

Capítulo III

INSECT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

Identificação de genes e proteínas do sistema olfatório em larva da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* e seu possível papel na diferenciação de casta.

Resumo

As abelhas do gênero *Melipona* apresentam um complexo mecanismo de diferenciação de castas, diferente de todas as outras abelhas. Dois genes com dois alelos cada seriam responsáveis pela diferenciação de casta. Larvas duplo heterozigotas produzem significativamente mais hormônio juvenil do que homozigotas para um ou ambos os genes, resultando em fenótipo de rainha. O alimento é um fator limitante para diferenciação de castas. Não existe alimentação diferenciada (tanto em qualidade quanto em quantidade). No entanto, alimentação larval abaixo de um limiar, diminui significativamente a produção de rainhas. O polifenismo presente neste gênero representa uma nova ferramenta para o entendimento de como as condições ambientais interagem com o genoma levando a diferentes trajetórias desenvolvimentais. Neste trabalho, clonamos, sequenciamos e detectamos transcritos dos genes *MscuCSP2*, *MscuCSP6*, *MscuOBP4* e *MscuOBP8*. A expressão da proteína recombinante *MscuOBP8* e o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal permitiu detectar a proteína *MscuOBP8* nativa nos estágios larvais do desenvolvimento L2, L3 (L3-1, L3-2, L3-3), LPD e LD de *M. scutellaris*. A predição de um modelo 3D da *MscuOBP8* permitiu verificar sua característica anfipática, corroborando para a função carreadora de moléculas hidrofóbicas tais como substâncias voláteis, característica dessa classe de proteínas. Uma vez que compostos voláteis estão

associados à ativação do sistema endócrino e, subsequente, efeito fisiológico e comportamental em indivíduos adultos de abelhas, nós hipotetizamos que genes do sistema olfatório, como o *MscuOBP8*, podem estar envolvidos no transporte moléculas voláteis provenientes do alimento larval e, através de segundos mensageiros, em estágios larvais específicas, controlando os títulos de hormônio juvenil e levando ao desenvolvimento do fenótipo de rainha em *M. scutellaris*, em indivíduos duplo-heterozigotos para os genes determinantes de casta, quando bem alimentados.

Palavras-chave: *Melipona scutellaris*, *odorant binding protein* , *chemosensory protein*, diferenciação de casta.

1 Introdução

Há muito tempo a humanidade já conhece a devida importância das abelhas no meio ambiente, uma vez que a polinização é uma atividade crítica do ecossistema para a produção de comida e subsistência humana (Klein et al., 2007). Contudo, a polinização é de longe importante não apenas para a produção de comida, ela é essencial também para reprodução sexual das plantas, garantindo a transferência da informação genética e promoção da diversidade genética (Hein, 2009).

Uma característica importante dos insetos sociais é a comunicação. As abelhas se utilizam de várias maneiras para se comunicar tais como: recursos sonoros, visuais, químicos ou contato físico. *Apis mellifera* informa a localização da fonte de alimento por meio de danças e recursos sonoros e químicos (contato pela antena)(von Frisch and Lindauer, 1956; Wenner, 1962a, 1962b). Nos meliponíneos há vários meios de comunicação dentre eles: recursos sonoros (frequência do bater das asas), visuais (movimento de zigue-zague durante o vôo), contato físico (campeiras comem parte do pólen que está na corbícula da coletora), químico (odor - trilhas de cheiro), muito comum em *Melipona* (Kerr et al., 1963; Michener, 1974). Sendo que, a mensagem química representa cerca de 90% dos mecanismos de comunicação nos insetos sociais (Wilson, 1990).

Em *Apis mellifera* os feromônios desempenham um papel fundamental na comunicação, sendo que o *queen retinue pheromone* (QRP) e o *queen mandibular pheromone* (QMP) são feromônios constituídos por uma mistura de vários outros componentes com atividades específicas. Esses feromônios produzidos principalmente pelas glândulas mandibulares da rainha modulam muitos aspectos fisiológicos e comportamentais críticos para a organização social da colônia, tais como, atrair operárias à rainha, inibir o desenvolvimento ovariano em operárias, promover a transição de nutridora para forrageira. A glândula de Dufour sintetiza compostos de acordo com a casta; enquanto ésteres com 28 a 38 carbonos estão associados às rainhas, o álcool ecoseinóico está associado às operárias que não estão em atividade de postura de ovos; portanto, estes compostos se apresentam, aparentemente, como um sinal de controle da

fertilidade (Abdalla and Cruz-Landim, 2001; Martin and Jones, 2004; Trhlin and Rajchard, 2011).

Enquanto a diferenciação de castas em *Apis* e nos *Meliponini* (exceto *Melipona*) é dada pela quantidade e qualidade do alimento (Hartfelder et al., 2006), em *Melipona* o alimento está associado ao fator genético no que se refere à produção de rainhas e operárias (Kerr, 1950). Características morfológicas e comportamentais nas diferentes castas em *Melipona* pode ser resultado de estímulos ambientais que atuam no sistema endócrino ativando vias alternativas de expressão de determinados genes durante estágios específicas do processo de desenvolvimento (Hartfelder and Emlen, 2012).

O sistema olfatório pode representar um importante mediador entre o estímulo ambiental e genes envolvidos na diferenciação de casta em *M. scutellaris*, uma vez que está presente na maioria dos aspectos fisiológicos dos insetos. Em insetos sociais, como em *Apis*, o sistema olfatório é responsável por captar, não somente feromônios, mas também moléculas de odor presentes no ar e traduzir esse sinal química em uma resposta fisiológica capaz de manter a coesão interna da colônia (Foret and Maleszka, 2006). Neste aspecto a capacidade de detectar, processar e responder a feromônios e outras moléculas sinalizadoras emitidas por outros indivíduos da colônia se torna muito importante.

Nos insetos, o reconhecimento e discriminação de milhares de odorantes são mediados pelos neurônios olfatórios (ORNs) que estão envolvidos por um ambiente aquoso (linfa) que atua como uma barreira para moléculas voláteis e lipofílicas. *Odorant-binding proteins* (OBPs) e *Chemosensory proteins* (CSPs) são proteínas do sistema olfatório dos insetos que atuam como carreadoras responsáveis pelo reconhecimento, transporte através linfa da sensila e entrega de moléculas hidrofóbicas, feromônios, semioquímicos e voláteis, aos receptores (ORs) presentes nos neurônios olfatórios. Elas atuam fazendo a ligação do meio externo aos ORs, solubilizando os ligantes e contribuindo para a sensibilidade do sistema olfatório dos insetos (Briand et al., 2002; Foret and Maleszka, 2006; Leal, 2013; Pelosi et al., 2005; Tegoni et al., 2004).

Embora o papel fisiológico dos *OBPs* e *CSPs* ainda não seja bem definido, a expressão desses genes em tecidos não-olfatórios e em diferentes estágios do desenvolvimento, tais como em ovo, período embrionário e estágios pupais em *Apis*, ressalta seu importante papel como proteínas carreadoras (Foret and Maleszka, 2006;

Wanner et al., 2005). Na formiga cortadora-de-folhas, *Atta vollenweideri*, uma espécie de inseto social da ordem Hymenoptera, foi encontrado um padrão de expressão de genes do sistema olfatório específico de acordo com a casta (Koch et al., 2013).

A biologia, aspectos da diferenciação de casta em *M. scutellaris* e genes do sistema olfatório, diferencialmente expressos, selecionados com base em dados de transcriptoma da glândula *corpora allata* de larvas L3 de *M. scutellaris* (dados ainda não publicados), realizado pelo nosso grupo de pesquisa, motivaram a realização deste trabalho. O objetivo deste trabalho foi detectar, amplificar, clonar, caracterizar genes do sistema olfatório de *M. scutellaris*, expressar a proteína recombinante MscuOBP8, selecionar um anticorpo específico para essa proteína e detectar avaliar a expressão da proteína nativa em diferentes fases do desenvolvimento. Nós apresentamos neste trabalho os primeiros genes do sistema olfatório descritos para esta espécie de abelha, que ainda não possui genoma anotado, sugerindo envolvimento destes genes como possíveis mediadores na cascata de ativação de genes responsáveis pela diferenciação de castas.

2 Material e Métodos

2.1 Amostra biológica e extração do RNA total

Larvas nos estágios de desenvolvimento, primeiro estágio (L1), segundo estágio (L2), terceiro estágio (L3), pré-defecante (LPD) e defecante (LD) de *M. scutellaris* foram coletadas no Meliponário da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG (S 180 55' / W 450 17'). O RNA total foi extraído de até 3 indivíduos para os estágios L1 e L3, e de um indivíduo para os estágios L3, LPD e LD utilizando o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, USA) para cada extração. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Ecologia Química Honorary-Maeda Duffey na Universidade da Califórnia (UC, Davis) e no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

2.2 Transcrição reversa e PCR das sequências codificantes (CDS)

As reações de transcrição reversa foram realizadas a partir de um *pool* de 1 µg de RNA total (Larvas L3, LPD), *primer* Oligo dT₁₅ (IDT Technologies, USA), inibidor de RNase RNase out (Invitrogen, USA) e transcriptase reversa GoScript (Promega, USA), segundo as instruções do fabricante. A reação foi incubada à 42 °C por 60 minutos, seguido de 15 minutos à 70 °C.

As reações de PCR foram padronizadas em gradiente com temperatura de anelamento (TA) variando de 72 °C à 50 °C, 1U Taq DNA polimerase *high fidelity* Pfu Ultra™ II Fusion HS (Agilent Technologies, USA), 10 pmoles de *primers* específicos para os genes *MscuCSP2*, *MscuCSP6*, *MscuOBP4* e *MscuOBP8*. O padrão de ciclagem da reação de PCR foi: 95 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos à 95 °C por 1 minuto, TA por 50 segundos, 72 °C por 40 segundos e um ciclo à 72 °C por 5 minutos ao final da reação. Os *primers* para amplificação das CDS completas (do códon iniciador ao códon terminador) foram desenhados com base na sequência do RNA mensageiro de *Apis mellifera* (Tabela 1). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% por 40 minutos à 120 V. Em seguida, as bandas correspondentes aos tamanhos preditos das sequências alvo foram recortadas do gel de agarose e purificadas utilizando o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

2.3 Clonagem e sequenciamento das sequências codificantes (CDS) dos genes do sistema olfatório

Os produtos de PCR dos genes *CSPs* e *OBPs* acima, foram ligados em vetor *pGEM®-T* utilizando o kit *pGEM®-T Easy vector Systems* (Promega, USA), segundo as condições do fabricante. O produto da ligação foi usado para transformação de células *E. coli Top10* quimiocompetentes (Invitrogen, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Os plasmídeos dos clones positivos, confirmados por PCR, foram purificados de acordo com o kit *QIAprep Spin Miniprep kit* (Qiagen, USA) e no mínimo 3 diferentes clones foram sequenciados por 3 vezes nos sentidos sense e antisense. As sequências obtidas foram alinhadas contra as sequências depositadas no *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* utilizando a ferramenta *BLASTn*. O sequenciamento de todas as amostras foi realizado em sequenciador automático ABI 3730 por *Davis Sequencing Facility* (Universidade da Califórnia, Davis).

A partir dessas sequências dos genes *MscuOBP4*, *MscuOBP8*, *MscuCSP2* e *MscuCSP6*, o peptídeo sinal (quando presente) foi predito pelo *software online SignalP 4.1 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e novos *primers* foram desenhados para amplificar sequência sem o peptídeo sinal e com a adição de sítios específicos para as enzimas de restrição abaixo. Os produtos de PCR foram novamente clonados em vetor *pGEM®-T*, sequenciados e subclonados em pET32a (Novagen, USA) utilizando as enzimas de restrição *NotI* (NEB, USA) e *NcoI* (NEB, USA). Em seguida foram transformados em bactéria *E. coli BL21 (DE3)* (Biomol, USA).

A sequência de aminoácidos das proteínas *MscuCSP2*, *MscuCSP6*, *MscuOBP4* e *MscuOBP8* de *Melipona scutellaris* foram alinhadas com as de *Apis mellifera*, *Apis florea*, *Apis cerana*, *Bombus terrestris*, *Bombus impatiens* e *Megachile rotundata* utilizando a ferramenta online *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

2.4 Análises de bioinformática

O alinhamento das sequências de nucleotídeos dos genes *MscuCSP2*, *MscuCSP6*, *MscuOBP4* e *MscuOBP8* de *M. scutellaris* foi realizado pela ferramenta *Blastn* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A predição da sequência de aminoácidos destas proteínas foi realizado pela ferramenta online *Expasy Translate Tool* (<http://web.expasy.org/translate/>) e o peptídeo sinal foi identificado através do servidor *Signal Peptide 4.1* (Petersen et al., 2011)

Os modelos tridimensionais das proteínas *MscuCSP2*, *MscuCSP6*, *MscuOBP4* e *MscuOBP8* foram preditas pelo programa RaptorX (Kallberg et al., 2012) tomando como base a modelagem por homologia, de acordo com modelos já depositados no *Protein Data Bank* (PDB).

Após o modelo validado, o sítio de ligação da proteína *MscuOBP8* foi predito pela ferramenta online COACH *protein-ligand binding site prediction* (Yang et al., 2013). O *docking* entre os ligantes e a proteína *MscuOBP8* foi feito utilizando as ferramentas online *Patchdock* (Schneidman-Duhovny et al., 2005).

2.5 Expressão e purificação da proteína *MscuOBP8* recombinante de *M. scutellaris*

A expressão da proteína recombinante *MscuOBP8* foi realizada em bactéria *E. coli* *BL 21 (DE3)*, utilizando o plasmídeo pET32a. O clone foi amplificado em meio *Lauria Bertain* (LB) suplementado com 50 µg/mL de carbenicilina e incubado à 37 °C até atingir absorbância de OD₆₀₀ 0,6 - 0,8 nm. Foram testadas as concentrações de 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 e 2,0 mM de *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) e a expressão da proteína foi acompanhada a cada duas horas por 6 horas em diferentes temperaturas, 22 °C, 25 °C, 30 °C e 37 °C.

A cultura foi centrifugada a 4500 X g por 15 minutos, em seguida o *pellet* foi congelado em nitrogênio líquido por 3 minutos e descongelado à 37 °C por aproximadamente 12 minutos. Esse procedimento foi realizado por três vezes. Em seguida o *pellet* foi ressuscitado em 40 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; incubado no gelo por 1 hora; centrifugado à 7400 X g por 50 minutos e o sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente à 14000 X rpm por 40 minutos, 4 °C em ultracentrifuga. O sobrenadante do passo anterior foi coletado, tratado com DNase (Promega, USA) de acordo com as

instruções do fabricante e filtrado à vácuo em membrana 0.22 mm (EMD Millipore, USA). A expressão foi avaliada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, *Mini-PROTEAN TGX Gel Any kD™* (BIO-RAD, USA) submetido a 100 V por 40 minutos e corado com Comassie Blue R-250 (BIO-RAD, USA). Em seguida a proteína recombinante MscuOBP8 foi purificada em coluna de níquel HisTrap HP utilizando sistema Akta Purifier (GE Healthcare, USA).

2.6 Western Blot para detecção da proteína recombinante MscuOBP8

As frações provenientes da purificação da proteína MscuOBP8 foram submetidas a corrida eletroforética em gel SDS-PAGE 12% em condições desnaturantes. A corrida foi realizada em duplicata, em que um dos géis foi corado com *Comassie Blue R-250* (Bio-Rad, USA) e outro gel, sem corar, foi transferido para membrana de nitrocelulose (GE, USA) por 16 horas à 35 mA. Em seguida a membrana foi incubada com Ponceau S (Sigma Aldrich, USA) por 2 minutos e lavada rapidamente com água destilada. Logo após a membrana foi bloqueada com BSA 3% por uma hora à 37 °C e lavada com PBS-T 0,05% por três vezes. Logo após a membrana foi incubada com anticorpo anti-His na concentração de 1:2500 (v/v) por uma hora à 37 °C. Em seguida a membrana foi lavada com PBS-T 0,05% por três vezes e incubada com anticorpo anti-mouse conjugado com peroxidase na concentração de 1:1500 (v/v) por uma hora à 37 °C. A membrana foi revelada com *ECL Western Blotting Detection* (GE, USA) e a luminescência foi capturada no equipamento *Molecular Imaging in vivo FX PRO* (carestream healthy, INC, USA).

2.7 Seleção de anticorpos monoclonais ligantes à proteína MscuOBP8 purificada

Anticorpo monoclonal contra a proteína MscuOBP8 foi selecionado por phage display através de um ciclo de seleção a partir de uma biblioteca de anticorpos scFv apresentados em bacteriófago VCSM13. Os procedimentos de construção da biblioteca foram descritos por Barbas e colaboradores (2001). Entretanto, nós utilizamos uma biblioteca previamente construída no laboratório de Nanobiotecnologia (UFU) e com a variabilidade avaliada.

2.7.1 Biopanning scFv

Para a seleção de anticorpos ligantes a proteína MscuOBP8, uma biblioteca de scFv com peptídeos fusionados a proteína pIII foi utilizada. Todo o biopanning foi realizado de acordo com o protocolos de Barbas e colaboradores (2001), com algumas modificações.

Sensibilizou-se dois poços de uma placa com 10 µg MscuOBP8 durante 16 horas à 4 °C. Posteriormente, a placa foi bloqueada com TBS-BSA 3%. Os poços foram incubadas por 2 horas à 37 °C com a biblioteca amplificada (100 µL/poço) de anticorpos. Em seguida, os poços foram lavados 10 vezes com TBS 0.05% de Tween-20 (PBS-T). Os clones foram eluídos com glicina 1 M pH= 2.5 por 10 minutos. Os clones eluídos foram titulados e amplificados em meio SB como descrito anteriormente para a realização até o segundo ciclo.

Após o segundo ciclos os fagos foram amplificados em bactéria XL1-Blue (Agilent Technologies, USA) overnight sem a adição do fago helper, com intuito de aumentar a quantidade do plasmídeo que contem os insertos de scFv. Realizou-se a extração do DNA plasmidial da bactéria infectada com os fagos do segundo ciclo pelo kit de Miniprep (Qiagen, USA), seguido da eletroporação do DNA plasmidial em bactéria TOP-10 F` (Invitrogen, USA) eletrocompetentes. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB ágar contendo acrescido de 2% (v/v) de glicose 2 M e carbenicilina a 50 µg/mL e incubadas a 37 °C por 16 horas.

2.7.2 Expressão do scFv na forma solúvel

Em uma placa do tipo deep well de 96 poços foi adicionado, a cada poço, 1 mL de meio SB contendo carbenicilina a 50 µg/mL e 2% (v/v) de glicose 2 M, seguido pela inoculação de colônia de bactérias TOP10 (Invitrogen, USA) transformadas com a biblioteca de scFv advinda do biopanning. A placa foi selada com filme plástico, sendo o

mesmo perfurado para permitir a aeração, seguido pela incubação por 14 horas a 37°C e 300 rpm.

No dia seguinte, 50 µL de cultura de cada poço contendo clone de scFv foram transferidos para outra placa contendo, novamente, 1 mL por poço de meio SB acrescido de carbenicilina a 50 µg/mL e 2% (v/v) de glicose 2 M. A placa foi selada, perfurada e incubadas por 4 horas à 37 °C e 300 rpm. Após incubação por 4 horas, a placa foi centrifugada à 3.700 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet de bactérias foi então ressuscitado em 1 mL de meio SB contendo 50 µg/mL de carbenicilina e 2,5 mM de IPTG.

A placa foi, novamente, incubada por 18 horas à 30 °C e 300 rpm, e no dia seguinte foi submetida à centrifugação a 3.700 rpm durante 15 minutos a 4 °C, o pellet foi estocado com glicerol 25% a -20 °C e o sobrenadante contendo as moléculas scFv na forma solúvel foi transferido para outra placa e armazenado a 4 °C por até ser utilizado nos ensaios de ELISA contra a proteína MscuOBP8.

2.7.3 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para seleção dos clones mais reativos

Para selecionar os fagos mais reativos ligantes à proteína MscuOBP8, foi feito ensaio de imuno-adsorção por ligação enzimática (ELISA). Uma placa de 96 poços, carregada, do tipo Maxsorp (NUNC, USA) foi sensibilizada com a proteína recombinante MscuOBP8 na proporção de 1 µL para cada 10 µL do tampão de sensibilização Bicarbonato carbonato 0.1 M pH 9.6. Em seguida, bloqueou-se a placa com o tampão de PBS-BSA3% por 2 horas à temperatura ambiente.

A placa foi lavada por 3 vezes com PBST-Tween 0.05% e 50 µL do sobrenadante contendo o scFv solúvel foi adicionado, a placa foi incubada por mais 2 horas à 37 °C. Em seguida, a placa foi lavada com PBST-Tween 0.05% e, posteriormente, foi adicionado o anticorpo anti-HA (Roche, USA) marcado com peroxidase na diluição 1:2500 por 1 hora à 37 °C.

A placa foi, novamente, lavada por 5 vezes com PBST-Tween 0.05%. A detecção foi feita com *SigmaFast™ OPD* (Sigma-Aldrich, USA). A reação foi parada utilizando-se

20 µL/poço de ácido sulfúrico 4 N. A leitura foi feita em leitor de microplaca (ThermoPlate) à 492 nm.

2.8 Extração de proteínas totais de larva de *M. scutellaris*

Proteínas totais de larvas L2, L3-1, L3-2, L3-3, LPD e LD foram extraídas utilizando TRizol Reagent (Invitrogen, USA) de acordo com instruções do fabricante. O extrato protéico foi quantificado por *Bradford* e submetido à eletroforese em gel de acrilamida 12% para avaliar a extração. O gel de acrilamida foi corado com *Comassie Blue* R-250 (Bio-Rad, USA).

2.9 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção da proteína MscuOBP8 nativa

O ensaio de ELISA foi realizado em placa de 96 poços MaxSorp (NUNC, USA). A placa foi sensibilizada overnight à 4 °C com aproximadamente 10 µg proteínas totais de larvas L2, L3-1, L3-2, L3-3, LPD, LD diluídas em tampão carbonato (0,1 M, pH 9,6).

No dia seguinte foi feito bloqueio utilizando albumina sérica bovina (BSA) 3% à 37 °C por uma hora. A placa foi lavada com tampão PBS suplementado com 0.05% de detergente Tween-20. Em seguida, o anticorpo anti-MscuOBP8 foi utilizado para detecção, foi utilizado a proporção de anticorpo/tampão de 1:1 (v/v), incubado à 37 °C por duas horas. A placa foi novamente lavada com PBS-T 0.05% e incubada à 37 °C por uma hora com o anticorpo anti-HA-Peroxidase (Roche, USA) na proporção 1:2000 (v/v) para detecção. A placa foi novamente lavada com PBS-T 0.05% e revelada com 3,3',5,5' - tetramethylbenzidine (TMB) (BD Biosciences, USA) e em seguida a absorbância foi capturada em leitora de ELISA (ThermoPlate) à 450 nm.

3. Resultados e discussão

3.1 Biologia e diferenciação de casta em abelhas

A abelha *M. scutellaris* apresenta peculiar sistema de diferenciação de castas, diferindo de *Apis* e das outras abelhas sem ferrão. Enquanto em abelhas do gênero *Apis* e dos Meliponini (exceto o gênero *Melipona*) a diferenciação de castas ocorre pela quantidade de alimento (Barchuk et al., 2007; Hartfelder et al., 2006), em *Melipona* o fator alimentar está associado ao fator genético (Kerr, 1950).

Apis mellifera é o modelo biológico mais estudado para diferenciação de casta e divisão de trabalho em himenópteros sociais. Em *A. mellifera*, as células de cria permanecem abertas durante todo o desenvolvimento, permitindo, assim, o controle sobre a quantidade e qualidade do alimento ofertado às larvas. As larvas jovens de rainhas são alimentadas com geléia real durante todo o seu desenvolvimento, já as larvas de operárias são alimentadas com geléia real até o terceiro dia de vida quando o alimento larval (geléia real) é substituído por um mix de mel, pólen, e secreção glandular (Beetsma, 1979; Haydak, 1970; Weiss, 1975). Além disso, as larvas de rainhas são criadas em células de cria maiores e recebem 10 vezes mais alimento do que as larvas de operárias (Jung-Hoffmann, 1966; Kerr, 1950).

Nas abelhas do gênero *Melipona* o alimento é a provisionado nas células de cria e após ovoposição, os alvéolos são rapidamente fechados (Sakagami, 1982), eliminando qualquer possibilidade de receber outro tipo de alimento .

Em 1950, Kerr propôs um modelo para explicar a diferenciação de casta em *Melipona*. Dois genes principais, X^a e X^b , com dois alelos cada um, seriam os responsáveis pela ativação de genes feminizantes via hormônio juvenil, de modo que larvas duplo heterozigotas, quando bem alimentadas, desenvolvem-se em rainhas e larvas mal alimentadas ou homozigotas para esses genes, tornam-se operárias, em consequência de baixa produção de Hormônio Juvenil (HJ) pela glândula *corpora allata*.

Entretanto, as *corpora allata* somente terão bom desenvolvimento e produzirão HJ em níveis adequados se as larvas forem alimentadas suficientemente (Kerr, 1950). A quantidade mínima de alimento para uma larva se desenvolver em rainha já foi determinado para várias espécies de meliponíneos (*Melipona quadrifasciata* - 155 mg, *Melipona rufiventris* - 137 mg, *Melipona marginata* - 40,5 mg, e *Melipona scutellaris* - 222 mg) (Camargo et al., 1976).

3.2 Clonagem e sequenciamento das CDS completas

Com base nos dados do transcriptoma de *corpora allata* de larva do estágio de desenvolvimento L3 feito previamente em nosso laboratório, foram selecionados 5 genes OBPs, 3 genes *odorant receptors* (ORs), 2 *gustatory receptors* (GRs) e 4 CSPs encontrados diferentemente expressos na *corpora allata*. Na ausência de genoma para a espécie *M. scutellaris*, o genoma de *A. mellifera* foi utilizado como referência para amplificação das *coding sequences* (CDS) completas. Entretanto, apenas os genes *MscuCSP2*, *MscuCSP6*, *MscuOBP4* e *MscuOBP8* foram amplificados a partir do RNA mensageiro (RNAm) de *M. scutellaris* (Figura 1-4). O número de acesso de cada sequência para os CSPs e OBPs de *A. mellifera* encontra-se na tabela 1.

As sequências de nucleotídeos resultante do sequenciamento das bandas correspondentes aos alvos amplificados por PCR foram tratadas por ferramentas de bioinformática disponíveis online, tais como *VecScreen* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>), utilizada para identificar a sequência dos vetores e a ferramenta *Blastn*, utilizada para alinhamento das sequências provenientes do sequenciamento comparativamente às sequências genômicas depositadas nos bancos de dados (NCBI/GenBank). Os melhores *scores* foram obtidos no alinhamento contra o genoma de *Apis mellifera*, apresentando alto índice de identidade, tanto em tamanho quanto em composição das sequências, com seus respectivos homólogos (Figuras 1-4):

- *AmelCSP2* (87% de identidade; *e-value* = $1e^{-117}$)
- *AmelCSP6* (99% de identidade; *e-value* = 0.0)

- *AmelOBP4* (100% de identidade; *e-value* = 0.0)
- *AmelOBP8* (99% de identidade; *e-value* = 0.0)

As sequências de nucleotídeos dos genes *MscuCSP2*, *MscuCSP6*, *MscuOBP4* e *MscuOBP8* amplificadas de *M. scutellaris* apresentaram, respectivamente, 351, 375, 408 e 360 pares de bases, desde o *códon de início* até o *códon de parada*, incluindo a sequência do peptídeo sinal (Figuras 1-4), exceto para o gene *MscuOBP8*, que foi amplificado sem o peptídeo sinal, corroborando com a literatura (Foret and Maleszka, 2006).

Assim como as sequências de nucleotídeos, as sequências preditas de aminoácidos apresentaram-se altamente conservadas entre as espécies de abelhas que as quais possuem esses genes anotados em bancos de dados. Os CSPs apresentaram um padrão típico com 4 resíduos de cisteínas e os OBPs com 6 resíduos de cisteínas. Além disso, foi observado que o tamanho das sequências de aminoácidos e a distância entre as cisteínas também foram conservados (Figura 5), permitindo inferir que estas proteínas descritas pela primeira vez em *M. scutellaris* fazem parte do grupo “clássico” de CSPs e OBPs (Foret and Maleszka, 2006; Wanner et al., 2005).

Em geral OBPs possuem um padrão de seis resíduos de cisteínas bem conservados entre os diferentes grupos de insetos, apresentando três pontes dissulfeto e dois pequenos *loops* de 8 e 4 resíduos de aminoácidos, e uma sequência proteica com aproximadamente 140 aminoácidos. Os CSPs apresentam aproximadamente de 100 a 120 aminoácidos com quatro conservados resíduos de cisteínas ligadas por duas pontes dissulfeto entre os resíduos vizinhos (Pelosi et al., 2006).

3.3 Expressão da *MscuOBP8* recombinante e produção de anticorpo scFv

A expressão da proteína recombinante *MscuOBP8* foi induzida utilizando 1mM IPTG, sendo que não foi observado aumento significativo da expressão para concentrações maiores. Diferentes tempos de expressão também foram avaliados e foi verificado que após 6 horas não houve um aumento significativo na expressão, bem como para temperaturas diferentes de 37 °C quando comparado ao controle sem indução por IPTG (Figura 6).

Pela ferramenta *Compute pI/Mw* (http://web.expasy.org/compute_pi/) a massa molecular predita da proteína foi 16,5 kDa, característico de OBP, e o pI de 6,36. Na figura 6 pode ser observado também que a expressão foi induzida para uma proteína em torno de 18 kDa, peso molecular diferente do predito. Este fato pode ocorrer devido a incorporação de outras sequências de aminoácidos, como as caudas para purificação.

Os demais clones (MscuOBP4, MscuCSP2 e MscuCSP6) não tiveram suas proteínas expressas em nenhuma das condições testadas, conforme descrito acima, mesmo com o resultado do sequenciamento dos clones confirmar a correta *frame* de transcrição (inserção e a posição correta do inserto dentro do vetor).

A purificação pela cauda de histidina em membrana de níquel revelou a presença de três bandas principais com similar intensidade e massas moleculares aproximadamente de 15, 18 e 20 kDa (Figura 7A). Entretanto, o ensaio de *Western blot* utilizando o anticorpo anti-His detectou apenas a banda específica de aproximadamente 18 kDa (Figura 7B). Esse resultado pode ser possivelmente por interação proteína-proteína durante o processo de purificação.

A proteína recombinante purificada foi utilizada para seleção de um anticorpo ligante à MscuOBP8 a partir de uma biblioteca de scFv naive. O anticorpo anti-MscuOBP8 isolado demonstrou ser específico e foi utilizado nos ensaios de ELISA para quantificação de MscuOBP8 em larvas de *M. scutellaris*. Embora não tenha sido encontradas diferenças significativas (teste Tukey, $p > 0,05$) na expressão de MscuOBP8, esta proteína está presente nos estágios larvais analisadas (Figura 8).

3.4 Modelagem das proteínas recombinantes

A modelagem da estrutura tridimensional das proteínas pelo programa Raptorx revelou que as proteínas MscuCSPs e MscuOBPs possuem uma estrutura em α -hélice, sendo que nas MscuCSPs foram encontrados a possuir 4 α -hélices (Figura 5 A,B) e nas MscuOBPs 6 α -hélices (Figura 5 C,D) estabilizadas por ligações dissulfeto entre os resíduos de cisteínas nas posições 54, 61, 80, 83 (MscuCSP2); 46, 53, 72, 75 (MscuCSP6); 26, 54, 58, 99, 109, 118 (MscuOBP4); 17, 44, 48, 89, 99, 108 (MscuOBP8). As estruturas em α -hélice constituem o core de ligação, que pode ser mais ou menos

hidrofóbicos, ao qual feromônios e outros compostos semioquímicos se ligarão (Tegoni et al., 2004).

As estruturas tridimensionais foram preditas com base nos modelos disponíveis no banco de dados *Protein Data Bank* PDB (2gvsA – MscuCSP2 e MscuCSP6; 3q8iA – MscuOBP4; 3r72A – MscuOBP8). A proteína OBP8 de *A. mellifera* foi o melhor modelo encontrado para gerar a estrutura 3D da proteína MscuOBP8 de *M. scutellaris*. A acurácia do modelo da proteína MscuOBP8 foi avaliada analisando o gráfico de Ramachandran pela ferramenta procheck (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>), o que confirmou a qualidade do modelo com mais de 93,2% dos aminoácidos presentes em regiões muito favoráveis. Além disso, o μ GDT(GDT), medida de qualidade do modelo 3D gerado, fornecido pelo programa Raptorx foi de 108 (90) para os 120 resíduos modelados.

Foram encontradas em *Melipona scutellaris open reading frames* (ORFs) que traduzem 117 e 125 resíduos de aminoácidos para MscuCSP2 e MscuCSP6, respectivamente. O pequeno tamanho das sequências (massa molecular em torno de 14 kDa), presença de putativo peptídeo sinal na região N-terminal (primeiros 18-21 resíduos de aminoácidos) e conservada distância entre os quatros resíduos de cisteínas ao longo da sequência madura: C1-X₆-C2-X₁₈-C3-X₂-C4 (Figura 5 A-D), traduzem um padrão clássico dessas proteínas e é considerado *hallmark* da família de proteínas CSPs (Wanner et al., 2005).

Os genes *OBPs* e *CSPs* apresentam fisicamente próximos no genoma e organizados em *clusters* como os 21 genes *OBPs* já descritos em *A. mellifera* (Foret and Maleszka, 2006); entretanto, suas sequências são divergentes entre as espécies de himenópteros, com os *OBPs* sendo mais divergentes do que os *CSPs*, mas as sequências de diferentes *OBPs* e *CSPs* tendem a ser conservadas dentro da mesma espécie (Vieira and Rozas, 2011).

As proteínas *OBPs* têm sido classificadas em diferentes classes de acordo com suas sequências motivos e análises filogenéticas (Vieira and Rozas, 2011; Xu et al., 2003). Embora o padrão clássico possua seis conservadas cisteínas, *OBPs* contendo mais que seis resíduos de cisteínas, chamadas de “Plus-C”, já foram descritas. Essa classe de *OBPs* possui resíduos de cisteína adicionais na extremidade C-terminal que contribui para

a formação de adicionais pontes dissulfeto (Lagarde et al., 2011; Xu et al., 2003), porém ainda não há comprovação da importância funcional destes resíduos adicionais.

A predição do *pocket* de ligação a ligantes da proteína MscuOBP8 foi encontrado estar presente na região interna da proteína e ser constituído por aminoácidos anfipáticos, enquanto que a região externa é constituída por aminoácidos anfífilos (Figura 9), demonstrando característica de molécula anfipática dos OBPs e reforçando a função de transporte de moléculas hidrofóbicas através do ambiente aquoso da sensila.

Os resultados do sequenciamento de nucleotídeos e predição das estruturas protéicas tridimensionais demonstraram todas as características da família clássica de CSPs e OBPs (Figura 5 A-D), corroborando com a perda da subclasse de OBP “Plus-C” nos himenópteros (Vieira and Rozas, 2011). Além disso, o padrão clássico dessas proteínas é encontrado ser conservado dentro da família Apidae, o que nos permite inferir que elas podem desempenhar funções similares em *M. scutellaris*. A presença destas proteínas em todos os estágios larvais de *M. scutellaris* pode sugerir outras funções além de proteínas carreadoras de odores, como por exemplo, ativadoras de receptores para cascatas de ativação de genes do sistema endócrino.

Embora a forma como o ligante é entregue ao seu receptor ainda não seja entendido, alterações na estrutura tridimensional devido a diferenças no pH levam à mudanças conformacionais na região C-terminal que podem promover a liberação dos ligantes do core ao receptor na membrana dos neurônios sensoriais (Tegoni et al., 2004).

3.5 Aspectos gerais da proteína MscuOBP8 e seu possível papel na diferenciação de casta em *Melipona scutellaris*

O intrigante processo de diferenciação de castas no gênero *Melipona* que resultou no modelo de dois alelos – dois *locos* proposto por Kerr (1950) estimulou estudos de expressão gênica em abelhas sem ferrão para análises funcionais de genes diferencialmente expressos entre as castas (Judice et al., 2006; Siquieroli et al., 2009; Vieira et al., 2008). Algum destes genes, por sua vez, podem estar fisiologicamente ligados

aos altos títulos de HJ em estágios específicos do desenvolvimento levando ao desenvolvimento do fenótipo de rainha nas abelhas, conforme o mecanismo de Kerr.

Os títulos de HJ e ecdisteróides têm sido determinados em várias espécies de abelhas sem ferrão e em diferentes estágios do desenvolvimento que entre rainhas e operárias. Portanto, é suposto que o HJ esteja agindo de forma sinérgica com ecdisteróides em estágios pupais onde apresentam um perfil antagônico; mas essa condição precisa ser avaliada em estágios de desenvolvimento anteriores, como nos estágios larvais de *Melipona* (Bonetti et al., 1995; de Oliveira Campos et al., 1975; Hartfelder et al., 2006; Hartfelder and Rembold, 1991; Pinto et al., 2002).

Nas abelhas, a expressão do gene *AmelOBP8* foi encontrada, exclusivamente, na antena de rainhas e operárias adultos de *A. mellifera*. A sequência de aminoácidos da proteína MscuOBP8 é altamente similar à sequência de *AmelOBP8* (99%), divergindo em apenas um aminoácido. Alta identidade foi encontrada entre a CDS e sequência de aminoácidos do gene *AmelOBP8* e a CDS e a sequência de aminoácidos do gene *AmelOBP6* (98%), divergindo em apenas dois aminoácidos (Foret and Maleszka, 2006).

Entretanto, neste trabalho, apresentamos pela primeira vez a expressão do gene e da proteína MscuOBP8 em lavas de *M. scutellaris*. O alinhamento por Blastp revelou também considerável similaridade entre a sequência de aminoácidos da proteína MscuOBP8 e a sequência de aminoácidos da proteína *AmelOBP5* (33%), usada como referência para a modelagem da MscuOBP8. Embora não tenha sido alta similaridade entre a sequência de nucleotídeos dos genes *MscuOBP8* e *AmelOBP5*, o gene *AmelOBP5* foi encontrado altamente expresso em antena de machos de *A. mellifera* (Foret and Maleszka, 2006) e, possivelmente, esteja envolvido na formação do tegumento embrionário em *Apis* (Maleszka et al., 2007).

O fato de não ter sido encontrada diferença na expressão da proteína MscuOBP8 nos estágios larvais do desenvolvimento (Figura 8) pode ser resultado da falta de marcadores para distinguir rainhas de operárias nestes estágios. Uma relação mais estreita entre o HJ e a MscuOBP8 pode ser encontrada em um experimento tratando com HJ ou análogos, principalmente, larvas L3-3 e LPD e verificando a expressão desta proteína em larvas tratadas e não tratadas, uma vez que a aplicação tópica de HJ I leva a produção de 100% de rainhas em *M. scutellaris* (Bonetti et al., 1995).

Embora o padrão proteico, principalmente enzimático, do alimento larval tenha sido avaliado nas espécies de abelhas sem ferrão (Hartfelder and Engels, 1989; Menezes et al., 2007), ainda não foi encontrado avaliações de compostos voláteis. A constituição das secreções glandulares de operárias, rainhas fisiogástricas e virgens também tem sido avaliada por GC-MS e tem estabelecido a composição química destas, sendo que a maioria deles são hidrocarbonetos de cadeia longa. O composto E)-3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol (também conhecido como geraniol) foi encontrado na secreção glandular de nutridoras de *Melipona beecheii* e em extratos do reto de rainhas recém-nascidas. Interessantemente a adição de 10 µg de geraniol ao alimento larval resultou no nascimento de 25% de rainhas, corroborando com o modelo genético de diferenciação de castas de Kerr (Cruz-Landim et al., 2012; Gracioli-Vitti et al., 2004; Jarau et al., 2010).

Neste trabalho nós sugerimos a atuação da proteína MscuOBP8 como carreadora de algum composto presente no alimento larval ingerido pela larva, possivelmente terpenoide ou composto volátil, proveniente de secreção glandular de nutridoras ou até mesmo pelas rainhas, ou do meio ambiente, responsável pela ativação de genes envolvidos na síntese do HJ tais como, enzimas da via do melanovato, ou de neuropeptídeos através dos neurônios secretórios (Belles et al., 2005). Dessa forma, o sistema endócrino será ativado, no estágio de desenvolvimento correto e, em adequados títulos, o HJ poderá agir sobre genes feminizantes resultando no desenvolvimento fenotípico de uma fêmea completa (rainha). Entretanto, mais estudos são necessários para melhor entendimento do papel destas proteínas em larvas de *M. scutellaris*.

Agradecimentos

Agradecemos aos órgãos de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro em forma bolsa de estudos, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq por financiar um ano de doutorado na Universidade da Califórnia (USA) (Processo 201265/2012-5), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pelo apoio financeiro ao projeto e agradecemos aos laboratórios de Bioquímica e Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia por permitir o uso dos equipamentos de

bioinformática. Agradecemos também ao Professor Walter Leal da Universidade da Califórnia por nos receber em seu laboratório e financiar parte dos materiais e reagentes utilizados neste trabalho.

4. Referências

- Abdalla, F., Cruz-Landim, C.d., 2001. Dufour glands in the hymenopterans (Apidae, Formicidae, Vespidae): a review. *Revista brasileira de biologia* 61, 95-106.
- Barbas, C.F., 2001. Phage display: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Barchuk, A.R., Cristino, A.S., Kucharski, R., Costa, L.F., Simoes, Z.L., Maleszka, R., 2007. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC developmental biology* 7, 70.
- Belles, X., Martin, D., Piulachs, M.D., 2005. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annual review of entomology* 50, 181-199.
- Beetsma, J., 1979. The process of queen-worker differentiation in the honey bee. *Bee World* 60, 24-39.
- Bonetti, A.M., Kerr, W.E., Matusita, S.H., 1995. Effects of juvenile hormones I, II and III, in single and fractionated dosage in *Melipona* bees. *Revista brasileira de biologia* 55 Suppl 1, 113-120.
- Briand, L., Swasdipan, N., Nespoulous, C., Bezirard, V., Blon, F., Huet, J.C., Ebert, P., Penollet, J.C., 2002. Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. *European journal of biochemistry / FEBS* 269, 4586-4596.
- Camargo, C.A.d., Almeida, M.G.d., Parra, M.G.N., Kerr, W.E., 1976. Genetics of Sex Determination in Bees. IX. Frequencies of Queens and Workers from Larvae under Controlled Conditions (Hymenoptera: Apoidea). *Journal of the Kansas Entomological Society* 49, 120-125.
- Campos, L.A.O., Velthuis-Kluppel, F.M., Velthuis, H.H.W., 1975. Juvenile hormone and caste determination in a stingless bee. *Naturwissenschaften* 62, 98-99.
- Cruz-Landim, C., Ferreira-Caliman, M.J., Gracioli-Vitti, L.F., Zucchi, R., 2012. Correlation between mandibular gland secretion and cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Genetics and molecular research : GMR* 11, 966-977.

- Foret, S., Maleszka, R., 2006. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome research* 16, 1404-1413.
- Gracioli-Vitti, L.F., Abdalla, F.C., Moraes, R.L.M.S.d., Jones, G.R., 2004. The chemical composition of the mandibular gland secretion of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a comparative study among castes and sexes. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 15, 777-781.
- Hartfelder, K., Emlen, D., 2012. 11 Endocrine Control of Insect Polyphenism. *Insect Endocrinology*.
- Hartfelder, K., Engels, W., 1989. The composition of larval food in stingless bees: Evaluating nutritional balance by Chemosystematic methods. *Ins. Soc* 36, 1-14.
- Hartfelder, K., Makert, G.R., Judice, C.C., Pereira, G.A.G., Santana, W.C., Dallacqua, R., Bitondi, M.M.G., 2006. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie* 37, 144-163.
- Hartfelder, K., Rembold, H., 1991. Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. *J Comp Physiol B* 160, 617-620.
- Haydak, M. H., 1970. Honey bee nutrition. *Annual review of entomology* 15, 143-156.
- Hein, L., 2009. The economic value of the pollination service, a review across scales. *Open Ecology Journal* 2, 74-82.
- Jarau, S., van Veen, J.W., Twele, R., Reichle, C., Gonzales, E.H., Aguilar, I., Francke, W., Ayasse, M., 2010. Workers make the queens in melipona bees: identification of geraniol as a caste determining compound from labial glands of nurse bees. *Journal of chemical ecology* 36, 565-569.
- Judice, C.C., Carazzole, M.F., Festa, F., Sogayar, M.C., Hartfelder, K., Pereira, G.A., 2006. Gene expression profiles underlying alternative caste phenotypes in a highly eusocial bee, *Melipona quadrifasciata*. *Insect molecular biology* 15, 33-44.
- Jung-Hoffmann, I., 1966. Die determination von Königin und Arbeiterin der Honigbiene. *Zeitschrift Bienenforsch* 8, 296-322.
- Kallberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., Xu, J., 2012. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature protocols* 7, 1511-1522.
- Kerr, W.E., 1950. Genetic Determination of Castes in the Genus *Melipona*. *Genetics* 35, 143-152.
- Kerr, W.E., Ferreira, A., Mattos, N.S.d., 1963. Communication among stingless bees-additional data (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the New York Entomological Society*, 80-90.

- Klein, A.M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tschamtko, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 274, 303-313.
- Koch, S.I., Groh, K., Vogel, H., Hansson, B.S., Kleineidam, C.J., Grosse-Wilde, E., 2013. Caste-specific expression patterns of immune response and chemosensory related genes in the leaf-cutting ant, *Atta vollenweideri*. *PLoS one* 8, e81518.
- Lagarde, A., Spinelli, S., Qiao, H., Tegoni, M., Pelosi, P., Cambillau, C., 2011. Crystal structure of a novel type of odorant-binding protein from *Anopheles gambiae*, belonging to the C-plus class. *The Biochemical journal* 437, 423-430.
- Leal, W.S., 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual review of entomology* 58, 373-391.
- Maleszka, J., Foret, S., Saint, R., Maleszka, R., 2007. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). *Development genes and evolution* 217, 189-196.
- Martin, S.J., Jones, G.R., 2004. Conservation of Bio synthetic pheromone pathways in honeybees *Apis*. *Naturwissenschaften* 91, 232-236.
- Menezes, C., Bonetti, A.M., Amaral, I.M.R., Kerr, W.E., 2007. Larval feeding of *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): study of individual. *Biosci J* 23, 70-75.
- Michener, C.D., 1974. *The social behavior of the bees: a comparative study*. Harvard University Press.
- Pelosi, P., Calvello, M., Ban, L., 2005. Diversity of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in insects. *Chemical senses* 30 Suppl 1, i291-292.
- Pelosi, P., Zhou, J.J., Ban, L.P., Calvello, M., 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 1658-1676.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* 8, 785-786.
- Pinto, L.Z., Hartfelder, K., Bitondi, M.M., Simoes, Z.L., 2002. Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *Journal of insect physiology* 48, 783-790.
- Sakagami, S.F., 1982. Stingless bees, in: Hermann, H.R. (ed), *Social Insects*, Academic Press, New York, Vol. 3, pp. 361-423.
- Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., Wolfson, H.J., 2005. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic acids research* 33, W363-367.

- Siquieroli, A.C., Vieira, C.U., Carvalho-Zilse, G.A., Goulart, L.R., Kerr, W.E., Bonetti, A.M., 2009. Analysis of the intercaste transcriptional profile of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by mRNA differential display. *Biological research* 42, 107-110.
- Tegoni, M., Campanacci, V., Cambillau, C., 2004. Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. *Trends in biochemical sciences* 29, 257-264.
- Trhlin, M., Rajchard, J., 2011. Chemical communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.): a review. *Vet. Med* 56, 265-273.
- Vieira, C.U., Bonetti, A.M., Simoes, Z.L., Maranhao, A.Q., Costa, C.S., Costa, M.C., Siquieroli, A.C., Nunes, F.M., 2008. Farnesoic acid O-methyl transferase (FAMeT) isoforms: conserved traits and gene expression patterns related to caste differentiation in the stingless bee, *Melipona scutellaris*. *Archives of insect biochemistry and physiology* 67, 97-106.
- Vieira, F.G., Rozas, J., 2011. Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the Arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system. *Genome biology and evolution* 3, 476-490.
- von Frisch, K., Lindauer, M., 1956. The "Language" and orientation of the honey bee. *Annual Review of Entomology* 1, 45-58.
- Wanner, K.W., Isman, M.B., Feng, Q., Plettner, E., Theilmann, D.A., 2005. Developmental expression patterns of four chemosensory protein genes from the Eastern spruce budworm, *Chroistoneura fumiferana*. *Insect molecular biology* 14, 289-300.
- Weiss, K., 1975. Zur kastenspezifischen ernahrung der weiblichen bienenlarve (*Apis Mellifica* L.). *Apidologie* 6, 95-120.
- Wenner, A.M., 1962a. Communication with queen honey bees by substrate sound. *Science* 138, 446-448.
- Wenner, A.M., 1962b. Sound production during the waggle dance of the honey bee. *Animal Behaviour* 10, 79-95.
- Wilson, E.O., 1990. Success and dominance in ecosystems: the case of the social insects. *Success and dominance in ecosystems: the case of the social insects*.
- Xu, P.X., Zwiebel, L.J., Smith, D.P., 2003. Identification of a distinct family of genes encoding atypical odorant-binding proteins in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect molecular biology* 12, 549-560.
- Yang, J., Roy, A., Zhang, Y., 2013. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics* 29, 2588-2595.