

DIHEGO DE OLIVEIRA AZEVEDO

**VITELOGENINAS EM OPERÁRIAS DE *Ectatomma tuberculatum*
(FORMICIDAE: ECTATOMMINAE): SÍNTESE, FUNÇÕES E REGULAÇÃO
ENDÓCRINA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A994u
2011

Azevedo, Dihego de Oliveira, 1982-

Vitelogeninas em operárias de *Ectatomma tuberculatum* (Formicidae: Ectatomminae): síntese, funções e regulação endócrina / Dihego de Oliveira Azevedo. – Viçosa, MG, 2011.

vii, 50f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 41-50.

1. Formiga - Fisiologia. 2. *Ectatomma tuberculatum*.
3. Imunoeletroforese. 4. Microscopia. 5. Teste imunoenzimático. 6. Hormônios juvenis. 7. Reação em cadeia de polimerase. 8. Formiga - Comportamento. 9. Sociedades de insetos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 595.796

DIHEGO DE OLIVEIRA AZEVEDO

**VITELOGENINAS EM OPERÁRIAS DE *Ectatomma tuberculatum*
(FORMICIDAE: ECTATOMMINAE): SÍNTESE, FUNÇÕES E REGULAÇÃO
ENDÓCRINA**

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

APROVADA: 29 de Fevereiro de 2011.

Prof^ª. Maria Izabel Camargo Mathias

Prof^ª. Terezinha Maria C. Della Lucia

Prof. Leandro Licurse de Oliveira

Prof^ª. Elaine Cristina M. S. Zacarin

Prof. José Eduardo Serrão

(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq);

Aos Departamentos de Biologia Animal e Biologia Geral;

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia;

Ao meu orientador e amigo Dr. José Eduardo Serrão;

Aos co-orientadores Dr. Lúcio Antônio de Oliveira Campos, Dr. Sérgio Oliveira de Paula e Dr. José Cola Zanuncio;

Aos membros da banca examinadora Dra. Maria Izabel Camargo Mathias, Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin, Dr. Leandro Licursi de Oliveira e Dra. Terezinha Maria Castro Della Lucia.

À Dra. Riviane Rodrigues Hora-Bellenand;

Ao Dr. Jacques Hubert Charles Delabie e ao laboratório de Mirmecologia;

Aos alunos, professores e funcionários do Laboratório de Imunovirologia Molecular e Glicobiologia;

Aos amigos do Laboratório de Ultra-estrutura Celular;

À minha esposa Marina e minha família.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO	1
Objetivos	10
MATERIAL E MÉTODOS	11
Formigas.....	11
Obtenção de antígenos	11
Gel Nativo	12
Produção de anticorpos	13
Imunofluorescência	14
Imunohistoquímica.....	15
Obtenção de amostras de hemolinfa	15
Western Blotting	16
PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	17
Tratamento com HJ e dosagem de vitelogeninas por ELISA	19
RESULTADOS.....	22
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS.....	41

RESUMO

AZEVEDO, Dihego de Oliveira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Vitelogeninas em operárias de *Ectatomma tuberculatum* (Formicidae: Ectatomminae): síntese, funções e regulação endócrina.** Orientador: José Eduardo Serrão. Co-orientadores: Lúcio Antônio de Oliveira Campos, Sérgio Oliveira de Paula e José Cola Zanuncio.

As operárias da formiga *Ectatomma tuberculatum* (Ectatomminae) apresentam ovários desenvolvidos e produzem ovos que são utilizados na alimentação da cria e da rainha (ovos tróficos). As vitelogeninas são as principais proteínas encontradas nos ovos de insetos, sendo potencial fonte de nutrientes para o embrião e adultos. Em insetos sociais, os níveis de vitelogenina variam entre os indivíduos e influenciam a determinação das castas reprodutivas e operárias, atividades de cuidado com a cria e forrageio, longevidade, manutenção somática e imunidade. Em formigas que produzem ovos tróficos, a vitelogenina é uma das fontes de alimento para larvas e rainhas. Em geral, a síntese de vitelogenina é regulada em nível transcricional principalmente por hormônio juvenil (HJ), mas em operárias de formigas essa relação não está muito bem caracterizada. Os objetivos deste trabalho foram verificar o período de produção de vitelogenina em operárias de *E. tuberculatum* e o efeito do HJ na síntese dessa proteína. A vitelogenina foi identificada a partir de extratos de ovos de rainhas e operárias por SDS-PAGE. Anticorpos anti-vitelogenina foram obtidos e utilizados para detecção dessa proteína no corpo gorduroso e na hemolinfa de operárias de diferentes idades. Também foi observado o efeito da aplicação de HJ III na síntese de vitelogenina no corpo gorduroso e nos níveis de vitelogenina circulantes na hemolinfa de operárias, através de PCR quantitativo em tempo real e ELISA. As vitelogeninas de *E. tuberculatum* são constituídas por dois polipeptídios de 31 e 156 kDa. Nos ovos de

rainhas, a vitelogenina de 156 kDa é clivada em duas subunidades de 36 e 123 kDa. As análises da hemolinfa de operárias mostraram que a secreção de vitelogenina varia de acordo com a idade, com picos de produção entre os 20 e 60 dias de idade e cessando por volta dos 100 dias. Essa variação mostra uma relação com as diferentes atividades exercidas pelas operárias na colônia, sugerindo que a vitelogenina pode ter uma importante função na manutenção do polietismo etário em *E. tuberculatum*. As análises também mostraram que aplicação de HJ III reduz a síntese de vitelogenina no corpo gorduroso, assim como reduz os níveis de vitelogenina circulante na hemolinfa. Esses dados mostram que o HJ regula a produção de vitelogenina em operárias, sugerindo que em operárias adultas de *E. tuberculatum* o hormônio juvenil não tem função de gonadotropina.

ABSTRACT

AZEVEDO, Dihego de Oliveira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Vitellogenins in workers of the ant *Ectatomma tuberculatum* (Formicidae: Ectatomminae): synthesis, functions and endocrine regulation.** Adviser: José Eduardo Serrão. Co-advisers: Lúcio Antônio de Oliveira Campos, Sérgio Oliveira de Paula and José Cola Zanuncio.

Workers of the ant *Ectatomma tuberculatum* (Ectatomminae) have active ovaries and lay eggs that are eaten by the queen and larvae (trophic eggs). Vitellogenins are the main proteins found in the eggs of insects and are a source of nutrients to embryo and adults. In social insects, the vitellogenin levels vary between the castes and influences the reproductive social status, nursing and foraging activities, longevity, somatic maintenance and immunity. In most of the insects, the vitellogenin synthesis is regulated mainly by juvenile hormone. However, in non-reproductive worker ants this relationship is poorly characterized. The aims of this study were to characterize the period of vitellogenin secretion in workers of *E. tuberculatum* and to verify the effects of juvenile hormone application in vitellogenin synthesis. The vitellogenin was identified from queen and worker eggs by SDS-PAGE. Anti-vitellogenin antibodies were obtained and used to detect this protein in the fat body and haemolymph of workers at different ages. Also, juvenile hormone III was applied topically in workers and their effect on vitellogenin synthesis in the fat body and vitellogenin levels in the haemolymph were analyzed by quantitative real time PCR and ELISA. Vitellogenin from *E. tuberculatum* consists of two polypeptides of 31 and 156 kDa. In the eggs of queens, the 156 kDa polypeptide is cleaved into two subunits of 36 and 123 kDa. The analysis of the haemolymph of workers showed that the secretion of vitellogenin varies with age. The secretion is initiated around the fifth day after emergence, with peak

production from days 20 to 60, and stops around day 100. The analyses also showed that juvenile hormone down regulates the vitellogenin mRNA expression and protein synthesis in the fat body, and reduces the vitellogenin levels in the haemolymph. Our data showed that vitellogenin may have an important role in maintaining age polyethism and its synthesis is down regulated by juvenile hormone in *E. tuberculatum*.

INTRODUÇÃO

Vitelogeninas são as proteínas precursoras das vitelinas, principais constituintes do vitelo dos ovos de insetos e fonte de nutrientes para o embrião em desenvolvimento (Raikhel e Dhadialla, 1992; Tufail e Takeda, 2008).

Nos insetos, as vitelogeninas são sintetizadas principalmente no corpo gorduroso de fêmeas na forma de um ou múltiplos polipeptídios de até 200 kDa, que sofrem modificações como glicosilação, lipidificação, fosforilação, sulfatação e clivagem proteolítica antes de serem liberados na hemolinfa como proteínas oligoméricas com massas moleculares que variam de 300 a 600 kDa (Wheeler et al., 1999; Tufail e Takeda, 2008). Esses agregados protéicos são posteriormente captados pelos ovócitos via endocitose mediada por receptores (Tufail e Takeda, 2009) e estocados na forma de grânulos protéicos, quando recebem o nome de vitelinas (Raikhel e Dhadialla, 1992; Giorgi et al., 1999). Assim, as vitelogeninas levam para os ovócitos aminoácidos, fosfatos, carboidratos, lipídios e sulfatos, assim como carregam ácidos graxos, vitaminas, hormônios e metais via ligações não-covalentes (Raikhel e Dhadialla, 1992; Amdam et al., 2004; Tufail e Takeda, 2008). A glicosilação e a sulfatação também têm relação com a secreção das vitelogeninas do corpo gorduroso e sua ligação com os receptores para endocitose na superfície dos ovócitos (Raikhel e Dhadialla, 1992; Tufail e Takeda, 2009). Algumas espécies de insetos produzem vitelogenina também em outros órgãos, tal como as glândulas hipofaríngeas na abelha *Apis mellifera* (Seehuus et al., 2007) e ovários em alguns dípteros (Raikhel e Dhadialla, 1992). Em abelhas, a vitelogenina também foi identificada em machos (Piulachs et al., 2003).

A vitelogenina é uma proteína que possui trechos com sequências bastante conservadas nos insetos (Chen et al., 1997; Tufail e Takeda, 2008), embora o número de genes que a codificam varie em diferentes espécies. Nos insetos hemimetábolos, há um gene em *Blattella germanica* (Blattaria) (Comas et al. 2000) e dois genes em *Leucophaea maderae* (Blattaria) (Tufail et al., 2007). Nos holometábolos, cinco genes foram identificados em *Aedes aegypti* (Diptera) (Chen et al., 1994), um gene em *Bombyx mori* (Lepidoptera) (Yanno et al., 1994) e em *A. mellifera* (Hymenoptera: Apidae) (Piulachs et al., 2003), e três genes em *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) (Tufail e Takeda, 2008).

Estruturalmente, a característica mais marcante das vitelogeninas de insetos é a presença de uma região rica em resíduos de serina, principalmente na porção N-terminal. Essa região concentra carga negativa e pode estar relacionada à solubilidade da vitelogenina na hemolinfa e na captação de íons Ca^{+2} e Fe^{+3} , além de ser um sítio em potencial para fosforilação, visto que se apresenta altamente fosforilado em algumas espécies de baratas (Tufail e Takeda, 2002). A importância desses domínios fosforilados pode estar no fato de que a desfosforilação da vitelogenina diminui sua captação pelos ovócitos (Dhadialla et al., 1992). A porção C-terminal das vitelogeninas de insetos tem como característica o alto grau de conservação dos motivos DGxR (ácido-aspártico, glicina, um aminoácido qualquer, arginina), GL/ICG (glicina, leucina ou isoleucina, cisteína e glicina), e C (cisteína), nessa ordem em direção à porção C-terminal (Tufail e Takeda, 2008). Os motivos GL/ICG e C são responsáveis pela oligomerização das vitelinas em vertebrados (Mouchelet et al., 1996).

Nos Hymenoptera sociais, a produção de vitelogeninas não é exclusividade das castas reprodutivas, pois as operárias de abelhas e formigas também a produzem (Gobin

et al., 1998; Wheeler et al., 1999; Guidugli et al., 2005; Seehuus et al., 2006; Dallacqua et al., 2007). A capacidade de produção dessa proteína pelas castas não reprodutivas indica que a vitelogenina possui outras funções não relacionadas a fornecer nutrientes ao embrião.

Operárias de abelhas sem ferrão produzem ovos mesmo em colônias com rainhas ativas. Entretanto, operárias de *Frieseomelitta varia* (Apidae: Meliponini) não realizam postura, mas produzem vitelogeninas constitutivamente durante toda sua vida, sugerindo participação dessas proteínas em processos fisiológicos não relacionados à reprodução (Dallacqua et al., 2007). Em operárias de *A. mellifera*, além de servir como fonte de aminoácidos na produção de alimento para a cria e geléia real (Amdam et al., 2003), as vitelogeninas estão envolvidas na regulação da execução de diferentes atividades dentro da colônia e no início das atividades de forrageio destas abelhas (Marco Antônio et al., 2008). As vitelogeninas também influenciam a maior longevidade das rainhas de *A. mellifera* em relação às operárias, permitindo maior resistência ao estresse oxidativo e regulando a expressão de hormônio juvenil (HJ) e de genes da cascata de sinalização IIS (insulin/insulin-like signaling), esta envolvida no controle do crescimento, envelhecimento e reprodução em vertebrados e invertebrados (Corona et al., 2007).

A vitelogenina tem importantes funções na manutenção somática e do sistema imune de abelhas. Abelhas submetidas a estresse oxidativo apresentam grande quantidade de hemócitos picnóticos, indicativo de morte celular, e células do corpo gorduroso soltas na hemolinfa quando tratadas com RNA de interferência (RNAi) anti-vitelogenina (Seehuus et al., 2006). Da mesma forma, o número de hemócitos normais circulantes está diretamente relacionado à quantidade de zinco ligado à vitelogenina

circulante na hemolinfa (Amdam et al. 2004). A vitelogenina também influencia o status nutricional das operárias de *A. mellifera* (Toth e Robinson, 2005). À medida que as operárias envelhecem, elas consomem menores quantidades de pólen e essa queda no consumo resulta em diminuição na síntese e quantidade de vitelogenina circulante na hemolinfa (Bitondi e Simões, 1996). Da mesma forma, as reservas lipídicas no corpo gorduroso de operárias forrageiras são menores que nas nutridoras (Toth e Robinson, 2005). A vitelogenina é uma importante carreadora de lipídios (Tufail e Takeda, 2008), e a diminuição na quantidade dessa proteína pode ser uma das causas das menores reservas lipídicas em operárias mais velhas (Toth e Robinson, 2005).

Em várias espécies de formigas, as operárias retêm a capacidade de desenvolvimento do ovário, produzindo ovos não fertilizados e morfologicamente diferentes dos ovos férteis denominados ovos tróficos, utilizados na alimentação das larvas e das castas reprodutivas (Hölldobler e Wilson, 1990; Camargo-Mathias e Caetano, 1995; Fénéron e Billen, 1996; Gobin et al., 1998; Dietemann e Peeters, 2000). A produção de ovos tróficos mostra que a síntese de vitelogeninas tem relação com alimentação dos membros da colônia.

Os insetos podem ser divididos em três grupos baseados na regulação hormonal da síntese de vitelogeninas: no grupo I, estão os insetos cuja síntese é controlada principalmente pelo HJ; no grupo II estão insetos como os dípteros, que usam HJ e ecdisteróides produzidos pelos ovários; e no grupo III estão os lepidópteros, que requerem HJ, ecdisteróides e hormônios adicionais para regular a síntese de vitelogenina (Tufail e Takeda 2008).

O HJ é um sesquiterpenóide acíclico sintetizado pelos *corpora allata*, um par de glândulas localizado logo abaixo do cérebro, no chamado complexo retrocerebral, que

regula o desenvolvimento e a reprodução nos insetos em geral (Hartfelder, 2000). Três compostos com atividade de HJ foram isolados em insetos e designados HJ I, HJ II e HJ III. As três moléculas apresentam diferentes atividades fisiológicas e concentração na hemolinfa. O HJ III é o hormônio predominante nos insetos em geral, enquanto os HJ I e II são encontrados principalmente em larvas de lepidópteros (Kort e Granger, 1981).

Por ser altamente lipofílico, o HJ é transportado na hemolinfa por proteínas carreadoras como lipoforinas e hexamerinas de alto peso molecular, que também protegem o hormônio de degradação por esterases. Entretanto, algumas esterases e hidrolases se ligam a essas proteínas para desativar e regular o nível de HJ na hemolinfa (Kort e Granger, 1981).

Durante o desenvolvimento larval, o HJ previne o surgimento precoce de características adultas, mantendo a expressão de genes ligados à fase larval. Na ausência de HJ, o hormônio 20-OH-Ecdisona ativa a expressão de genes ligados à metamorfose e a características de pupas e adultos (Jones, 1995; Hartfelder, 2000). Em insetos adultos, o HJ atua principalmente em eventos ligados à reprodução como ovogênese, vôos nupciais e de dispersão, produção de feromônios e mudanças pós-copulatórias em fêmeas (Jones, 1995; Hartfelder, 2000). Particularmente em relação à ovogênese, o HJ influencia a síntese de vitelogenina no corpo gorduroso e sua captação pelos ovócitos (Hagedorn e Kunkel, 1979; Raikhel e Dahadialla, 1992; Hartfelder, 2000).

Nos Hymenoptera eussociais, os estudos do papel do HJ mostram que ele não age apenas como uma gonadotropina tradicional, mas adquiriu importantes funções na diferenciação de castas, na divisão de trabalho reprodutivo e no polietismo etário (Robinson e Vargo, 1997; Hartfelder, 2000).

Nos Hymenoptera eussociais mais basais, a diferenciação morfológica entre as castas reprodutivas e operárias são mínimas, e as operárias podem se acasalar e se reproduzir na ausência de uma rainha (Michener, 1974). Nessas espécies, o HJ tem efeito gonadotrópico, estimulando o desenvolvimento dos ovários e influenciando a divisão de trabalho reprodutivo (Robinson e Vargo, 1997). Na abelha *Bombus terrestris* (Apidae), os níveis de HJ estão positivamente relacionados com o desenvolvimento dos ovários, e as operárias dominantes e rainhas apresentam maiores níveis de HJ circulante na hemolinfa (Bloch et al., 2000). Em *Lasioglossum zephyrum* (Halictidae), a produção de vitelogenina é dependente de indução por HJ e operárias de colônias com uma rainha já estabelecida podem desenvolver ovários quando tratadas com HJ (Bell, 1973). Em vespas do gênero *Polistes* (Vespidae), o HJ influencia o desenvolvimento ovariano e as relações de dominância reprodutiva, visto que as fêmeas que se tornam dominantes quanto à postura de ovos apresentam maiores níveis de HJ que as fêmeas subordinadas (Röseler et al., 1984; Giray et al., 2005).

Na abelha altamente eussocial *A. mellifera*, o HJ tem papel fundamental na diferenciação de castas. A alimentação diferenciada das larvas de rainhas faz com que os *corpora allata* produzam altos níveis de HJ entre o terceiro e quinto ínstar, diferentemente das larvas de operárias. Os altos níveis de HJ induzem proliferação celular das gônadas no último ínstar larval e inibem a degeneração das células foliculares. Além disso, o HJ estimula a produção de ecdisteróides nas glândulas protorácicas, os quais ativam a síntese protéica casta-específico nos ovários larvais (Hartfelder, 2000). Na fase adulta, entretanto, o HJ perdeu seu efeito gonadotrópico tanto em rainhas quanto operárias, com a produção de vitelogeninas acontecendo sob baixas concentrações de HJ (Pinto et al., 2000). O efeito positivo do HJ na síntese de

vitelogenina em operárias e rainhas *A. mellifera* acontece apenas durante os últimos estágios pupais (Barchuck et al., 2002). É possível que uma das funções do HJ seja tornar as células competentes à síntese de vitelogenina, para posterior regulação da transcrição (Barchuck et al., 2002). Em formigas, o efeito do HJ na diferenciação de castas foi visto em *Pheidole* sp. (Myrmicinae), onde o dimorfismo existente entre soldados e operárias é dependente de diferentes níveis de HJ durante os estágios larvais (Wheeler e Nijhout, 1983).

O HJ tem participação na organização da divisão de trabalho com base na idade (polietismo etário) em operárias de *A. mellifera* (Robinson e Vargo, 1997), pois a transição de atividades intranidais para extranidais é acompanhada por um aumento na atividade dos *corpora allata* (Huang et al., 1991). Assim, os níveis de HJ aumentam com a idade da abelha, fazendo com que as operárias forrageiras apresentem níveis maiores de HJ que operárias nutridoras (Huang et al., 1991; Jassim et al., 2000). Da mesma forma, a aplicação de HJ em operárias com um dia de idade fez com que elas adiantassem o início do forrageio, assim como a remoção dos *corpora allata* resultou em forrageio tardio (Sullivan et al., 2000). Entretanto, a remoção dos *corpora allata* não impediu as abelhas de forragearem normalmente, apenas atrasando o processo, sugerindo que o HJ não é o único agente regulador da transição de tarefas (Sullivan et al., 2000). O aumento nos níveis de HJ estimula o desenvolvimento de estruturas cerebrais ligadas à aprendizagem e memória (corpos pedunculados) e a degeneração das glândulas hipofaríngeas produtoras de alimento para a cria (Hartfelder, 2000), além de diminuir os níveis de vitelogenina circulante (Pinto et al., 2000).

O HJ também influencia a divisão de trabalho em formigas. Rainhas de *Pogonomyrmex californicus* (Myrmicinae) em fase de forrageio apresentam maiores

níveis de HJ que rainhas que não forrageiam (Dolezal et al., 2009). Em *Myrmica riaeumoides* (Myrmicinae), operárias forrageiras apresentam maiores níveis de HJ III circulante que operárias nutridoras, e a aplicação de HJ em operárias nutridoras acelera a mudança na composição dos hidrocarbonetos cuticulares para um perfil típico de forrageiras (Lengyel et al., 2007).

Em *S. invicta* (Myrmicinae), o HJ regula a maturação sexual das rainhas, influenciando a captação de vitelogenina pelos ovários e estimulando a perda de asas (Burns et al., 2002). Entretanto, estudos recentes demonstram que o HJ não age como gonadotropina em todas as espécies de formigas. Na formiga *Lasius niger* (Formicinae), a aplicação tópica de HJ em rainhas reduziu a produção de ovos (Sommer e Hölldobler, 1995). Da mesma forma, o tratamento de colônias de *Monomorium pharaonis* (Myrmicinae) com o análogo do HJ piriproxifem reduziu o tamanho dos ovários de rainhas (Hsieh e Su, 2000).

Em espécies de formigas onde não há rainhas, todas as operárias são capazes de acasalar e se reproduzir. Dessa forma, elas estabelecem uma hierarquia de dominância reprodutiva onde a operária alfa se reproduz e as subordinadas permanecem inférteis (Holldöbler e Wilson, 1990). Em *Diacamma* sp. e *Streblognathus peetersi* (Ponerinae), as operárias reprodutivamente ativas (gamergates) apresentam níveis de HJ circulante menores que as operárias subordinadas não reprodutivas (Sommer et al., 1993; Brent et al., 2006). Além disso, nas operárias não reprodutivas de *Diacamma* sp., os níveis de HJ aumentam com a idade (Sommer et al., 1993). Partindo do ponto que a produção de vitelogenina é fundamental na produção de ovócitos e conseqüentemente na determinação do status reprodutivo (Raikhel e Dhadialla, 1992; Robinson e Vargo,

1997), as formigas são um bom modelo para a compreensão das funções exercidas pelas vitelogeninas e a sua regulação pelo HJ.

O gênero *Ectatomma* (Formicidae: Ectatomminae) é endêmico da região Neotropical e apresenta 14 espécies distribuídas desde o sul do México até a Argentina (Ouellette et al., 2006; Delabie et al., 2007). As *Ectatomma* são formigas relativamente grandes, com tamanhos que variam de 8 a 12 mm de comprimento (Delabie et al., 2007). Nidificam no solo, criando galerias constituídas de um poço vertical a partir do qual se abrem câmaras horizontais onde as operárias executam, separadamente, atividades como cuidar da cria e amontoar o lixo (Delabie, 1990; Antonialli-Junior e Giannotti, 2001). Por serem predadoras generalistas, as espécies do gênero *Ectatomma* são consideradas importantes agentes no controle biológico natural de populações de insetos (Delabie, 1990, 1999).

A formiga *Ectatomma tuberculatum* (Ectatomminae) forma colônias com até 400 operárias e uma ou várias rainhas (Hora et al., 2001, 2005). As operárias são morfologicamente diferentes das rainhas e semelhantes entre si, estruturadas num sistema de castas temporais onde as funções dentro da colônia variam de acordo a idade (Champalbert e Lachaud, 1990; Fénéron et al., 1996; Hora et al., 2001). São predadoras generalistas, mas também fazem uso de néctar, “honeydew” coletado de afídeos e matéria orgânica em decomposição (Delabie, 2001; Delabie et al., 2007).

Em *E. tuberculatum*, as operárias apresentam ovários desenvolvidos (Fénéron e Billen, 1996) mas não são capazes de se acasalar, visto que a espermateca que possuem não é funcional (Hora et al., 2001). Os ovos produzidos pelas operárias não são férteis, sendo utilizados principalmente na alimentação das larvas e da rainha na forma de ovos tróficos (Hora et al., 2007). O desenvolvimento dos ovários em operárias de *E.*

tuberculatum tem relação com a divisão de tarefas ligada à idade (Fénéron et al., 1996), sugerindo que a vitelogenina pode ser um fator que influencia o polietismo etário.

Isso faz de *E. tuberculatum* um bom modelo para comparações da relação da produção de vitelogenina com o polietismo etário entre formigas e abelhas, visto que os estudos envolvendo esses dois fatores são desenvolvidos basicamente com *A. mellifera* como organismo modelo. Além disso, os estudos sobre a regulação da ovogênese pelo HJ em formigas são baseados principalmente em rainhas e em espécies onde as operárias têm potencial para se tornarem rainhas (Sommer et al., 1993; Sommer e Hölldobler, 1995; Burns et al., 2002; Brent et al., 2006). Logo, não há informações a respeito da relação entre HJ e síntese de vitelogeninas em espécies de formigas onde as operárias possuem ovários ativos não ligados à reprodução.

Objetivos

➤ Objetivo geral:

- Este trabalho tem por objetivo contribuir para a compreensão das funções exercidas pelas vitelogeninas nas castas não reprodutivas de formigas.

➤ Objetivos específicos:

- Verificar o período de secreção de vitelogenina em operárias de *Ectatomma tuberculatum*;
- Verificar se há relação entre a produção de vitelogenina e o polietismo etário apresentado pelas operárias de *E. tuberculatum*;
- Verificar a influência do HJ na síntese de vitelogeninas em operárias de *E. tuberculatum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Formigas

Seis colônias de *E. tuberculatum* foram obtidas do Laboratório de Mirmecologia (Convênio UESC/CEPLAC), no Centro de Pesquisas do Cacau, Itabuna, BA e transferidas para o Laboratório de Ultraestrutura Celular do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, onde foram criadas em colônias artificiais dentro de compartimentos plásticos (18 x 25 cm) forrados com gesso e ligadas por um tubo a outros compartimentos plásticos (10 x 10 cm) sem gesso, utilizados como área de forrageio. Todas as colônias eram poligínicas, contendo de duas a cinco rainhas e mais de 30 operárias, além da cria. As colônias foram mantidas a 26 ± 2 °C, e alimentadas a cada dois dias com larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), mel e água *ad libitum* (Hora et al., 2007).

Para obtenção de formigas com idades conhecidas, operárias recém emergidas foram marcadas com tinta no tórax e mantidas nas colônias artificiais de origem até sua utilização.

Obtenção de antígenos

Amostras de vitelogeninas e/ou vitelinas de *E. tuberculatum* foram obtidas a partir dos ovos de rainhas fisogástricas e ovócitos maduros de operárias com idades entre 30 e 60 dias, estes últimos obtidos por dissecação dos ovários.

Os ovos e ovócitos foram macerados em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2, ou tampão PBS 0,1 M, pH 7,2, contendo 10% v/v de coquetel inibidor de proteases [4-(2-aminoetil) benzenosulfonil fluoreto (AEBSF), E-64, bestatina, leupeptina, aprotinina e sódio EDTA] (Sigma). Os extratos foram centrifugados a 9300 g por 10 minutos, seguido de coleta do sobrenadante. As proteínas solúveis presentes nos extratos foram dosadas pelo método de Bradford (1976) e as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). As amostras foram diluídas na proporção de 1:2 v/v em tampão de amostra (5% p/v SDS; 0,126 M Tris-HCl pH 6,8; 12,5% p/v glicerol; 0,004% azul de bromofenol; 10% v/v β-mercaptoetanol), fervidas por quatro minutos e aplicadas no gel. As concentrações de bis/acrilamida utilizadas foram de 7% para o gel de empilhamento e 12% para o gel de separação. A corrida foi feita sob voltagem constante de 75 V por 15 minutos e 150 V por cerca de 60 minutos. O gel foi corado com solução de azul de Coomassie (azul de Coomassie G250 a 2%; ácido acético a 10%; etanol a 47,5%) e descorado com solução de ácido acético e etanol (ácido acético 10%; etanol 25%). A massa molecular das proteínas foi calculada através de curva padrão obtida pela relação entre os valores de Rf e a massa molecular de proteínas padrão (Promega® Broad Range Protein Molecular Weight Markers).

Gel Nativo

Extratos de ovos de rainhas e operárias e amostras de hemolinfa de operárias com 30 dias de idade foram submetidos à eletroforese em gel nativo de poliacrilamida (Davis, 1964) para comparar as vitelinas e vitelogeninas em sua forma nativa. Amostras contendo 2,5 a 5 µg de proteínas foram diluídas em tampão de amostra (12,5% v/v 0,5

M Tris-HCl pH 6,8, 30% v/v glicerol, 0,01% p/v azul de bromofenol) e aplicados num gel de poliacrilamida a 7%. Após a eletroforese, o gel foi pré-fixado por 16 horas com solução de metanol acético (metanol 10% v/v, ácido acético glacial 10% v/v), fixado por 1 hora com solução de formaldeído a 12,5% e corado com prata amoniacal (nitrito de prata 0,15% p/v, hidróxido de sódio 0,05% p/v e hidróxido de amônio 2,5% v/v).

Produção de anticorpos

As vitelinas correspondem à maior fração das proteínas encontradas nos ovos de insetos (Raikhel e Dhadialla, 1992; Tufail e Takeda, 2008), e as vitelogeninas/vitelinas identificadas no SDS-PAGE foram isoladas do gel e utilizadas separadamente para produção de anticorpos anti-vitelogenina.

Três imunizações foram realizadas em coelhos com até três meses de idade, sendo uma imunização inicial e dois reforços (boost). Na primeira imunização foram realizadas injeções subcutâneas num total de 1 mg de proteínas com adjuvante de Freund completo (v/v). A segunda e terceira imunizações foram realizadas em 30 e 60 dias após a primeira, utilizando um total de 0,25 mg de proteínas cada em adjuvante de Freund incompleto (v/v). O sangue foi coletado 30 dias após a terceira imunização, centrifugado e o soro contendo os anticorpos foi estocado a -20 °C.

As proteínas obtidas no processo de SDS-PAGE também foram utilizadas para imunização de camundongos BALB/c com até três semanas, visando sua utilização nos ensaios ELISA de captura. Três imunizações foram realizadas, sendo que na primeira foi utilizado um total de 0,25 mg de proteínas com adjuvante Freund completo (v/v). A segunda e terceira imunizações foram realizadas em 30 e 60 dias após a primeira,

utilizando um total de 0,05 mg de proteínas em adjuvante Freund incompleto (v/v). O sangue foi coletado 30 dias após a terceira imunização e o soro obtido foi estocado a -20 °C. Um dos camundongos e um dos coelhos teve o sangue coletado antes da primeira imunização para obtenção de soro pré-imune.

Imunofluorescência

Amostras de corpo gorduroso e ovócitos foram obtidos de operárias e foram submetidas a ensaios de imunofluorescência utilizando os anticorpos anti-vitelogenina produzidos em coelhos.

O material obtido foi fixado em solução de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 30 minutos, seguido de lavagem com tampão PBS 0,1 M, pH 7,4 e Tween 20 a 1% (PBST), incubação com solução de albumina a 1,5% em PBST por 10 minutos a 37 °C, lavagem em PBST e incubação com soro normal de coelho a 2% em PBST por 20 minutos a 37 °C. As amostras foram novamente lavadas em PBST e incubadas por 16 horas com o anticorpo anti-vitelogenina diluído em PBST na proporção de 1:500, a 4 °C. Após, as amostras foram lavadas com PBST e incubadas com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com FITC (Sigma) 1:100 em PBST, por duas horas a 37 °C. As amostras foram montadas em lâminas para microscopia com solução de sacarose 50% (montagem total) e visualizadas em microscópio de fluorescência sob a faixa de comprimento de onda de 495-530 nm. O controle negativo foi realizado pela omissão do anticorpo primário.

Imunohistoquímica

Amostras de corpo gorduroso de operárias foram fixadas em solução de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 30 minutos, desidratadas em série alcoólica crescente e incluídas em resina LR White. Secções com 5 μm de espessura foram tratadas com solução de fenilhidrazina 1% em tampão PBS 0,1 M, pH 7,4, por 30 minutos, seguido de lavagem em PBS e incubação com soro normal de coelho a 2% em PBS por 20 minutos. Após, as amostras foram incubadas com anticorpo primário anti-vitelogenina diluído 1:500 em PBS por 2 horas a 37 °C, seguido de lavagem em PBS e incubação com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase diluído 1:1000 em PBS durante 2 horas a 37 °C. As lâminas foram posteriormente lavadas em PBS e em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6, seguido de revelação com solução DAB/H₂O₂ (3,3'-Diaminobenzidina 0,1% em Tris-HCl 50 mM, pH 7,6; 2,5% cloreto de níquel 0,3%; H₂O₂ 0,1%) por 10 minutos, bloqueio da reação com água destilada e contrastação com hematoxilina. O controle negativo foi realizado pela omissão do anticorpo primário.

Obtenção de amostras de hemolinfa

Amostras de hemolinfa foram coletadas em rainhas fisogástricas e operárias com dois, cinco, 10, 15, 20, 30, 60 e 100 dias de idade. As operárias foram anestesiadas a 0 °C e decapitadas, enquanto nas rainhas foi feita uma incisão no tórax com um alfinete entomológico esterilizado. Foram coletadas quantidades entre 0,5 e 0,75 μL de hemolinfa de cada formiga com auxílio de um microcapilar. As rainhas foram recolocadas nas colônias artificiais após a coleta. A hemolinfa coletada foi adicionada a

um tubo contendo 20 μ L de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2, com 5 μ L de coquetel de inibidor de proteases (Sigma) e submetidas à eletroforese SDS-PAGE como descrito acima.

Western Blotting

Os anticorpos de coelho utilizados nos ensaios de Western blotting foram inicialmente titulados a partir de extrato de ovos como antígenos e soro imune diluído em TBST, conforme descrito abaixo, nas proporções (v/v) de 1:200, 1:500, 1:1000, 1:1500 e 1:2000 e 1:4000. A dose escolhida foi aquela que apresentou melhor relação entre resolução das bandas detectadas e background. Os anticorpos obtidos apresentaram títulos mínimos de 1:2.000, porém, com melhor resolução nas diluições de 1:1.500.

Amostras de ovos e hemolinfa submetidas à SDS-PAGE foram incubadas por 20 minutos no tampão de transferência (Tris-base 0,58%; glicina 0,28%; SDS 0,037%; metanol 20%), seguido de transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose sob voltagem constante de 100V por 180 minutos. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada com solução de tampão TBS 0,1 M, pH 8,0, contendo Tween 20 a 0,1% (TBST) mais 5% de leite desnatado em pó por 1 hora em temperatura ambiente, seguido de lavagem em TBST e incubação por 16 horas com anticorpo de coelho anti-vitelogenina diluído 1:1.500 em TBST com leite em pó a 2,5%. O controle negativo foi feito incubando extrato de ovos de rainhas com soro de coelho pré-imune. A membrana foi novamente lavada em TBST e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase diluído em TBST na proporção de 1:4.000 por duas horas em temperatura ambiente, seguida de nova lavagem em TBS e revelação com

solução DAB/H₂O₂. A reação foi interrompida com água destilada e a membrana seca ao ar.

PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

O efeito do HJ na transcrição gênica de vitelogenina foi avaliado por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

Operárias com idades entre 20 e 30 dias receberam aplicação tópica de 3µL de HJ [6 µg de HJ III (Sigma)] diluído em acetona. O grupo controle recebeu a aplicação da mesma quantidade (3µL) de acetona.

As formigas foram maceradas em nitrogênio líquido 24 horas após o tratamento e o RNA total foi extraído com Trizol (Life Technologies), de acordo com instruções do fabricante. Para tanto, foi adicionado 500 µL de Trizol às amostras, seguindo-se agitação e incubação por cinco minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 135 µL de clorofórmio e os tubos foram agitados e centrifugados a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para tubos novos, seguido de adição de 335 µL de isopropanol, incubação por 10 minutos e nova centrifugação a 12000 g por 10 minutos. O precipitado obtido foi dissolvido em 750 µL de etanol e novamente centrifugado a 7500 g por cinco minutos. O etanol foi retirado e o precipitado seco ao ar, seguido de adição de 40 µL de água ultra pura e dissolução em banho-maria a 37 °C. A amostra de RNA obtida foi diluída na proporção de 1:100 (v/v) em água ultra pura. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm e sua qualidade medida pela relação DO₂₆₀/DO₂₈₀.

O cDNA foi confeccionado a partir de reações compostas por 14 µL de solução aquosa contendo 2 µg de RNA, 1 µL de oligo(dT)₂₀ 50 µM (*primer* randômico) e 2 µL

de mix de dNTPs. As amostras foram aquecidas por 5 minutos a 80 °C, centrifugadas rapidamente e colocadas no gelo. Em seguida, adicionou-se 1µL da enzima M-MuLV Reverse Transcriptase (New England BioLabs) e 2 µL de tampão próprio. As reações foram incubadas a 42 °C por 1 hora em banho-maria, seguido de inativação da transcriptase a 70 °C por 20 minutos também em banho-maria.

A reação de PCR quantitativo em tempo real foi feita no equipamento 7500 Real-Time PCR System - Applied Biosystems, utilizando o kit de quantificação por fluorescência GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), primers para o gene *vitelogenina* de *S. invicta* (Formicidae) e o gene *β-actina* de *B. mori* (Lepidoptera) como controle endógeno (Tabela 1). As reações foram montadas em duplicata, utilizando 25 µL do kit GoTaq qPCR Master Mix, 10 µL de solução de primers (sense e antisense), 2,5 µL de cDNA total e 12,5 µL de água ultra-pura fornecida pelo kit. Os primers para *vitelogenina* e *β-actina* foram utilizados na concentração de 20 pmol/µL. A reação de PCR envolveu desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 56 °C por 1 minuto e alongamento a 72 °C por 2 minutos.

Os cálculos para determinação do nível de expressão relativo do gene *vitelogenina* foram feitos tendo como referência o gene constitutivo *β-actina*, usando o método cycle threshold (Ct). O Ct é o ponto onde um aumento significativo na quantidade de amplificado em uma dada amostra, medido através de fluorescência, é primeiramente detectado. O valor de Ct é inversamente proporcional à quantidade de mRNA inicial de um gene a ser detectado. Logo, o nível de expressão relativa de um gene pode ser calculado comparando-se seus valores de Ct com aos valores de Ct de um gene de controle endógeno cuja expressão não varia em função dos tratamentos, tal

como *β-actina*. As médias dos valores de Ct para os genes *vitelogenina* e *β-actina* em cada amostra foram utilizadas para calcular a expressão relativa do gene *vitelogenina* nos grupos tratados com acetona e HJ através da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, e os valores obtidos foram comparados com auxílio do software REST (Pfaffl et al., 2002).

Tabela 1 – Primers específicos utilizados nos testes de PCR em tempo real

Gene	Acesso	Primer	Referência
<i>β-Actina</i>	AB023025	S 5'-TGCCAACACTGTCCTTTCTG-3' AS 5'-AGAATTGACCCACCAATCCA-3'	Dallacqua et al., 2007
<i>Vitelogenina</i>	CB252008	S 5'-AGAATTTGCCGCTACCTACGCT-3' AS 5'-CATTTCTGAGCTTGAATTGCAGGA-3'	Tian et al., 2004

Tratamento com HJ e dosagem de vitelogeninas por ELISA

Os testes de aplicação de hormônio juvenil foram realizados em operárias nutridoras, com idades entre 30 e 60 dias, em fase de produção de vitelogenina. A produção de vitelogenina foi confirmada pela verificação da presença de ovócitos maduros nos ovários, após a coleta de hemolinfa. Tanto a hemolinfa quanto o corpo gorduroso de operárias que não apresentaram ovócitos desenvolvidos em seus ovários foram descartados. As operárias receberam aplicação tópica no abdômen de 3μL de HJ III (Sigma) diluído em acetona na concentração de 2 μg/μL (6 μg de HJ). O grupo controle recebeu a aplicação de 3μL de acetona.

As operárias tratadas com HJ tiveram hemolinfa e corpo gorduroso coletados em 24, 48 e 72 horas após a aplicação do hormônio. No grupo controle, a hemolinfa e o corpo gorduroso foram coletados 24 horas após a aplicação da acetona. Para dosagem de vitelogenina na hemolinfa, foram montados cinco conjuntos com 25 μL de tampão

PBS 0,1 M, pH 7,2, contendo 10% (v/v) de coquetel de inibidor de proteases (Sigma), e a hemolinfa de três formigas para cada período após o tratamento. As amostras foram centrifugadas a 9000 g por 10 minutos, seguido de coleta do sobrenadante e dosagem de proteínas pelo método BCA (Smith et al., 1985).

Para determinação da dosagem da vitelogenina no corpo gorduroso, também foram montados cinco conjuntos com 200 µL de tampão PBS 0,1 M, pH 7,2, contendo 10% (v/v) de coquetel de inibidor de proteases e amostras de corpo gorduroso de três formigas para cada período após o tratamento. As amostras de corpo gorduroso foram maceradas e centrifugadas a 9000 g por 10 minutos, seguindo-se a coleta do sobrenadante e dosagem de proteínas totais pelo método BCA.

Para os testes ELISA, as doses de anticorpos anti-vitelogenina de coelhos e camundongos a serem usadas foram inicialmente determinadas através de curvas de absorvância obtidas a partir da detecção de diferentes concentrações de antígeno e anticorpos. Diferentes concentrações de antígeno (extratos de ovos de operárias nas diluições v/v 1:10.000, 1:50.000, 1:100.000 e branco) foram incubadas com anticorpo anti-vitelogenina produzido em coelho nas diluições (v/v) 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000 e 1:40.000 e anticorpo anti-vitelogenina obtido em camundongos nas diluições (v/v) 1:1.000, 1:5.000 e 1:10.000. As doses de anticorpos escolhidas foram aquelas que produziram curva de absorvância onde os pontos obtiveram maior diferença entre si e entre a curva obtida na ausência de antígeno (branco).

A quantidade de vitelogenina contida nas amostras de hemolinfa e corpo gorduroso foi dosada pelo método ELISA de captura (sanduíche), utilizando os anticorpos anti-vitelogenina obtidos em coelhos e camundongos. O anticorpo anti-

vitelogenina produzido em coelho foi utilizado na diluição 1:5.000, enquanto o anticorpo produzido em camundongo foi utilizado na diluição 1:1.000.

Os poços utilizados para o teste foram sensibilizados com 100 µL de anticorpo de coelho diluído 1:5.000 em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,6, por 16 horas a 4 °C. Em seguida, a placa foi esvaziada e os poços cobertos com 300 µL de solução de albumina 1% em PBST (PBS + Tween a 0,05%) por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse período, os poços foram lavados com PBST e incubados com 100 µL de solução de hemolinfa ou corpo gorduroso diluídos em PBST. Nos poços contendo hemolinfa foram aplicados cinco µg de proteínas totais, enquanto nos poços contendo extrato de corpo gorduroso foram aplicados 20 µg de proteínas totais. As amostras foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBST, foi adicionado 100 µL de anticorpo de camundongo anti-vitelogenina diluído 1:1.000 em PBST e mantido por 2 horas em temperatura ambiente. Os poços foram novamente lavados com PBST e incubados com 100 µL de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:9000 em PBST, por 2 horas em temperatura ambiente, seguido de nova lavagem com PBST. A revelação foi feita com solução de TMB em tampão fosfato/citrato, pH 5,0. A reação foi interrompida com 20 µL de solução de H₂SO₄ a 5% em água destilada, seguido de leitura a 450 nm em espectrofotômetro de placa.

A determinação da quantidade de proteínas foi feita com auxílio de curva padrão utilizando diluições seriadas de extrato de ovos de operárias de *E. tuberculatum*. As amostras de hemolinfa e corpo gorduroso foram dosadas em triplicata, e os valores obtidos em cada tratamento foram comparados com os valores obtidos na amostra controle pelo teste *t-sudent*, com 5% de significância.

RESULTADOS

As análises em SDS-PAGE comparando extratos de ovos de rainhas e operárias de *E. tuberculatum* mostraram diferenças no perfil protéico entre as castas. Os ovos de operárias apresentaram duas proteínas principais, com massas moleculares de 31 e 156 kDa, enquanto os ovos de rainhas apresentaram oito proteínas principais, sendo que quatro, com massas moleculares de 31, 36, 123 e 156 kDa, apareceram com maior intensidade e os outros quatro polipeptídeos apresentaram massas moleculares de 81, 86, 96 e 101 kDa (Figura 1).

As amostras de hemolinfa de operárias de diferentes idades apresentaram diferenças no perfil protéico. Proteínas de 43, 84, 89 e 195 kDa ocorreram nas amostras de operárias de todas as idades estudadas (Figura 1). A hemolinfa de operárias com dois e cinco dias de idade apresentou uma proteína de aproximadamente 120 kDa que não ocorreu na hemolinfa das operárias de outras idades. Operárias com dois e cinco dias de idade não apresentaram as proteínas de 31 e 156 kDa presentes nos ovócitos das operárias. Aos 10 dias, essas proteínas são levemente detectadas, mas já aparecem em maiores quantidades na hemolinfa de operárias com 15, 20, 30 e 60 dias de idade. A partir dos 20 dias de idade, todas as formigas apresentaram as proteínas de 38, 71 e 135 kDa. Operárias com 100 dias de idade não apresentaram as proteínas de 31 e 156 kDa (Figura 1). A hemolinfa de rainhas apresentou principalmente as proteínas de 85, 135, 156 e 195 kDa, enquanto as proteínas de 31 e 43 kDa foram levemente detectadas (Figura 1).

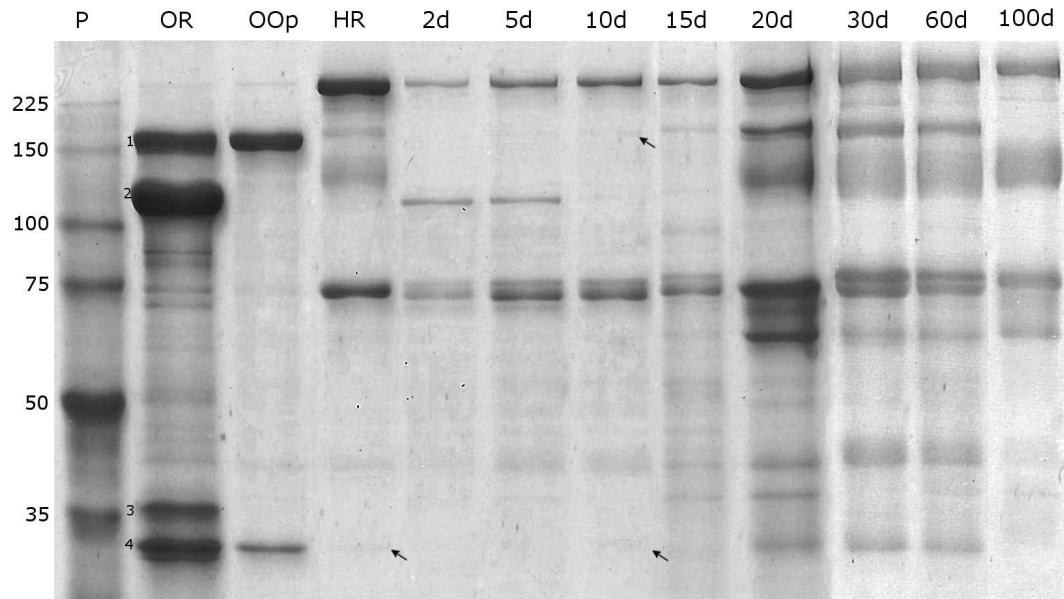


Figura 1. SDS-PAGE mostrando perfil protéico do ovo e hemolinfa de rainhas e operárias de *Ectatoma tuberculatum*. As bandas identificadas como vitelinas estão indicadas pelos números 1 (156 kDa), 2 (123 kDa), 3 (36kDa) e 4 (31 kDa). P, padrão de peso molecular seguido dos valores em kDa. Ovo de rainha (OR). Ovo de operária (OOp). Hemolinfa de rainha (HR). Hemolinfa de operária com 2 (2d), 5 (5a), 10 (10d), 15 (15d), 20 (20d), 30 (30d), 60 (60d) e 100 (100d) dias de idade. As setas indicam bandas levemente marcadas.

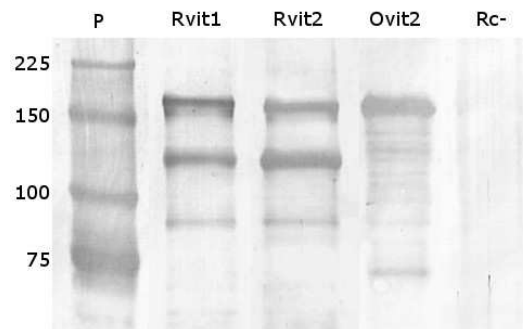


Figura 2. Western blotting em extratos de ovos de rainhas e operárias de *Ectatomma tuberculatum* utilizando anticorpos anti-vitelogenina. Os anticorpos vit1 e vit2 marcaram positivamente as bandas de 123 e 156 kDa de rainhas. Notar a reação positiva para proteínas menores. P, padrão de peso molecular seguido dos respectivos valores em kDa; Rvit1, extrato de ovo de rainha marcado com anticorpo vit1; Rvit2, extrato de ovo de rainha marcado com anticorpo vit2; Ovit2, extrato de ovo de operária marcado com anticorpo vit2. Rc-, controle negativo feito pela reação entre extrato de ovo de rainha e soro pré-imune.

Para verificar a presença de vitelogenina nas diferentes idades e castas, as proteínas mais abundantes nos ovos de rainhas (Figura 1) foram isoladas e utilizadas para imunização e produção de anticorpos. Os anticorpos produzidos em coelhos e obtidos para as proteínas de 156 e 123 kDa foram denominados respectivamente vit1 e vit2.

Os anticorpos vit1 e vit2 foram utilizados em ensaios de Western blotting em amostras de ovos e hemolinfa de rainhas e operárias. As análises mostraram que os dois anticorpos reconheceram as proteínas de 123 e 156 kDa e algumas proteínas menores em ambas as amostras (Figura 2).

Testes de imunolocalização foram realizados para confirmar se as proteínas isoladas correspondem à vitelogenina. A imunofluorescência (Figuras 3A-C) e a imunohistoquímica (Figuras 3D-F) mostraram reações positivas para os anticorpos vit1 e vit2 nas células do corpo gorduroso e em ovócitos. As células do corpo gorduroso apresentaram núcleo central e vacúolos grandes (Figuras 3D-E). Os grânulos marcados positivamente foram observados ao redor destes, tendendo a se concentrar na periferia das células (Figuras 3D-E). Nos ovócitos, os grânulos positivos foram observados espalhados dentro do ovócito (Figura 3B).

Nas análises de hemolinfa, os anticorpos reconheceram a proteína de 156 kDa nas amostras de rainha e operárias com cinco, 10, 15, 20, 30 e 60 dias (Figura 4). Maior intensidade de reação foi obtida nas amostras de operárias de formigas com 20, 30 e 60 dias de idade. Operárias com dois e 100 dias de idade não apresentaram reações positivas para ambos os anticorpos (Figura 4). A proteína de 120 kDa das operárias de dois e cinco dias e a de 135 kDa das operárias a partir dos 20 dias de idade não foram detectadas pelos anticorpos (Figura 4).

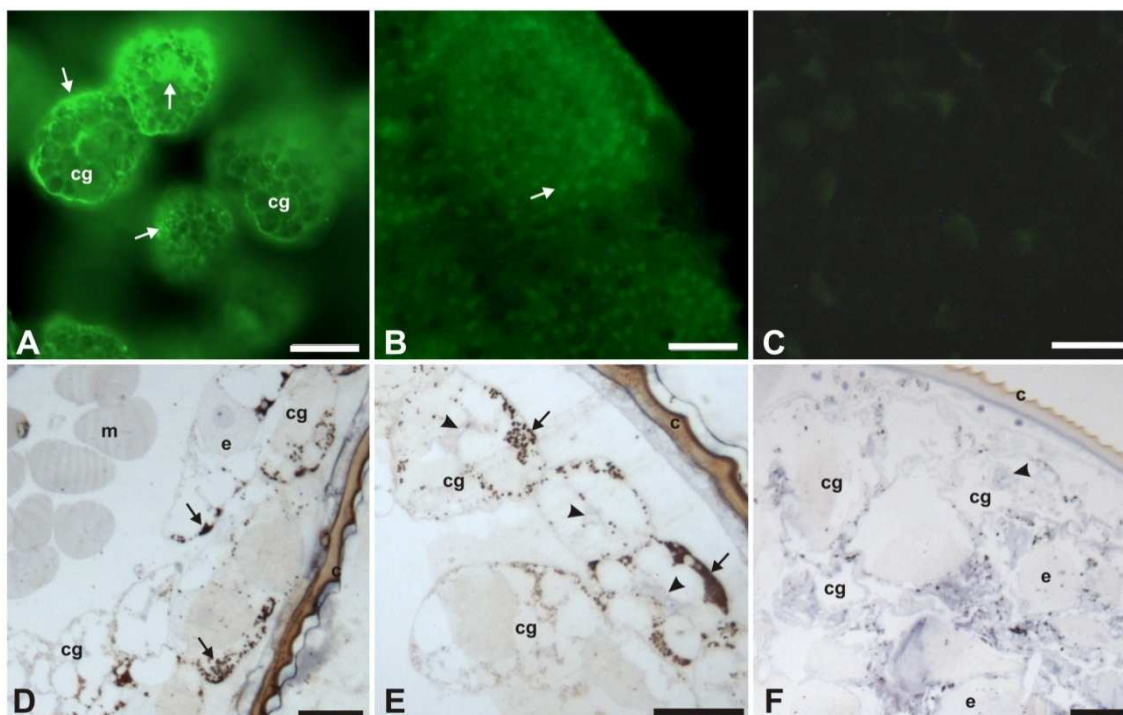


Figura 3. Imunomarcção em corpo gorduroso e ovócito de operárias de *Ectatomma tuberculatum* com anticorpos anti-vitelogenina. **A.** Imunofluorescência no corpo gorduroso. Anticorpo vit2. Barra = 50 μ m. **B.** Ovócito marcado com anticorpo vit1. Barra = 50 μ m. A marcação positiva em A e B pode ser evidenciada pela forte coloração verde (setas). **C.** Imunofluorescência em corpo gorduroso. Controle negativo. Barra = 50 μ m. **D.** Imunohistoquímica em corpo gorduroso mostrando grânulos marcados (seta) com anticorpo vit1. Barra = 20 μ m. **E.** Corpo gorduroso, anticorpo vit2. Barra = 20 μ m. **F.** Corpo gorduroso, Controle negativo. Os pontos escuros são artefatos do processo de contraste com hematoxilina. Barra = 20 μ m. c, cutícula do tergito; cg, corpo gorduroso; e, enócitos; m, músculo; ponta de seta, núcleo das células do corpo gorduroso.

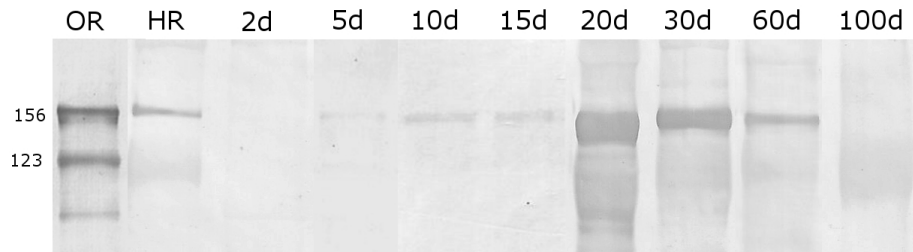


Figura 4. Western blotting em amostras de hemolinfa de rainha (HR) e operárias de *Ectatomma tuberculatum* com dois (2d), cinco (5d), 10 (10d), 15 (15d), 20 (20d), 30 (30d), 60 (60d) e 100 (100d) dias de idades marcadas com anticorpo anti-vitelogenina vit2. OR, amostra de ovo de rainha indicando as duas principais bandas de vitelinas e suas respectivas massas em kDa.

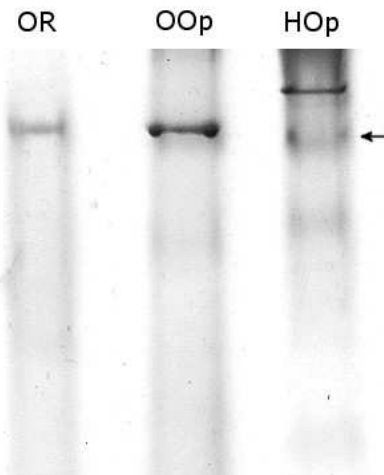


Figura 5. Eletroforese em gel nativo descontínuo de poliacrilamida mostrando vitelinas nativas de ovos de rainhas (OR) e operárias (OOp) de *Ectatomma tuberculatum*. Uma proteína nativa com peso similar (seta) foi encontrada na hemolinfa de operárias (HOp). O peso molecular das vitelinas dos ovos foi estimado entre 400 e 500 kDa (Wheeler et al., 1999).

As vitelinas nativas de rainhas e operárias foram comparadas e seus ovos apresentaram a mesma proteína principal (Figura 5). Na hemolinfa de operárias com 30 dias de idade, uma proteína nativa com tamanho similar foi identificada (Figura 5).

Os valores de médios de Ct dos genes *vitelogenina* e β -*actina* nas amostras tratadas com acetona e com HJ III estão apresentados na Tabela 2 e foram utilizados para calcular a expressão relativa do gene *vitelogenina* entre os tratamentos (Tabela 2; Figura 6). A comparação da expressão gênica entre os tratamentos mostrou que a aplicação de HJ III reduziu em cerca de 90% a quantidade de mRNA para vitelogenina em relação ao grupo controle, tratado com acetona (Tabela 2; Figura 6).

Tabela 2 - Valores médios (\pm EP) de Ct e expressão gênica de *vitelogenina* em relação à β -*actina* nas amostras tratadas com acetona (controle) e hormônio juvenil.

Tratamento	Ct <i>Vg</i>	Ct β - <i>actina</i>	Média da expressão <i>Vg</i> / β - <i>actina</i>	Expressão de <i>Vg</i> entre tratamentos
Acetona	35,51 \pm 0,21	31,86 \pm 0,76	0,43 \pm 0,15	1,000
HJ III	35,92 \pm 0,22	28,95 \pm 0,50	0,02 \pm 0,01	0,101*

*Diferença significativa ($p = 0,004$) de acordo com o modelo *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test* – software REST (Pfaffl et al., 2002).

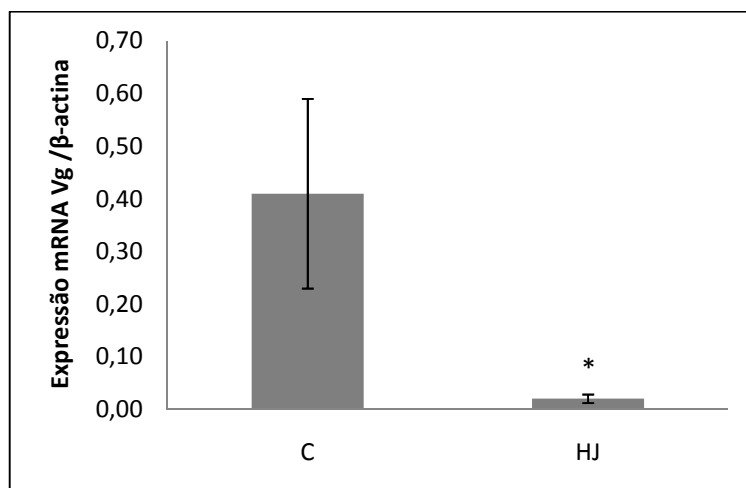


Figura 6. Expressão relativa do gene *vitelogenina* em operárias de *Ectatomma tuberculatum* em 24 horas após tratamento com 6 μ g de HJ III (HJ) e acetona (C). *A diferença de expressão gênica entre os tratamentos é significativa ($p = 0,004$).

O cálculo da quantidade de vitelogenina nas amostras de corpo gorduroso foi feito por teste ELISA, a partir de equação obtida com curva padrão utilizando diferentes diluições de extrato de ovos de operárias como antígeno. Comparado ao grupo controle tratado com acetona, operárias tratadas com 6 µg de HJ III apresentaram redução significativa na quantidade de vitelogenina nos períodos de 24 ($p = 0,02$) e 48 ($p = 0,01$) horas após o tratamento (Figura 7). As operárias do grupo controle apresentaram média de $1,7 \pm 0,3$ ng de vitelogenina por µg de proteína, enquanto as operárias tratadas com HJ III tiveram médias de $0,8 \pm 0,07$ e $0,7 \pm 0,14$ ng/µg de proteína 24 e 48 horas após a aplicação do hormônio, respectivamente. Após 72 horas da aplicação do HJ III, os níveis de vitelogenina detectados não diferiram dos níveis das formigas do grupo controle ($1,3 \pm 0,2$ ng/µg; $p > 0,05$; Figura 7).

O cálculo da quantidade de vitelogenina nas amostras de hemolinfa também foi feito a partir de curva padrão utilizando extrato de ovos de operárias como antígeno. Operárias tratadas com 6 µg de HJ III apresentaram redução significativa nos níveis de vitelogenina na hemolinfa em relação ao grupo controle após 24 horas ($p = 0,03$; Figura 8). A hemolinfa das operárias que não receberam aplicação de HJ III apresentou média de 16 ± 3 ng de vitelogenina por µg de proteína, enquanto as operárias tratadas com HJ III apresentaram média de $7,3 \pm 2$ ng/µg de proteínas após 24 horas. Os níveis de vitelogenina aumentaram após 48 (12 ± 3 ng/µg) e 72 horas (16 ± 4 ng/µg) de aplicação do hormônio, ambos não diferindo dos níveis das formigas do grupo controle ($p > 0,05$; Figura 8).

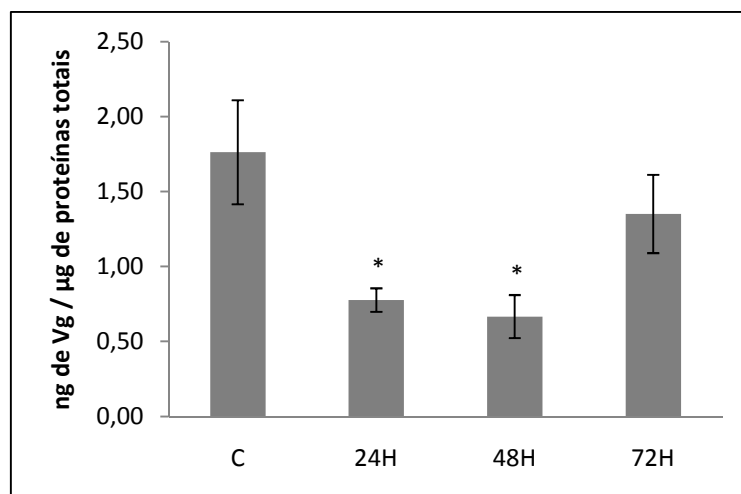


Figura 7. Vitelogenina no corpo gorduroso de operárias de *Ectatomma tuberculatum* tratadas com acetona (C) e em 24, 48 e 72 horas após aplicação tópica de 6 µg de HJ III. (*) diferenças significativas em relação ao grupo controle, medido pelo teste *t*-student ($p < 0,05$).

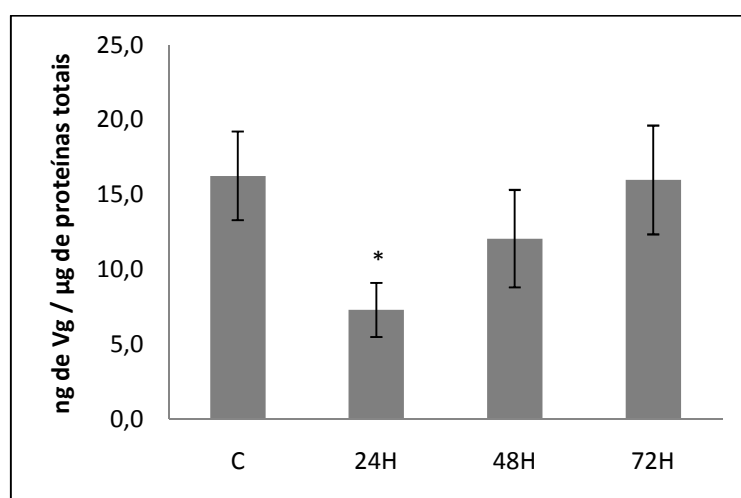


Figura 8. Dosagem de vitelogenina na hemolinfa de operárias de *Ectatomma tuberculatum* tratadas com acetona (C) e em 24, 48 e 72 horas após aplicação tópica de 6 µg de HJ III. (*) diferenças significativas em relação ao grupo controle, medido pelo teste *t*-student ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Em ovos de rainhas de espécies de formigas das subfamílias Ectatomminae, Myrmicinae e Ponerinae, as vitelinas são formadas por dois ou mais polipeptídeos de diferentes tamanhos (Wheeler et al., 1999; Lewis et al., 2001). Nossos dados mostraram que os ovos de rainhas de *E. tuberculatum* apresentam vitelinas constituídas por quatro polipeptídeos principais, enquanto nos ovos de operárias as vitelinas são compostas por apenas duas dessas proteínas. Em rainhas de *E. tuberculatum*, os quatro polipeptídeos formam uma vitelina que em sua forma nativa apresenta peso molecular entre 400 e 500 kDa (Wheeler et al., 1999). Entretanto, nossos resultados mostram que as proteínas de 156 e 31 kDa dos ovos de operárias formam uma proteína oligomérica similar à vitelina nativa encontrada nos ovos de rainhas.

As vitelinas correspondem à maior fração das proteínas encontradas nos ovos de insetos (Raikhel e Dhadialla, 1992; Tufail e Takeda, 2008), e os polipeptídios que apareceram em maior quantidade nos extratos de ovos de *E. tuberculatum* foram utilizados para produção de anticorpos. As análises em imunofluorescência e imunohistoquímica mostraram que esses polipeptídeos estão presentes nas células do corpo gorduroso, principal sítio de produção de suas precursoras vitelogeninas (Bownes, 1986; Raikhel e Dhadialla, 1992), e também em grânulos nos ovócitos, confirmando que correspondem às vitelinas e/ou vitelogeninas.

A comparação entre as vitelinas presentes nos ovos de rainhas e operárias e entre as vitelogeninas da hemolinfa de rainhas e operárias mostrou que só os polipeptídeos de 156 e 31 kDa são compartilhados, sugerindo que a vitelogenina circulante na hemolinfa de *E. tuberculatum* é formada por apenas esses dois polipeptídeos. Além disso, a

presença de uma proteína nativa na hemolinfa das operárias semelhante às vitelinas nativas dos ovos sugere que a vitelogenina circulante na hemolinfa tem tamanho similar ao das vitelinas.

Os polipeptídeos de 36 e 123 kDa presentes nos ovos de rainhas podem ser resultado de clivagem adicional sofrida pelo polipeptídeo de 156 kDa dentro dos ovócitos (Figura 9), fato que pode ser comprovado pela existência de reação cruzada entre os anticorpos vit1 e vit2, obtidos a partir dos polipeptídeos de 156 e 123 kDa. Além disso, a hemolinfa de rainhas apresenta apenas os polipeptídios de 31 e 156 kDa, e não o de 123 kDa. Na barata *B. germanica*, vitelogeninas de 160 kDa são clivadas em subunidades de 95 e 50 kDa após a internalização no ovócito (Wojchowski et al., 1986). Análises de vitelogeninas e vitelinas de diferentes espécies de vespas mostraram que essas proteínas são similares em suas propriedades imunológicas e físico-químicas, sendo que as diferenças parecem estar na quantidade de lipídios associados e em modificações como clivagem e fosforilação no interior do ovócito (Takadera et al., 1996).

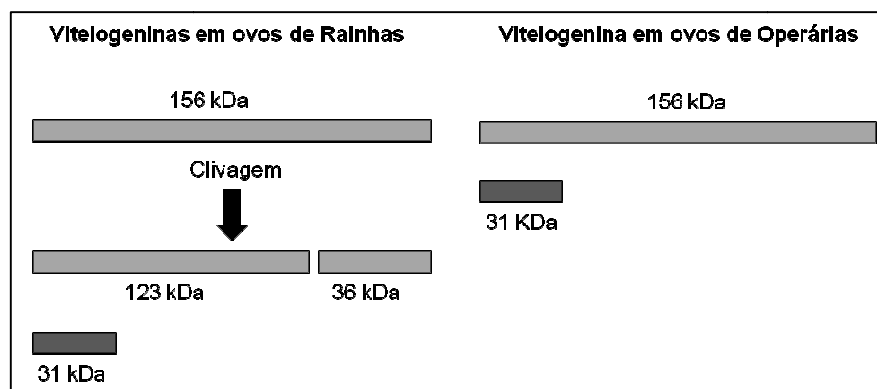


Figura 9. Esquema mostrando a clivagem sofrida pela vitelogenina de 156 kDa em ovos de rainhas de *Ectatomma tuberculatum*, originando os peptídios de 123 e 36 kDa. Nos ovos de operárias não há clivagem e apenas os peptídios de 31 e 156 kDa são encontrados.

A diferença de processamento observada entre os ovos de rainhas e operárias de *E. tuberculatum* pode ser devido à ausência de proteases ativas nos ovos de operárias ou pela não ativação dessas proteases dentro dos ovos tróficos em função da ausência de desenvolvimento embrionário (Giorgi et al., 1999; Khila e Abouheif, 2008). À medida que avança o desenvolvimento embrionário, as vitelinas sofrem clivagens específicas dentro do ovócito resultando em peptídeos menores. Essas clivagens são feitas por proteases associadas aos grânulos de vitelo, as quais podem ser sintetizadas tanto dentro do ovócito quanto extraovariamente na forma de pró-proteases e que são ativadas com o início do desenvolvimento embrionário (Giorgi et al., 1999).

A perda de reatividade do anticorpo vit2 com a proteína de 36 kDa dos ovos de rainhas de *E. tuberculatum* pode ser devido à baixa imunogenicidade dessa porção da vitelina ou pela baixa quantidade de anticorpos no soro policlonal produzido contra a proteína de 156 kDa que se liga à essa porção de 36 kDa. Em operárias de *A. mellifera*, a vitelogenina de 180 kDa é quebrada em dois fragmentos de diferentes tamanhos corpo gorduroso, sendo um N-terminal de 40 kDa e outro C-terminal de 150 kDa. Anticorpos produzidos contra a proteína de 180 kDa não reconheceram o fragmento de 40 kDa (Havukainen et al., 2011). A proteína de 36 kDa também foi utilizada como imunógeno, mas o anticorpo obtido não foi satisfatório.

Em relação às outras proteínas presentes na hemolinfa das operárias de *E. tuberculatum*, as proteínas de 195 e 80 kDa podem ser subunidades de lipoforinas e hexamerinas, conforme descrito para outras espécies de formigas (Martínez et al., 2000; Wheeler e Buck, 1995; Wheeler e Martínez, 1995). As lipoforinas atuam como carreadoras de lipídios enquanto as hexamerinas têm importantes papéis como proteínas de reserva nutricional, no transporte de hormônios, em eventos ligados à imunidade e

formação da cutícula (Burmester, 1999). A proteína de 120 kDa encontrada na hemolinfa de operárias de *E. tuberculatum* com dois e cinco dias pode ser uma hexamerina remanescente dos estágios pupais e que vai sendo eliminada da hemolinfa nos primeiros dias após a emergência, conforme descrito para uma hexamerina de 110 kDa em outras formigas (Wheeler e Buck, 1995).

Nossos dados indicam que a produção de vitelogenina está relacionada tanto a idade quanto ao ciclo ovariano das operárias de *E. tuberculatum*. Traços de vitelogenina foram detectados pelo Western blotting na hemolinfa das operárias a partir do quinto dia após a emergência, e a quantidade de vitelogenina se mantém baixa ainda aos 10 e 15 dias após a emergência. A idade a partir do qual os ovários das operárias de *E. tuberculatum* começam a se desenvolver é variável, sendo que até a segunda semana após a emergência podem ser encontradas operárias com ovários sem folículos, apenas com células indiferenciadas, e também indivíduos com ovócitos em início de acúmulo de vitelogenina (Fénéron e Billen, 1996).

A vitelogenina é detectada em maiores quantidades na hemolinfa de operárias com 20 dias de idade, período em que são observados ovócitos em desenvolvimento, porém não completamente maduros (Fénéron e Billen, 1996). A vitelogenina está presente na hemolinfa de operárias com 30 e 60 dias, período de máximo desenvolvimento dos ovócitos e consequente postura (Fénéron e Billen, 1996). Ovócitos ainda são encontrados por volta dos 90 dias de idade, mas os ovários já se apresentam em estágio de regressão, dada a diminuição do número de ovócitos (Fénéron e Billen, 1996). A vitelogenina não é detectada na hemolinfa de operárias com mais de 100 dias de idade, período em que as operárias apresentam ovários degenerados (Fénéron e Billen, 1996).

A síntese de vitelogenina nas operárias de *E. tuberculatum* é regulada pelo HJ. Nossos dados mostram que a expressão de vitelogenina é reduzida após aplicação de HJ III, assim como a quantidade dessa proteína nas células do corpo gorduroso e na hemolinfa. Além disso, o efeito da aplicação de HJ não é permanente, visto que a produção de vitelogenina é restabelecida após 72 horas. Na grande maioria dos insetos adultos, o HJ estimula a síntese de vitelogenina (Hagedorn e Kunkel, 1979). Nos Hymenoptera altamente eussociais, entretanto, síntese de vitelogenina e desenvolvimento ovariano apresentam relação inversa com os níveis de HJ (Robinson e Vargo, 1997; Hartfelder, 2000). Na formiga *Streblognathus peetersi* (Ponerinae), a operária alfa reprodutiva é a única que possui ovário desenvolvido o suficiente pra produzir ovos e também apresenta maiores concentrações de vitelogenina na hemolinfa. A aplicação de HJ nessas operárias reduz a quantidade de vitelogenina circulante, assim como afeta seu status reprodutivo, aumentando a probabilidade de perder seu posto de formiga dominante (Cuvillier-Hot et al., 2004). Da mesma forma, a aplicação tópica de alta dose do análogo do HJ piriproxifem em *A. mellifera* inibe a síntese de vitelogenina em operárias e rainhas adultas, reduzindo sua concentração nas células do corpo gorduroso e na hemolinfa (Pinto et al., 2000). Além disso, em condições naturais, um aumento nos níveis de HJ circulante na hemolinfa de operárias adultas de *A. mellifera* tem relação com a diminuição na quantidade de vitelogenina circulante (Robinson e Vargo, 1997).

Neste trabalho, não estudamos o efeito do HJ na captação de vitelogenina pelos ovócitos. O HJ ativa canais iônicos nas células foliculares, promovendo um aumento nos espaços intercelulares e permitindo que a vitelogenina chegue à superfície dos ovócitos, onde é captada por receptores específicos e endocitada (Raikhel e Dahadialla,

1992; Tufail e Takeda 2009). A redução nos níveis de transcrição do gene *vitelogenina* e da quantidade desta proteína no corpo gorduroso das operárias de *E. tuberculatum* sugere que a diminuição da vitelogenina na hemolinfa sob efeito do HJ se deve mais à diminuição da síntese que a captação pelos ovários. Em rainhas de *S. invicta*, a produção de vitelogenina ocorre independentemente do desenvolvimento ovariano (Lewis et al., 2001). Nessa espécie de formiga, o efeito gonadotrópico do HJ provavelmente está mais ligado à captação da vitelogenina pelos ovários que à própria síntese, visto que o HJ induz a maturação do ovário em rainhas virgens (Lewis et al., 2001; Burns et al., 2002, Brent e Vargo, 2003) e influencia a síntese de receptores para vitelogenina no ovário (Chen et al., 2004). Assim, nossos resultados sugerem que a relação entre vitelogenina e HJ encontrada em operárias de *E. tuberculatum*, as quais não se reproduzem, é semelhante àquela em fêmeas reprodutoras e operárias de outros Hymenoptera altamente eussociais.

A síntese de vitelogenina em operárias de *E. tuberculatum* tem relação com a idade e o desenvolvimento dos ovários, indicando ser mais um fator a se considerar na manutenção do polietismo etário (Quadro 1). Na maioria das espécies de formigas, as operárias iniciam seu desenvolvimento executando atividades dentro da colônia e, quando mais velhas, exercem outras tarefas fora da colônia (Hölldobler e Wilson, 1990). Em *E. tuberculatum*, as operárias mostram uma progressão gradual de atividades intranidais para extranidais à medida que envelhecem (Champalbert e Lachaud, 1990; Fénéron e Jaisson, 1995; Fénéron et al., 1996). Na primeira semana, as operárias se envolvem em atividades de reconhecimento de outras operárias e cria, não exercendo nenhuma função específica. A partir da segunda semana, as operárias direcionam seus cuidados para os ovos, larvas e pupas, podendo ser consideradas nutridoras. Por volta

dos 30 dias, as operárias mantêm como atividade predominante o cuidado com a cria, mas tendem a iniciar atividades não específicas tal como explorar a colônia (Champalbert e Lachaud, 1990; Fénéron e Jaisson, 1995). Nossos dados mostram que a vitelogenina não é secretada no período de estabilização das interações sociais das operárias recém-emergidas (zero-cinco dias), começa a ser secretada em maiores quantidades quando elas iniciam as atividades de cuidado com a cria (15 - 20 dias), e é mantida no período em que as operárias trabalham como nutridoras (30 - 60 dias). A secreção de vitelogenina se encerra no período em que as operárias começam a executar atividades de manutenção como limpeza, guarda e forrageio, o que acontece por volta dos 90 dias (Fénéron e Billen, 1996).

Quadro 1. Relação entre polietismo etário e produção de vitelogenina em operárias de *Ectatomma tuberculatum*

Período após a emergência	Atividade exercida pela operária*	Produção de vitelogenina
0 - 7 dias	Atividades de reconhecimento de outras operárias e cria, não exercendo nenhuma função específica.	Vitelogenina começa a ser secretada por volta do 5º dia.
7 - 15 dias	Operárias iniciam seus cuidados para os ovos, larvas e pupas.	Baixo nível de produção de vitelogenina.
30 - 60 dias	Cuidado com a cria é predominante, mas iniciam-se atividades não específicas como exploração.	Vitelogenina aparece em grande quantidade na hemolinfa.
100 dias	Atividades de limpeza, guarda e forrageamento.	Vitelogenina já não é mais sintetizada.

*Champalbert e Lachaud, 1990; Fénéron e Jaisson, 1995

A relação entre produção de vitelogenina, idade e polietismo etário observada em *E. tuberculatum* pode ser comparada ao descrito para *A. mellifera*, principal modelo

de estudo dos efeitos da vitelogenina no polietismo etário em Hymenoptera eussociais. Nessa abelha, as operárias permanecem dentro da colônia executando tarefas associadas ao cuidado da cria nas primeiras semanas de vida, e quando mais velhas, passam a executar tarefas fora da colônia tais como coleta de néctar, pólen, água e própolis, além da defesa da colônia (Amdam et al., 2009). Os níveis de vitelogenina na hemolinfa das operárias de *A. mellifera* são mínimos logo após a emergência, mas aumentam rapidamente a partir do terceiro dia, tornando-se a principal proteína na hemolinfa das nutridoras (Pinto et al., 2000). A partir da terceira semana, a quantidade de vitelogenina na hemolinfa começa a diminuir, tornando-se mínimo em operárias forrageiras (Nelson et al., 2007). A aplicação de alta dose de HJ em operárias de *E. tuberculatum* reduz a quantidade de vitelogenina na hemolinfa. Da mesma forma, a diminuição na quantidade de vitelogenina na hemolinfa das operárias forrageiras de *A. mellifera* está relacionada a um aumento, ligado à idade, nos níveis de HJ circulante (Huang et al., 1991; Jassim et al., 2000). Outro fator a se considerar na manutenção da transição de tarefas em operárias de *A. mellifera* é o contato com a cria. Operárias em contato com altas doses de um feromônio produzido pela cria forrageiam pela primeira vez em idades mais avançadas, e o atraso no forrageamento pode estar relacionado à inibição da síntese de HJ pelo feromônio (Le Conte et al., 2000). Entretanto, o efeito do feromônio de cria na transição de tarefas das operárias pode estar mais ligado a outros fatores fisiológicos que na variação na produção de HJ (Le Conte et al., 2000).

O polietismo etário em *E. tuberculatum* pode ser regulado pela vitelogenina conforme modelo proposto para *A. mellifera* pela Hipótese da Repressão Dupla (Amdam e Omholt, 2003). A base dessa hipótese é que a vitelogenina é o principal agente regulador da transição de tarefas entre nutridoras e forrageiras, partindo do ponto

em que operárias que acumulam vitelogenina permanecem dentro da colônia, enquanto aquelas com baixa quantidade dessa proteína, sujeitas a condições menos favoráveis de nutrição e sobrevivência, saem para o forrageio (Omholt e Amdam, 2004). Nesse modelo, a vitelogenina atua como um repressor interno do forrageio, enquanto um sinal emitido pelas forrageiras atua como um repressor externo (Amdam e Omholt, 2003). A inibição da produção de vitelogenina por RNAi adianta o início dos vôos de forrageio em operárias nutridoras (Nelson et al., 2007; Marco Antonio et al., 2008), assim como a saída de operárias da colônia pode ser atrasada pela presença de outras forrageiras ou por exposição a feromônios provenientes delas transmitidos via trofalaxia (Leoncini et al., 2004). Ambos repressores competem pela supressão do HJ, que seria um reforçador do forrageio (Amdam et al., 2003). Tanto a inibição da produção de vitelogenina quanto a diminuição no sinal das forrageiras causa um aumento nos níveis de HJ (Leoncini et al., 2004; Guidugli et al., 2005). O forrageio inicia quando um dos inibidores diminui, aumentando os níveis de HJ, que por sua vez, reforça a redução na quantidade de vitelogenina por feedback (Pinto et al., 2000; Guidugli et al., 2005; Nelson et al., 2007; Amdam et al., 2007). Dessa forma, operárias com altos níveis de vitelogenina não abandonariam sua função de nutridoras. Mas quando a produção de vitelogenina diminui ou o número de nutridoras é muito maior que o de forrageiras, os níveis de HJ sobem, reforçando a queda nos níveis de vitelogenina e aumentando a probabilidade de forrageio (Amdam e Omholt, 2003; Omholt e Amdam, 2004; Amdam et al., 2007). Essa relação pode ser inferida em *E. tuberculatum* por causa da parada na produção de vitelogenina nas operárias em idade de forrageio e a redução de sua síntese sob influencia da alta dose de HJ aplicada.

A saída da colônia para o forrageio também pode ser vista como um efeito do envelhecimento em operárias e rainhas de Hymenoptera eussociais (Heinze e Schrempf, 2008). A produção de vitelogenina cessa nas operárias de *E. tuberculatum* em idade de forrageio, e essa tarefa é executada pelos indivíduos mais velhos da colônia (Fénéron et al., 1996). A interrupção da produção de vitelogenina é um fator que pode vir a comprometer a imunidade, a nutrição e a resistência ao estresse oxidativo (Amdam et al., 2004; Toth e Robinson, 2005; Corona et al., 2007), e esses fatores favorecem o envelhecimento e reduzem a longevidade (Muller et al., 2007). A longevidade em insetos sociais está associada às taxas de mortalidade extrínseca (Keller e Genoud, 1997). Operárias de formigas e abelhas que executam atividades fora da colônia estão mais sujeitas ao risco de morte por fatores externos que aquelas que permanecem dentro da colônia. Logo, devem apresentar taxas de envelhecimento maiores e, conseqüentemente, menor longevidade (Keller e Genoud, 1997; Chapuisat e Keller, 2002; Heinze e Schrempf, 2008). Da mesma forma, as rainhas ou operárias alfa de insetos sociais apresentam longevidade maior que as operárias da mesma espécie (Keller e Genoud, 1997). A menor longevidade dos indivíduos sujeitos a um maior risco de mortalidade extrínseca tem relação com economia de energia ou recursos para a colônia, pois é mais vantajoso investir recursos na manutenção somática de um organismo que tem um risco menor de morrer (Chapuisat e Keller, 2002). Com base nessa teoria, o início das atividades de forrageio das operárias de formigas, assim como nas abelhas, tem relação com a diminuição da produção de vitelogenina devido seu efeito negativo no organismo.

CONCLUSÕES

- ✓ As vitelogeninas em *Ectatomma tuberculatum* são formadas por duas proteínas de 31 e 156 kDa.
- ✓ As vitelogeninas são processadas de maneira diferente em ovos de rainhas e operárias de *E. tuberculatum*.
- ✓ A produção de vitelogenina em operárias de *E. tuberculatum* varia com a idade e é inibida pelo hormônio juvenil.
- ✓ A produção de vitelogenina tem relação com o polietismo etário apresentado por essa espécie.

REFERÊNCIAS

- Amdam, G.V., Omholt, S.W., 2003. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*, 223, 451-464.
- Amdam, G.V., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W., 2003. Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 100, 1799-1802.
- Amdam, G.V., Simões, Z.L.P., Hagen, A., Norberg, K., Schrøder, K., Mikkelsen, O., Kirkwood, T.B.L., Omholt, S.W., 2004. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology*, 39, 767-773.
- Amdam G.V., Nilsen K.A., Norberg K., Fondrk, M.K., Hartfelder, K., 2007. Variation in endocrine signaling underlies variation in social life history. *American Naturalist*, 170, 37-46.
- Amdam, G.V., Ihle, K.E., Page Jr., R.E., 2009. Regulation of honeybee worker (*Apis mellifera*) life histories by vitellogenin. In *Hormones, Brain and Behavior*, 2 ed., pp. 1003-1025.
- Antonialli-Junior, W.F., Giannotti, E., 2001. Nest architecture and population dynamics of the Ponerinae ant *Ectatomma edentatum* (Hymenoptera, Formicidae). *Sociobiology*, 38, 1-12.
- Barchuk, A.R., Bitondi, M.M.G., Simões, Z.L.P., 2002. Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, 2:1, 8 pp.
- Bell, W.J., 1973. Factors controlling initiation of vitellogenesis in a primitively social bee, *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Halictidae). *Insectes Sociaux*, 20, 253-260.

- Bitondi, M.M.G, Simões, Z.L.P., 1996. The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titers in Africanized *Apis mellifera* workers. *Journal of Apicultural Research*, 35, 27-36.
- Bloch, G., Borst, D.W., Huang, Z.Y., Robinson, G.E., Cnaani, J., Hefetz, A., 2000. Juvenile hormone titers, juvenile hormone biosynthesis, ovarian development and social environment in *Bombus terrestris*. *Journal of Insect Physiology*, 46, 47-57.
- Bownes, M., 1986. Expression of the genes coding for vitellogenin (yolk protein). *Annual Review of Entomology*, 31, 507-531
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brent, C.S., Vargo, E.L., 2003. Changes in juvenile hormone in maturing virgin queens of *Solenopsis invicta*. *Journal of Insect Physiology*, 49, 967-974.
- Brent, C., Peeters, C., Dietmann, V., Crewe, R., Vargo, E., 2006. Hormonal correlates of reproductive status in the queenless ponerine ant, *Streblognathus peetersi*. *Journal of Comparative Physiology A*, 192, 315-320.
- Burmester, T., 1999. Evolution and function of the insect hexamerins. *European Journal of Entomology*, 96, 213-225.
- Burns, S.N., Teal, P.E.A., Vander Meer, R.K., Nation, J.L., Vogt, J.T., 2002. Identification and action of juvenile hormone III from sexually mature alate females of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Journal of Insect Physiology*, 48, 357-365.
- Camargo-Mathias, M.I., Caetano, F.H. 1995. Trophic eggs in workers of *Neoponera villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae). *Journal of Advances in Zoology*, 16, 62-65.
- Champalbert, A., Lachaud, J.P., 1990. Existence of a sensitive period during the ontogenesis of social behaviour in a primitive ant. *Animal Behaviour*, 39, 850-859.

- Chapuisat, M., Keller, L., 2002. Division of labour influences the rate of ageing in weaver ant workers. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 269, 909-913.
- Chen, J.S., Cho, W.L., Raikhel, A.S., 1994. Analysis of mosquito vitellogenin cDNA similarity with vertebrate phosphovitins and arthropod serum proteins. *Journal of Molecular Biology*, 237, 641-647.
- Chen, J.S., Sappington, T.W., Raikhel, A.S., 1997. Extensive sequence conservation among insect, nematode and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry. *Journal of Molecular Evolution*, 44, 440-451.
- Chen, M.E., Lewis, D.K., Keeley, L.L., Pietrantonio, P.V., 2004. cDNA cloning and transcriptional regulation of the vitellogenin receptor from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Molecular Biology*, 13, 195-204.
- Comas, D., Piulachs, M.D., Belles, X., 2000. The vitellogenin of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): nucleotide sequence of the cDNA and analysis of the protein structure. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 45, 1-11.
- Corona, M., Velarde, R., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K.A., Robinson, G.E., 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104, 7128-7133.
- Cuvillier-Hot, V., Lenoir, A., Crewe, R., Malosse, C., Peeters, C., 2004. Fertility signaling and reproductive skew in queenless ants. *Animal Behaviour*, 68, 1209-1219.
- Dallacqua, R.P., Simões, Z.L.P., Bitondi, M.M.G., 2007. Vitellogenin gene expression in stingless bee workers differing in egg-laying behavior. *Insectes Sociaux*, 54, 70-76.
- Davis, B.J., 1964. Disc Electrophoresis. 2, Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 404-427.

- Delabie, J.H.C, Alves, H.S.R, França, V.C., Martins, P.T.A, Nascimento, I.C., 2007. Biogeografia das formigas predadoras do gênero *Ectatomma* (Hymenoptera: Formicidae: Ectatomminae) no leste da Bahia e regiões vizinhas. *Agrotrópica*, 19, 13-20.
- Delabie, J.H.E., 1990. The ant problems of cocoa farms in Brazil, In: R. K. Vander Meer, K. Jaffe e A. Cedeño eds., *Applied Myrmecology: A World Perspective*. Boulder, Colorado, USA, Westview Press. pp. 555-569.
- Delabie, J.H.C., 1999. Aspectos da mirmecofagia na Região neotropical. *Naturalia*, 24, 225-231.
- Delabie, J.H.C., 2001. Trophobiosis between Formicidae and Hemiptera (Sternorrhyncha and Auchenorrhyncha): an overview. *Neotropical Entomology*, 30, 501-516.
- Dhadialla, T.S., Hays, A.R., Raikhel, A.S., 1992. Characterization of the solubilized mosquito vitellogenin receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 803-816.
- Dietemann, V., Peeters, C., 2000. Queen influence on the shift from trophic to reproductive eggs laid by workers of the ponerine ant *Pachycondyla apicalis*. *Insectes Sociaux*, 47, 223-228.
- Dolezal, G.A., Brent, C.S., Gadau, J., Hölldobler, B., Amdam, G.V., 2009. Endocrine physiology of the division of labour in *Pogonomyrmex californicus* founding queens. *Animal Behaviour*, 77, 1005-1010.
- Fénéron, R., Billen, J., 1996. Ovarian cycle in *Ectatomma tuberculatum* workers. *Invertebrate Reproduction and Development*, 29, 79-75.
- Fénéron, R., Jaisson, P., 1995. Ontogeny of nestmate brood recognition in a primitive ant, *Ectatomma tuberculatum* Olivier (Ponerinae). *Animal Behaviour*, 50, 9-14.
- Fénéron, R., Durand, J., Jaisson, P., 1996. Relation between behaviour and physiological maturation in a ponerine ant. *Behaviour*, 133, 791-806.

- Giorgi, F., Bradley, J.T., Nordin, J.H., 1999. Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos. *Micron*, 30, 579-596.
- Giray, T., Giovanetti, M., West-Eberhard, M.J., 2005. Juvenile hormone, reproduction, and worker behavior in the neotropical social wasp *Polistes canadensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 3330-3335.
- Gobin, B., Peeters, C., Billen, J., 1998. Production of trophic eggs by virgin workers in the ponerine ant *Gnamptogenys menadensis*. *Physiological Entomology*, 23, 329-336.
- Guidugli, K.R., Nascimento, A.M., Amdam, G.V., Barchuk, A.R., Omholt, S., Simões, Z.L.P., Hartfelder, K., 2005. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters*, 579, 4961-4965.
- Hagedorn, H.H., Kunkel, J.G., 1979. Vitellogenin and vitellin in insects. *Annual Review of Entomology*, 24, 475-505.
- Hartfelder, K., 2000. Insect juvenile hormone: from “status quo” to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33, 157-177.
- Havukainen, H., Halskau, Ø., Skjaerven, L., Smedal, B., Amdam, G.V., 2011. Deconstructing honeybee vitellogenin: novel 40 kDa fragment assigned to its N terminus. *The Journal of Experimental Biology*, 214, 582-589.
- Heinze, J., Schrempf, A., 2008. Aging and reproduction in social insects - A mini review. *Gerontology*, 54, 160-167.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O., 1990. *The Ants*. Harvard University Press, first ed., Cambridge.
- Hora, R.R., Fénéron, R., Valenzuela, J., Favila, M.E., Fresneau, D., 2001. Queen-size dimorphism in the ant *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). *Sociobiology*, 38, 1-14.

- Hora, R.R., Vilela, E., Fénéron, R., Pezon, A., Fresneau, D., Delabie J., 2005. Facultative polygyny in *Ectatomma tuberculatum* (Formicidae, Ectatomminae). *Insectes Sociaux*, 52, 194-200.
- Hora, R.R., Poteaux, C., Doums, C., Fresneau, D., Fénéron, R., 2007. Egg cannibalism in a facultative polygynous ant: conflict for reproduction or strategy to survive? *Ethology*, 113, 909-916.
- Hsieh, T.M, Su, T.H., 2000. Effects of pyriproxyfen on ovaries of the pharaoh ant *Monomorium pharaonis* (Hymenoptera: Formicidae). *Plant Protection Bulletin*, 42, 73-82.
- Huang, Z.Y., Robinson, G.E., Tobe, S.S., Yagi, K.J., Strambi, C., Strambi, A., Stay, B., 1991. Hormonal regulation of behavioural development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. *Journal of Insect Physiology*, 37, 733-741.
- Jassim, O., Huang, Z.Y., Robinson, G.E., 2000. Juvenile hormone profiles of worker honey bees, *Apis mellifera*, during normal and accelerated behavioural development. *Journal of Insect Physiology*, 46, 243-249.
- Jones, G., 1995. Molecular mechanisms of action of juvenile hormone. *Annual Review of Entomology*, 40, 147-169.
- Keller, L., Genoud, M., 1997. Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing. *Nature*, 389, 958-960.
- Khila, A., Abouheif, E., 2008. Reproductive constraint is a developmental mechanism that maintains social harmony in advanced ant societies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105, 17884-17889.
- Kort, C.A.D., Granger, N.A., 1981. Regulation of the juvenile hormone titer. *Annual Review of Entomology*, 26, 1-28.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

- Le Conte, Y., Mohammadi, A., Robinson, G.E., 2000. Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 268, 163-168.
- Lengyel, F., Westerlund, S.A., Kaib, M., 2007. Juvenile hormone III influences task-specific cuticular hydrocarbon profile changes in the ant *Myrmicaria eumenoides*. *Journal of Chemical Ecology*, 33, 167-181.
- 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 USA*, 101, 17559-17564.
- Lewis, D.K., Campbell, J.Q., Sowa, S.M., Chen, M., Vinson, S.B., Keeley, L.L., 2001. Characterization of vitellogenin in the red imported fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Apocrita: Formicidae). *Journal of Insect Physiology*, 47, 543-551.
- Marco Antônio, D.S., Guidugli-Lazzarini, K.R., Nascimento, A.M., Simões, Z.L.P., Hartfelder, K., 2008. RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers. *Naturwissenschaften*, 95, 953-961.
- Martínez, T., Burmester, T., Veenstra, J.A., Wheeler, D., 2000. Sequence and evolution of a hexamerin from the ant *Camponotus festinatus*. *Insect Molecular Biology*, 9, 427-431.
- Michener, C.D., 1974. *The social behavior of the bees*. Harvard University Press, Cambridge.
- Mouchel, N., Trichet, V., Betz, A., Le Penec, J.P., Wolff, J., 1996. Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene*, 174, 59-64.
- Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., Van Remmen, H., 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 477-503.

- Nelson, C.M., Ihle, K.E., Fondrk, M.K., Page, R.E., Amdam, G.V., 2007. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology*, 5, 673-677.
- Omholt, S.W., Amdam, G.V., 2004. Epigenic regulation of aging in honeybee workers. *Science of Aging Knowledge Environment*, 26, e28.
- Ouellette, G.D., Fisher, B.L., Girman, D.J., 2006. Molecular systematics of basal subfamilies of ants using 28S rRNA (Hymenoptera: Formicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40, 359-369.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, e36.
- Pinto, L.Z., Bitondi, M.M.G., Simões, Z.L.P., 2000. Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *Journal of Insect Physiology*, 46, 153-160.
- Piulachs, M.D., Guidugli, K.R., Barchuk, A.R., Cruz, J., Simões, Z.L.P., Belles, X., 2003. The vitellogenin of the honey bee *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33, 49-465.
- Raikhel, A.S., Dhadialla, T.S., 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology*, 37, 217-251.
- Robinson, G.E., Vargo, E.L., 1997. Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 35, 559-583.
- Röseler, P.F., Röseler, I., Strambi, A., Augier, R., 1984. Influence of insect hormones on the establishment of dominance hierarchies among foundresses of the paper wasp, *Polistes gallicus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 15, 133-142.

- Seehuus, S.C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., Amdam, G.V., 2006. Reproductive protein protects sterile honeybee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 103, 962-967.
- Seehuus, S., Norberg, K., Krekling, T., Fondrk, K., Amdam, G.V., 2007. Immunogold localization of vitellogenin in the ovaries, hypopharyngeal glands and head fat bodies of honeybee workers, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, 52, 1-14.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.
- Sommer, K., Hölldobler, B., 1995. Colony founding by queen association and determinants of reduction in queen number in the ant *Lasius niger*. *Animal Behaviour*, 50, 287-294.
- Sommer, K., Hölldobler, B., Rembold, H., 1993. Behavioral and physiological aspects of reproductive control in a *Diacamma* species from Malaysia (Formicidae, Ponerinae). *Ethology*, 94, 162-170.
- Stefanini, M., Demartino, C., Zamboni, L., 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216, 173-174.
- Sullivan, J.P., Jassim, O., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E., 2000. Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. *Hormones and Behavior*, 37, 1-14.
- Takadera, K., Yamashita, M., Hatakeyama, M., Oishi, K., 1996. Similarities in vitellin antigenicity and vitellogenin mRNA nucleotide sequence among sawflies (Hymenoptera: Symphyta: Tenthredinoidea). *Journal of Insect Physiology*, 42, 417-422.
- Toth, M.L., Robinson, G.E., 2005. Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Animal Behaviour*, 69, 427-435.

- Tufail, M., Takeda, M., 2002. Vitellogenin of the cockroach, *Leucophaea maderae*: nucleotide sequence, structure and analysis of processing in the fat body and oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 117-134.
- Tufail, M., Takeda, M., 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology*, 54, 1447-1458.
- Tufail, M., Takeda, M., 2009. Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *Journal of Insect Physiology*, 55, 87-103.
- Tufail, M., Bembenek, J., Elgendy, A.M., Takeda, M. 2007. Evidence for two vitellogenin-related genes in *Leucophaea maderae*: the protein primary structure and its processing. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 66, 190-203.
- Wheeler, D.E., Nijhout, H.F., 1983. Soldier determination in the ant, *Pheidole bicarinata*: hormonal control of caste and size within castes. *Journal of Insect Physiology*, 29, 847-854.
- Wheeler, D.E., Buck, N.A., 1995. Storage proteins in ants during development and colony founding. *Journal of Insect Physiology*, 41, 885-894.
- Wheeler, D.E., Martínez, T., 1995. Storage proteins in ants (Hymenoptera: Formicidae). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 112, 15-19.
- Wheeler, D., Liebig, J., Hölldobler, B., 1999. Atypical vitellins in ponerine ants (Formicidae: Hymenoptera). *Journal of Insect Physiology*, 45, 287-293.
- Wojchowski, D.M., Parsons, P., Nordin, J. H., Kunkel, J.G., 1986. Processing of pro-vitellogenin in insect fat body: a role for high-mannose oligosaccharide. *Developmental Biology*, 116, 422-430.
- Yano, K., Sakurai, M.T., Watabe, S., Izumi, S., Tomino, S., 1994. Structure and expression of mRNA for vitellogenin in *Bombyx mori*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1218, 1-10.