. Seven-up, the *Drosophila* homolog of the COUP-TF orphan receptors, controls cell proliferation in the insect kidney. *Genes & Development* 12: 1781-1786.
- Kevan, P.G. 1999. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 74: 373-393.
- Kim, J.W.; Dang, C.V. 2005. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* 30: 142-150

- Kim, B.Y.; Jin, B.R. 2014. Molecular characterization of a venom acid phosphatase Acph-1-like protein from the Asiatic honeybee *Apis cerana*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17: 695-700.
- Kim, K.K.; Kim, R.; Kim, S. 1998. Crystal structure of small heat-shock protein. *Nature* 394: 595–599.
- King, A.M.; MacRae, T.H. 2015. Insect heat shock proteins during stress and diapause. *Annual Review of Entomology* 60: 59-75.
- Klein, A.M.; Vaissiere, B.E.; Cane, J.H.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S.A.; Kremen, C.; Tscharntke, T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 274: 303-313.
- Kolmes, S.A.; Winston, M.L.; Fergusson, L.A. 1989. The division of labor among worker honey bees (Hymenoptera: Apidae): the effects of multiple patrines. *Journal of the Kansas Entomological Society* 62: 80-95.
- Konsolaki, M.; Schupbach, T. 1998. Windbeutel, a gene required for dorso ventral patterning in *Drosophila*, encodes a protein that has homologies to vertebrate proteins of the endoplasmic reticulum. *Genes & Development* 12: 120-131.
- Konus, M.; Koy, C.; Mikkat, S.; Kreutzer, M.; Zimmermann, R.; Iscan, M.; Glocker, M.O. 2013. Molecular adaptations of *Helicoverpa armigera* midgut tissue under pyrethroid insecticide stress characterized by differential proteome analysis and enzyme activity assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 8: 152-162.
- Krattinger, A.; Gendre, N.; Ramaekers, A.; Grillenzoni, N.; Stocker, R.F. 2007. DmOAZ, the unique *Drosophila melanogaster* OAZ homologue is involved in posterior spiracle development. *Development Genes and Evolution* 217: 197-208.
- Krisch, K. 1971. Carboxylic ester hydrolases. In *The Enzymes V* (Boyer, P.D., ed.), pp. 43-49. Academic Press, New York and London.
- Kronenberg, S.; Hefetz, A. 1984. Comparative analysis of Dufour's gland secretions of two carpenter bees (Xylocopinae: Anthophoridae) with different nesting habits. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 79: 321–425.
- Kucharski, R.; Maleszka, R. 2002. Evaluation of differential gene expression during behavioral development in the honeybee using microarrays and northern blots. *Genome Biology* 3: 1-9.

- Kuchler, K.; Gmachl, M.; Sippl, M.J.; Kreil, G. 1989. Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands. *European Journal of Biochemistry* 184: 249–254.
- Kurzik-Dumke, U.; Lohmann, E. 1995. Sequence of the new *Drosophila melanogaster* small heat-shock-related gene, lethal(2) essential for life [l(2)efl], at locus 59F4,5. *Gene* 154:171–175.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lattorff, H.M.G.; Moritz, R.F.A. 2013. Genetic underpinnings of division of labor in the honeybee (*Apis mellifera*). *Trends in Genetics* 29: 641-648.
- Lavine, M.D.; Strand, M.R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1295–1309.
- Le Conte, Y.; Hefetz, A. 2008. Primer pheromones in social hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 53: 523-542.
- Leimar, O.; Hartfelder, K.; Laubichler, M.D.; Page Jr, R.E. 2012. Development and evolution of caste dimorphism in honeybees—a modeling approach. *Ecology and Evolution* 2: 3098–3109.
- Leoncini, I.; Le Conte, Y.; Costagliola, G.; Plettner, E.; Toth, A.L.; Wang, M.W.; Huang, Z.; Becard, J.M.; Crauser, D.; Slessor, K.N.; Robinson, G.E. 2004. Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101: 17559–17564.
- Leta, M.A.; Gilbert, C.; Morse, R.A. 1996. Levels of hemolymph sugars and body glycogen of honeybees (*Apis mellifera* L) from colonies preparing to swarm. *Journal of Insect Physiology* 42: 239–245.
- Li, J.; Feng, M.; Begna, D.; Yu, F.; Aijuan, Z. 2010a. Proteome comparison of hypopharyngeal gland development between Italian and royal jelly producing worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Proteome Research* 9: 6578–6594.
- Li, J.; Wu, J.; Begna Rundassa, D.; Song, F.; Zheng, A.; Fang, Y. 2010b. Differential protein expression in honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: underlying caste differentiation. *PLoS One* 5: 1-11.

- Li, J.H.; Zhang, C.X.; Shen, L.R.; Tang, Z.H.; Cheng, J.A. 2005. Expression and regulation of phospholipase A2 in venom gland of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 60: 1–12.
- Linksvayer, T.A.; Kaftanoglu, O.; Akyol, E.; Blatch, S.; Amdam, G.V.; Page, R.E. 2011. Larval and nurse worker control of developmental plasticity and the evolution of honey bee queen-worker dimorphism. *Journal of Evolutionary Biology* 24:1939–1948.
- Malka, O.; Shnieor, S.; Katzav-Gozansky, T.; Hefetz, A. 2008. Aggressive reproductive competition among hopelessly queenless honeybee workers triggered by pheromone signaling. *Naturwissenschaften* 95: 553-559.
- Marchler-Bauer, A.; Zheng, C.J.; Chitsaz, F.; Derbyshire, M.K.; Geer, L.Y.; Geer, R.C.; Gonzales, N.R.; Gwadz, M.; Hurwitz, D.I.; Lanczycki, C.J.; Lu, F.; Lu, S.N.; Marchler, G.H.; Song, J.S.; Thanki, N.; Yamashita, R.A.; Zhang, D.C.; Bryant, S.H. 2013. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Research* 41: D348–D352.
- Martin, D.D.; Beauchamp, E.; Berthiaume, L.G. 2011. Post-translational myristoylation: fat matters in cellular life and death, *Biochimie* 93: 18-31.
- Martin, S.J.; Jones, G.R. 2004. Conservation of bio synthetic pheromone pathways in honeybees *Apis*. *Naturwissenschaften* 91: 232-236.
- Martin, S.J.; Châline, N.; Oldroyd, B.P.; Jones, G.R.; Ratnieks, F.L.W. 2004. Egg marking pheromones of anarchistic worker honeybees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology* 15: 839–844.
- Martin, S.J.; Dils, V.; Billen, J. 2005. Morphology of the Dufour gland within the honey bee sting gland complex. *Apidologie* 36: 543-546.
- Matsumoto, K.; Wolffe, A.P. 1998. Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends in Cell Biology* 8: 318-323.
- Meyer-Fernandes, J.R.; Clark, C.P.; Gondim, K.C.; Wells, M.A. 2001. Fat body fructose-2,6-bisphosphate content and phosphorylase activity correlate with changes in hemolymph glucose concentration during fasting and re-feeding in larval *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 165–170.
- Michener, C.D. 1969. Comparative social behavior of bees. *Annual Review of Entomology* 14:299-342.
- Michener, C.D. 1974. *The social behavior of bees: a comparative study*. Harvard University Press, Cambridge.

- Michener, C.D. 1975. The Brazilian bee problem. *Annual Review of Entomology* 20: 399-416.
- Michener, C.D. 2007. *The Bees of the World*. Baltimore, MD: Johns Hopkins Univ. Press. 953 pp.
- Mietus-Snyder, M.; Sladek, F.M.; Ginsburg, G.S.; Kuo, C.F.; Ladas, J.A.; Darnell Jr, J.E.; Karathanasis, S.K. 1992. Antagonism between apolipoprotein AI regulatory protein 1, Ear3/COUP-TF, and hepatocyte nuclear factor 4 modulates apolipoprotein CIII gene expression in liver and intestinal cells. *Molecular and Cellular Biology* 12:1708–1718.
- Mingarro, I.; Prez-Paya, E.; Pinilla, C.; Appel, J.R.; Houghten, R.A.; Blondelle, S.E. 1995. Activation of bee venom phospholipase A2 through a peptide-enzyme complex. *FEBS Letters* 372:131-134.
- Misquitta, L.; Paterson, B.M. 1999. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): A role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 1451–1456.
- Mitra, A.; Saha, P.; Chaoulideer, M.E.; Bhadra, A.; Gadagkar, R. 2011. Chemical communication in *Ropalidia marginata*: Dufour's gland contains queen signal that is perceived across colonies and does not contain colony signal. *Journal of Insect Physiology* 57: 280–284.
- Mitra, A. 2013. Function of the Dufour's gland in solitary and social Hymenoptera. *Journal of Hymenoptera Research* 35: 33-58.
- Mizrahi, T., Heller, J., Goldenberg, S., Arad, Z., 2010. Heat shock proteins and resistance to desiccation in congeneric land snails. *Cell Stress & Chaperones* 15: 351–363.
- Morrison, J.F. 1973. Arginine kinase and other invertebrate guanidine kinases. In: Boyer, P.C. (Ed.), *The Enzymes*. Academic Press, New York, pp. 457– 486.
- Morse, R.A.; Calderone, N.W. 2000. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. *Bee Cult* 1–15.
- Moss, S.E.; Morgan, R.O. 2004. The annexins. *Genome Biology* 5: 219.
- Munoz-Torres, M.C.; Reese, J.T.; Childers, C.P.; Bennett, A.K.; Sundaram, J.P.; Childs, K. L.; Anzola, J.M.; Milshina, N.; Elsik, C.G. 2011. Hymenoptera Genome Database: integrated community resources for insect species of the order Hymenoptera. *Nucleic Acids Research* 39: 658–662.

- Murakami, M.; Kudo, I. 2002. Phospholipase A2. *Journal of Biochemistry* 131: 285-292.
- Muthukrishnan, S.; Merzendorfer, H.; Arakane, Y.; Kramer, K.J. 2012. Chitin metabolism in insects. In: Gilbert, L.I. (ed.) *Insect molecular biology and biochemistry*, pp. 193–235. Academic, New York.
- Naeger, N.L.; Peso, M.; Even, N.; Barron, A.B.; Robinson, G.E. 2013. Altruistic behavior by egg-laying worker honeybees. *Current Biology* 23: 1574-1578.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. 2014. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed 6 edição.
- Norden, B.B.; Batra, S.W.T.; Fales, H.M.; Hefetz, A.; Shaw, J.C. 1980. Anthophora bees; unusual glycerides from maternal Dufour's glands serve as larval food and cell lining. *Science* 207: 1095–1097.
- Nunes, L.A.; Araújo, E.D.; Marchini, L.C.; Moreti, A.C.C.C. 2012. Variation morphogeometrics of Africanized honey bees (*Apis mellifera*) in Brazil. *Iheringia, Série Zoologia, Porto Alegre* 102: 321-326.
- Oldham, N.; Billen, J.; Morgan, E.D. 1994. On the similarity of the Dufour gland secretion and the cuticular hydrocarbons of some bumblebees. *Physiological Entomology* 19: 115–123.
- Oldroyd, B.P.; Ratnieks, F.L.W.; Wossler, T.C. 2002. Egg-marking pheromones in honey-bees *Apis mellifera*. *Behavioral Ecology Sociobiology* 51: 590–591.
- Page, R.E. 1980. Protandrous reproduction in honey bees. *Environmental Entomology* 10: 359–362.
- Pankiw, T. 2004a. Cued in: honey bee pheromones as information flow and collective decision-making. *Apidologie* 35: 217–226.
- Pankiw, T. 2004b. Worker honey bee pheromone regulation of foraging ontogeny. *Naturwissenschaften* 91: 178–181.
- Paskewitz, S.M.; Shi, L. 2005. The hemolymph proteome of *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 815-824.
- Pelosi, P.; Calvello, M.; Ban, L. 2005. Diversity of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in insects. *Chemical senses* 30: 291-292.
- Peiren, N.; de Graaf, D.C.; Vanrobaeys, F.; Danneels, E.L.; Devreese, B.; Van Beeumen, J.; Jacobs, F.J. 2008. Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. *Toxicon* 52: 72–83.

- Peiren, N.; Vanrobaeys, F.; de Graaf, D.C.; Devreese, B.; Van Beeumen, J.; Jacobs, F.J. 2005. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochimica et Biophysica Acta* 1752: 1-5.
- Petersen, T.N.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, Henrik. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8: 785-786.
- Pickett, J.A.; Williams, I.H.; Martin, A.P. 1982. (Z)-11-eicosen-1-ol, an important new pheromonal component from the sting of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Journal of Chemical Ecology* 8:163-175.
- Pineda Jr., A.O.; Ellington, W.R. 1998. Immunogold transmission electron microscopic localization of arginine kinase in arthropod mitochondria. *Journal of Experimental Zoology* 281: 73–79.
- Pham, D.Q.D.; Winzerling, J.J. 2010. Insect Ferritins: typical or atypical? *Biochimica et Biophysica Acta* 1800: 824-833.
- Pollard, T.D.; Cooper, J.A. 2009. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326: 1208-1212.
- Porrini, C.; Sabatini, A.G.; Girotti, S.; Fini, F.; Monaco, L.; Celli, G.; Bortolotti, L.; Ghini, S. 2003. The death of honeybees and environmental pollution by pesticides: the honey bees as biological indicators. *Bulletin of Insectology* 56: 147-152.
- Ratnieks, F.L.W. 1991. Africanized bees: Natural selection for colonizing ability. In: M. Spivak; Fletcher, D.J.C. & Breed, M. D. eds. *The “African” Honey Bee*. San Francisco, Westview Press, p. 119-136.
- Richard, F.J.; Schal, C.; Tarpy, D.R.; Grozinger, C.M. 2011. Effects of Instrumental Insemination and Insemination Quantity on Dufour’s Gland Chemical Profiles and Vitellogenin Expression in Honey Bee Queens (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology* 37: 1027-1036.
- Roat, T.C.; dos Santos-Pinto, J.R.A.; dos Santos, L.D.; Santos, K.S.; Malaspina, O.; Palma, M.S. 2014. Modification of the brain proteome of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) exposed to a sub-lethal doses of the insecticide fipronil. *Ecotoxicology* 23:1659-1670.
- Robinson, G.E.; Huang, Z.Y. 1998. Colony integration in honey bees: genetic, endocrine and social control of division of labor. *Apidologie* 29: 159–170.

- Robinson, G.E. 2002. Genomics and integrative analyses of division of labor in honeybee colonies. *The American Naturalist* 160: 160–172.
- Rodriguez de Turco, E.B.; Jackson, F.R.; DeCoster, M.A.; Kolko, M.; Bazan, N.G. 2002. Glutamate signalling and secretory phospholipase A2 modulate the release of arachidonic acid from neuronal membranes. *Journal of Neuroscience Research* 68: 558-567.
- Satoh, T. 1987. Role of carboxylesterases in xenobiotic metabolism. *Reviews in Biochemical Toxicology* 8: 155-181.
- Schal, C.; Sevala, V.L.; Young, H.P.; Bachmann, J.A.S. 1998. Sites of synthesis and transport pathways of insect hydrocarbons: cuticle and ovary as target tissues. *American Zoologist* 38: 382-393.
- Schindelin, H.; Marahiel, M.A.; Heinemann, U. 1993. Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature* 364: 164-168.
- Schindelin, H.; Jiang, W.; Inouye, M.; Heinemann, U. 1994. Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 5119-5123.
- Schroder, K.; Graumann, P.; Schnuchel, A.; Holak, T.A.; Marahiel, M.A. 1995. Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. *Molecular Microbiology* 16: 699-708.
- Schwaighofer, A.; Pechlaner, M.; Oostenbrink, C.; Kotlowski, C.; Araman, C.; Mastrogiacomo, R.; Pelosi, P.; Knoll, W.; Nowak, C.; Larisika, M. 2014. Insights into structural features determining odorant affinities to honey bee odorant binding protein 14. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446: 1042-1046.
- Shimron, O.; Hefetz, A.; Tengö, J. 1985. Structural and communicative functions of Dufour's gland secretion in *Eucera palestinae* (Hymenoptera: Anthophoridae). *Insect Biochemistry* 15: 635–638.
- Silveira, F.A.; Melo, G.A.R.; Almeida, E.A.B. 2002. *Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação*. Belo Horizonte, Edição do autor. 253 pp.
- Singh, S.P.; Coronella, J.A.; Beneš, H.; Cochrane, B.J.; Zimniak, P. 2001. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1

- (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *European Journal of Biochemistry* 268: 2912-2923.
- Six, D.A.; Dennis, E.A. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1488: 1–19.
- Sladek, F.M.; Zhong, W.; Lai, E.; Damell Jr, J.E. 1990. *Genes & Development* 4: 2353-2365.
- Sledge, M.F.; Fortunato, A.; Turillazzi, S.; Francescato, E.; Hashim, R.; Moneti, G.; Jones, G.R. 2000. Use of Dufour's gland secretion in nest defence and brood nutrition by hover wasps (Hymenoptera, Stenogastrinae). *Journal of Insect Physiology* 46: 753–761.
- Smith, A.F.; Tsuchida, K.; Hanneman, Eric; Suzuki, T.C.; Wells, M.A. 1992. Isolation, characterization, and cDNA sequence of two fatty acid binding proteins from the midgut of *Manduca sexta* larvae. *The journal of biological chemistry* 267: 380-384.
- Sole, C.L.; Kryger, P.; Hefetz, A.; Katzav-Gozansky, T.; Crewe, R.M. 2002. Mimicry of queen Dufour's gland secretions by workers of *Apis mellifera scutellata* and *A. m. capensis*. *Naturwissenschaften* 89: 561–564.
- Sørensen, J.G.; Kristensen, G.T.N.; Loeschcke, V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* 6: 1025–1037.
- Steffan-Dewenter, I.; Potts, S.G.; Packer, L. 2005. Pollinator diversity and crop pollination services are at risk. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 651-652.
- Syvertsen, T.C.; Jackson, L.L.; Blomquist, G.J.; Vinson, S.B. 1995. Alkadienes mediating courtship in the parasitoid *Cardiochiles nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Chemical Ecology* 21: 1971–1989.
- Tabb, J.S.; Molyneaux, B.J.; Cohen, D.L.; Kuznetsov, S.A.; Langford, G.M. 1998. Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *Journal of Cell Science* 111: 3221–3234.
- Tan, K.; Wang, Y.; Dong, S.; Liu, X.; Zhuang, D.; Chen, W.; Oldroyd, B.P. 2015. Associations between reproduction and work in workers of the Asian hive bee *Apis cerana*. *Journal of Insect Physiology* 82: 33-37.
- Tengö, J.; Hefetz, A.; Bertsch, A.; Schmitt, U.; Lübke, G.; Francke, W. 1991. Species specificity and complexity of Dufour's gland secretion of bumble bees. *Comparative Biochemistry and Physiology* 99: 641–646.

- Teodoro, J.G.; Branton, P.E. 1997. Regulation of apoptosis by viral gene products. *Journal of Virology* 71:1739–1746.
- Terashima, J.; Bownes, M. 2005. A microarray analysis of genes involved in relating egg production to nutritional intake in *Drosophila melanogaster*. *Cell Death and Differentiation* 12: 429–440.
- Thieringer, H.A.; Singh, K.; Trivedi, H.; Inouye, M. 1997. Identification and developmental characterization of a novel Y-box protein from *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research* 25: 4764-4770.
- Tofilsky, A. 2008. Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminant three honeybee subspecies. *Apidologie* 38: 538-563.
- van Thoai, N. 1968. Homologous phosphagen phosphokinases. In: van Thoai, N., Roche, J. (Eds.), *Homologous Enzymes and Biochemical Evolution*. Gordon and Breach, New York, pp. 199– 229.
- Vinson, S.B.; Frankie, G.W.; Blum, M.S.; Wheeler, J.W. 1978. Isolation, identification and function of Dufour's gland secretion of *Xylocopa virginica texana* (Hymenoptera: Anthophoridae). *Journal of Chemical Ecology* 4: 315–323.
- Wang, H.S.; Wang, X.H.; Zhou, C.S.; Huang, L.H.; Zhang, S.F.; Guo, W.; Kang, L. 2007. cDNA cloning of heat shock proteins and their expression in the two phases of the migratory locust. *Insect Molecular Biology* 16: 207-219.
- Wang, F.; Xue, R; Li, X; Hu, C; Xia, Q. 2016. Characterization of a protein tyrosine phosphatase as a host factor promoting baculovirus replication in silkworm, *Bombyx mori*. *Developmental and Comparative Immunology* 57: 31-37
- Wilhelm, J.E.; Mansfield, J.; Hom-Booher, N.; Wang, S.; Turck, C.W.; Hazelrigg, T.; Vale, R.D. 2000. Isolation of a ribonucleoprotein complex involved in mRNA localization in *Drosophila* oocytes. *The Journal of Cell Biology* 148: 427-440.
- Wilkins, S.; Zhang, Z.; Zheng, Y. 2005. A structural model of the vacuolar ATPase from transmission electron microscopy. *Micron* 36: 109–126.
- Wilkinson, B.; Gilbert, H.F. 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1699: 35–44.
- Wilson, E.O. 1971. *The insect societies*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- Winston, M.L. 1987. *The Biology of the Honey Bee*. Cambridge, MA: Harvard University Press; p 294. L.
- Whitesell, L.; Lindquist, S.L. 2005. Hsp90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer* 5: 761–772.

- Woyciechowski, M.; Kuszewska, K. 2012. Swarming Generates Rebel Workers in Honeybees. *Current Biology* **22**: 707-711.
- Wright, M.H.; Heal, W.P.; Mann, D.J.; Tate, E.W. 2010. Protein myristoylation in health and disease. *Journal of Chemical Biology* **3**: 19-35.
- Yao, P.; Lu, W.; Menga, F.; Wang, X.; Xu, B.; Guoa, X. 2013. Molecular cloning, expression and oxidative stress response of a mitochondrial thioredoxin peroxidase gene (AccTpx-3) from *Apis cerana cerana*. *Journal of Insect Physiology* **59**: 273-282.
- Yao, P.; Chen, X.; Yan, Y.; Liu, F.; Zhang, Y.; Guo, X. 2014. Glutaredoxin 1, glutaredoxin 2, thioredoxin 1, and thioredoxin peroxidase 3 play important roles in antioxidant defense in *Apis cerana cerana*. *Free Radical Biology and Medicine* **68**: 335-346.
- Young, J.C.; Moarefi, I.; Hartl, F.U. 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *Journal of Cell Biology* **154**: 267–273.
- Yu, C.S.; Lin, C.J.; Hwang, J.K. 2004. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions.
- Yu, C.S.; Chen, Y.C.; Lu, C.H.; Hwang, J.K. 2006. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **64**:643-651.
- Zelhof, A.C.; Yao, T.P.; Chen, J.D.; Evans, R.M.; McKeown, M. 1995. Seven-up inhibits ultraspiracle-based signaling pathways in vitro and in vivo. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 6736–6745.
- Zhao, L.; Jones, W.A. 2012. Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. *Invertebrate Survival Journal* **9**: 93-101.
- Zheng, A.J.; Li, J.K.; Begna, D.; Fang, Y.; Feng, M.; Song, F.F. 2011. Proteomic analysis of honeybee (*Apis mellifera* L.) pupae head development. *PLoS One* **6**: 1-12.
- Zhong, W.; Sladek, F.M.; Darnell Jr, J.E. 1993. The expression pattern of a *Drosophila* homolog to the mouse transcription factor HNF-4 suggests a determinative role in gut formation. *The EMBO Journal* **12**: 537-544.
- Zhou, G.; Kohlhepp, P.; Geiser, D.L.; Frasquillo, M.D.; Vazquez-Moreno, L.; Winzerling, J.J. 2007. Fate of blood meal iron in mosquitoes. *Journal of Insect Physiology* **53**:1169-1178.

Zimmerman, A.W.; Veerkamp, J.H. 2002. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 1096-1116. *Protein Science* 13:1402-1406.