

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Detecção e localização de proteínas relacionados às MRJPs e de suas possíveis  
proteínas sítio-ligantes no cérebro e glândula hipofaríngeal da abelha *Apis*  
*mellifera*

Aluno: Leonardo Gomes Peixoto

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

UBERLÂNDIA – MG  
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Detecção e localização de proteínas relacionados às MRJPs e de suas possíveis  
proteínas sítio-ligantes no cérebro e glândula hipofaríngeal da abelha *Apis*  
*mellifera*

Aluno: Leonardo Gomes Peixoto

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do Título de  
Mestre em Genética e Bioquímica

UBERLÂNDIA – MG  
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Detecção e localização de proteínas relacionados às MRJPs e de suas possíveis  
proteínas sítio-ligantes no cérebro e glândula hipofaríngea da abelha *Apis*  
*mellifera*

Aluno: Leonardo Gomes Peixoto

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Foued Salmen Espindola (Orientador)

Examinadores: Mário Sérgio Palma (Titular)

Klaus Hartfelder

Data da Defesa 28/ 02/2006

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da  
Dissertação/Tese foram contempladas

---

(Foued Salmen Espindola)

Uberlândia, \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

## Dedicatória

À minha família:

Aos meus pais,

Vicente Paulo Peixoto da Cunha e Lúcia Gomes Cardoso da Cunha pelo apoio moral e financeiro, pelo incentivo e visão de futuro sustentável, pela dedicação e carinho constante e principalmente pelo amor fraterno e sincero. A vocês meus pais o meu carinho, respeito e amor incondicional.

Aos meus irmãos,

Fabício Gomes Peixoto e Luciana Gomes Peixoto pelo respeito, carinho, companheirismo, dedicação, humor e amor. A vocês queridos irmãos paz e bem;

*Força sempre...*

A todos vocês meu eterno agradecimento.

Agradecimentos

A Deus,

força sempre..., sempre a mesma força...., força pra lutar... e seguir.

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola pela confiança e tempo depositados na minha formação acadêmica e pessoal.

Aos Professores do Instituto de Genética e Bioquímica por sempre e de bom grado, auxiliar em minha pesquisa disponibilizando tempo, equipamentos e valiosas sugestões.

Aos funcionários e colegas da Universidade Federal de Uberlândia pelo trabalho que realizamos juntos.

Ao Ms Pablo Marcos Veras Peixoto por ter contribuído de forma singular em minha formação acadêmica e profissional.

A Dra. Fátima Rodrigues da Silva pelo convívio e experiências realizadas ao decorrer deste período.

A Dra. Letícia Euqueres Borges Partata que tanto me auxiliou no início dessa jornada.

Aos meus amigos de coração, cervejas, festas, noites em claro e trabalho, muito trabalho, Ana Paula, André, Andréa, Aníbal, Carlos, Carol, Cibele, Cínara, Cíntia, Daniela, Decivaldo, Fabiana, Fausto, Gabriel, Guilherme, Hugo, Inêz, Ismair, Juliana, Karine, Letícia, Lívia, Lorena, Luciana, Luiz, Michel, Miguel, Paulo, Renata, Rogério, Romeu, Rone, Rosy, Thiago, Vanessa, Vinícius, Vivian....Os amigos com nome repetido sintam-se acolhidos.

De forma especial quero agradecer ao Fausto Capparelli, ao Aníbal Monteiro, Renata Roland e a Luciana Karen por terem me ajudado a construir essa história. Amigos saibam que essa também é sua.

A minha Namorada Ana Clara Silveira Broggini que com seu carinho, tempo, dedicação, generosidade e sorriso tanto me ajudou para que esse trabalho fosse realizado de forma natural e tranqüilo.

Ao Apiário Girassol, Granja Planalto pelo fornecimento da matéria prima utilizada para a realização dessa tese.

### ***Lista de abreviaturas***

---

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
Aa	Aminoácido
Bp	Par de bases
BSA	Soroalbumina bovina
DNA	Ácido Desoribonucleico
EDTA	Acido etilenodiamínico tetracético
EGTA	Acido etilnaglicol-bis-(β mino etil eter) N', N'-tetracético
ELISA	immunosorbent assay Enzyme linked
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil α-D-tiogalactosise
kDa	Quilodalton
L	Litro
M	Molar
Ng	Nanogramas
OD	Densidade ótica
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Fosfato de sódio
PBST	Fosfato de sódio com tween 20
PEG	Polietileno glycol
Pfu	Unidades formadoras de colônias
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D	Bibliotecas de <i>Phage display</i> New England Biolabs
Ph.D- 12mer	Biblioteca contendo 12 peptídeos randômicos
PIII	Proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
PIV	Proteína 4
PVIII	Proteína VIII capsídica de bacteriófagos filamentosos
PVIII	Proteína 8
RdRp	Rna dependente de RNA-polimerase
RELIC	Receptor Ligants Contents
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- α-D-galactosideo

---

***Lista de aminoácidos***

---

Ácido aspártico	D
Ácido glutâmico	E
Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Cisteína	C
Fenilalanina	F
Glicina	G
Glutamina	Q
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Prolina	P
Serina	S
Tirosina	Y
Treonina	T
Triptofano	W
Valina	V

---

## Capítulo Geral

Figura 01: Castas da abelha <i>Apis mellifera</i> .....	05
Figura 02: Organização básica do cérebro da abelha.....	07
Figura 03: Esquema dos ciclos do Biopanning.....	13

## Capítulo 01

Figura 01: Titulação dos anticorpos anti-MRJP1 e anti-MRJPt.....	40
Figura 02: Diferenças na expressão dos polipeptídeos correlacionados as MRJPs nos tecidos de abelha.....	41
Figura 03: Imunoprecipitação do p57 da fração solúvel de cérebro da abelha operária <i>A. mellifera</i> .....	42
Figura 04. Imunolocalização das MRJPs na glândula hipofaríngea e nas principais regiões do cérebro da abelha <i>A. mellifera</i> .....	43
Figura 05: Análise de bioinformática da distribuição e da identidade das MRJPs em bancos de dados públicos.....	44

## Capítulo 02

Tabela 01: Correlação entre as médias das identidades das MRJPs (1 – 9) pelo programa Clustal W (18.1).....	69
Figura 01: Titulação, amplificação e extração do DNA plasmidial referente aos polipeptídeos imunoreativos com o anti-MRJP1.....	70
Tabela 02: Sequências dos peptídeos reativos com o anti-MRJP1.....	71
Figura02: Imunodeteção da proteína pIII de fagos expressos em bactérias ER2738.....	72
Figura 03: Predição da estrutura secundária da MRJP1 da <i>Apis mellifera</i> e, mapeamento das regiões antigênicas desta proteína.....	73-74
Figura 04: Análise das identidades das MRJP1 – MRJP5 utilizando o programa Clustal W (18.1) e determinação dos sítios antigênicos dessas proteínas.....	75-76
Figura 05: Imunomarcagem das possíveis proteínas que interagem com as MRJPs no cérebro da abelha rainha de <i>Apis mellifera</i> .....	77-78



**Figura 06: Imunomarcacão das possíveis proteínas que interagem com a MRJPs no cérebro da abelha zangão de *Apis mellifera*.....79**

**Figura 07: Imunomarcacão das possíveis proteínas que interage com a MRJPs no cérebro da abelha operária campeira de *Apis mellifera*.....80-81**

**Figura 08: Imunomarcacão das possíveis proteínas que interagem com a MRJPs no lobo óptico da abelha operária nutridora de *Apis mellifera*.....82-83**

**Figura 09: Previsão das possíveis funções estruturais, moleculares e biológicas da MRJP1 para a abelha *Apis mellifera*.....84**

Resumo Geral.....	3
Introdução Geral.....	4
Abelha <i>Apis mellifera</i> .....	4
Sistema Nervoso da abelha <i>A. mellifera</i> .....	7
Geléia Real .....	9
Anticorpos .....	11
Apresentação de peptídeos randômicos em fagos (phage display) .....	12
Referências Bibliográficas.....	15
Capítulo 01 .....	26
Resumo.....	27
Abstract.....	28
Introdução .....	29
Material e métodos.....	31
Animais.....	31
Preparação das amostras.....	31
Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE).....	32
Produção de anticorpos.....	32
Purificação do anticorpo .....	32
Titulação do antígeno e do anticorpo .....	33
Imunoprecipitação .....	33
Detecção de polipeptídeos por <i>Western blotting</i> . .....	34
Imunohistoquímica .....	34
Análise bioinformática das MRJPs .....	35
Resultados .....	36
Titulação dos anti-MRJP1 e anti-MRJPt.....	36
Análise da expressão dos polipeptídeos correlacionados às MRJPs nos tecidos de abelha .....	37
Imunoprecipitação do p57 do S1 de cérebro da abelha operária <i>A. mellifera</i> .....	38
Imunolocalização das MRJPs na glândula hipofaríngea e nas principais regiões do cérebro da abelha <i>A. mellifera</i> .....	38
Análise da identidade das MRJPs .....	39
Figuras .....	40
Discussão.....	45
Referências Bibliográficas.....	50
Capítulo 02 .....	56
Resumo.....	57
Abstract.....	58
Introdução .....	59
Material e métodos.....	61
Anticorpos.....	61
Detecção de polipeptídeos por <i>Western blotting</i> . .....	61
<i>Biopanning</i> .....	61
ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) .....	62
Extração de DNA.....	63
Seqüenciamento.....	63
Imunohistoquímica .....	64
Análise de dados pela Bioinformática.....	64

Resultados .....	65
Análise das identidades entre as MRJPs pelo programa Clustal W .....	65
Titulação, amplificação, extração e seqüenciamento do DNA dos fagos positivos.....	65
Imunodeteção da proteína pIII de fagomídios por <i>Western blotting</i> .....	65
Análise da estrutura secundária e regiões antigênicas pelos softwares RELIC e Protean .....	66
Imunolocalização de proteínas sítio-ligantes no cérebro da abelha <i>A. mellifera</i> .....	67
Predição das possíveis funções da MRJP1 pelo fatigo .....	68
Figuras .....	69
Discussão.....	85
Referências Bibliográficas.....	88
Conclusão Geral .....	92

## Resumo Geral

As MRJPs são as principais proteínas hidrossolúveis da geléia real da abelha *Apis mellifera* L. Neste trabalho, detectou-se e imunolocalizou-se proteínas relacionados às MRJPs e suas possíveis proteínas sítio-ligantes no cérebro e glândula hipofaríngea da abelha *Apis mellifera*. Polipeptídeos de massa molecular de 57, 70 foram correlacionados às MRJP1 e MRJP3 e o polipeptídeo de massa molecular de 128kDa um novo polipeptídeo possivelmente relacionado a essa família de proteínas foram encontrados nas regiões analisadas do cérebro dessa abelha. Além disso, 21 peptídeos, gerados por phage displays, foram utilizados em bioinformática para analisar as regiões antigênicas da MRJP1, as quais se repetiram nas outras MRJPs analisadas, bem como localizar possíveis proteínas sítio-ligantes com as MRJPs no sistema nervoso da abelha. Esses resultados trazem uma importante contribuição para a compreensão do papel biológico desta interessante família de proteínas nos tecidos da abelha *A. mellifera*.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, cérebro da abelha, imunodeteção de polipeptídeos, imunolocalização de polipeptídeos, phage display.

## Introdução Geral

### **Abelha *Apis mellifera***

*Apis mellifera* L. é uma das espécies de abelha que desperta grande interesse para a apicultura devido à produção de mel, geléia real (GR), própolis e cera, bem como por sua grande importância na agricultura como excelente polinizadora (Giorgini e Gusman, 1972). Essas abelhas alimentam-se de néctar e pólen e vivem em colônias com cerca de 20.000 indivíduos divididos em: rainha, zangão e operárias (campeira e nutridora) (Winston, 1979).

Na colônia, a rainha vive em média de 1 a 3 anos (Kraus e Page, 1995) e precisa de 16 dias para o seu completo desenvolvimento. As suas principais funções são a oviposição, através de um ferrão modificado em ovipositor, e a produção de um ferormônio que inibe a reprodução das operárias (Winston, 1987). Esse ferormônio, produzido pela glândula mandibular, é composto por ácidos aromáticos (Winston e Slessor, 1992), podendo atuar na inibição da biossíntese do hormônio juvenil e no desenvolvimento comportamental (Kaatz *et al.*, 1992), retardando a ontogenia do forrageamento das operárias e regulando a divisão de trabalho (Robinson *et al.*, 1998; Pankiw *et al.*, 1998; Grozinger *et al.*, 2003).

Cada colônia apresenta uma rainha e caso esta deixe de realizar suas funções, um dos ovos irá receber um tratamento especial através de alimentação exclusiva com GR (Winston, 1987). Aparentemente, as operárias detectam alterações de sinais ou sugerem a produção de uma nova rainha (Butler, 1957). Essa alteração permite um novo sinal no status reprodutivo em que o ovo potencial, ou o de melhor qualidade, será tratado com GR para o desenvolvimento da rainha (Winston, 1987).

O zangão com expectativa de vida entre 20 e 40 dias (Fukuda e Ohtani, 1977) tem como principal função fecundar a rainha e, para isso exibe intensa adaptação comportamental e morfológica (Michener, 1944). Ele apresenta olhos e antenas especializados para vê-la e persegui-la e a maioria dos órgãos internos é arranjada de maneira especial para permitir um voo mais rápido, podendo alcançar a rainha durante o voo nupcial e injetar seu esperma (Winston, 1987). Além disso, o zangão não participa da divisão de trabalho na colônia (Giray e Robinson, 1996).

As operárias possuem um tempo máximo de vida de 320 dias, dependendo da localização geográfica, estação do ano e do genótipo, podendo ser caracterizadas conforme a função exercida dentro da colônia (Winston, 1979). Nos primeiros dias de vida, executam serviços de faxina e, quando as glândulas que produzem GR já estão desenvolvidas, trabalham como nutrizes (operária nutridora), alimentando as larvas. Quando começam a produzir cera, estão aptas a assumir tarefas como a construção dos favos e, por último, quando desenvolvem as glândulas do veneno e do cheiro, as operárias exercem funções de guarda, sinalização e forrageamento (operária campeira) (Winston, 1987). As operárias (nutridora e campeira) são anatomicamente estéreis e criam à prole do membro dominante da colônia, a abelha rainha (Hartfelder, 2000).

Tipicamente, nas abelhas operárias jovens de 03-05 dias, a glândula hipofaríngeal localizada na cabeça produz a enzima invertase, usada para processar néctar em mel. De 06-11 dias, a glândula está completamente desenvolvida e as operárias realizam tarefas dentro da colônia (nutridora). De 17-20 dias, a glândula mostra a atividade primária da invertase (Maurizio, 1965; Simpson *et al.*, 1968), possibilitando o processamento do mel; além de secretar um ferormônio de alarme (2-heptanona) (Cassier e Lensky, 1991). Quando as abelhas começam a guardar e forragear, com 2-3 semanas, a glândula hipofaríngeal apresenta-se reduzida e a glândula do veneno já produz uma quantidade máxima de veneno (operária campeira) (Winston, 1987).

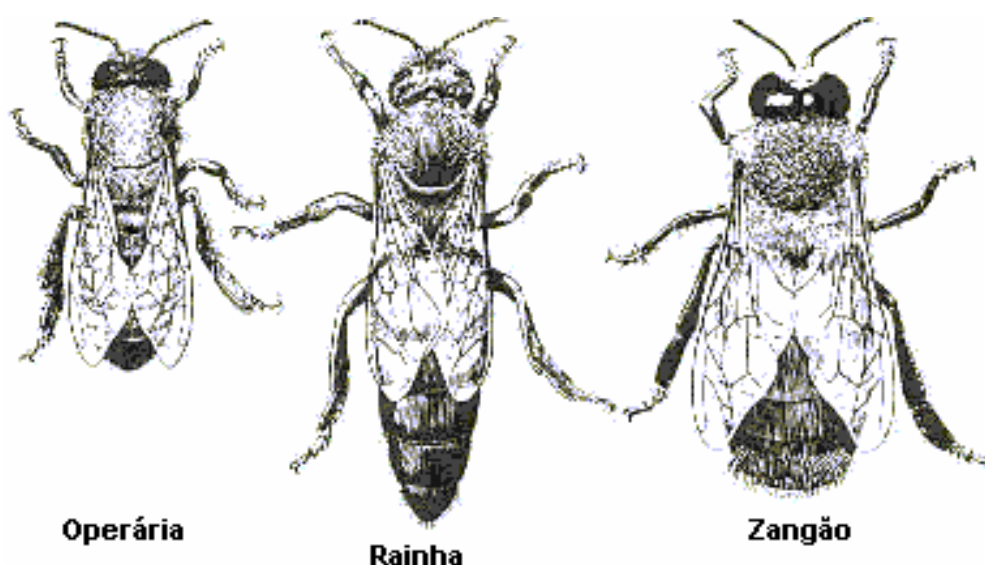


Figura 01: Castas da abelha *Apis mellifera*

Dessa forma, as abelhas apresentam polifenismo ou formas morfológicas alternativas acompanhadas de diferenças fisiológicas e comportamentais nos quais rainhas e operárias são formas alternativas da fêmea, e o zangão, do macho (Evans e Wheeler, 1998).

A divisão de trabalho é um polietismo temporal flexível (Beshers *et al.*, 2001) e, também, um processo altamente regulado pela taxa de hormônios circulantes (Sullivan *et al.*, 2000), por reações químicas no cérebro (Schulz e Robinson, 1999; Wagener-Hulme *et al.*, 1999), por mudanças estruturais do cérebro (Withers *et al.*, 1993), pela influência do gene do forrageamento associado com a idade (Ben-Shahar *et al.*, 2003) e pelo nível de expressão do RNAm *period* e PKG (proteína kinase dependente de GMPc), sendo significativamente alto em operárias campeiras (Toma *et al.*, 2000; Ben-Shahar *et al.*, 2002).

A determinação das castas pode ser regulada pelo nível hormonal, pela expressão diferencial de genes (Evans e Wheeler, 1998) e pelo consumo diário de GR desde seu estágio larval, diferenciando-se em rainha (Schmitzová *et al.*, 1998). Na expressão diferencial gênica, existem vários genes responsáveis pela diferenciação das abelhas rainha e operária, sendo que sete locos caracterizam a evolução e a função do grupo (Evans e Wheeler, 1998). Este estudo também demonstrou a expressão diferencial dos genes citocromo oxidase I, dineína, hexamerina II e ATP sintetase, entre rainha e operária.

Organismos modelos como a *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* dentre outros, possuem alta similaridade e homologia entre seus materiais gênicos. Metade dos genes de *Drosophila*, normalmente implicados na transmissão sináptica e comportamento, estão representados em *A. mellifera*, porém, mais de 100 seqüências transcritas de *A. mellifera* (conservadas em outros organismos) não aparecem no genoma de *Drosophila* (Whitfield *et al.*, 2003).

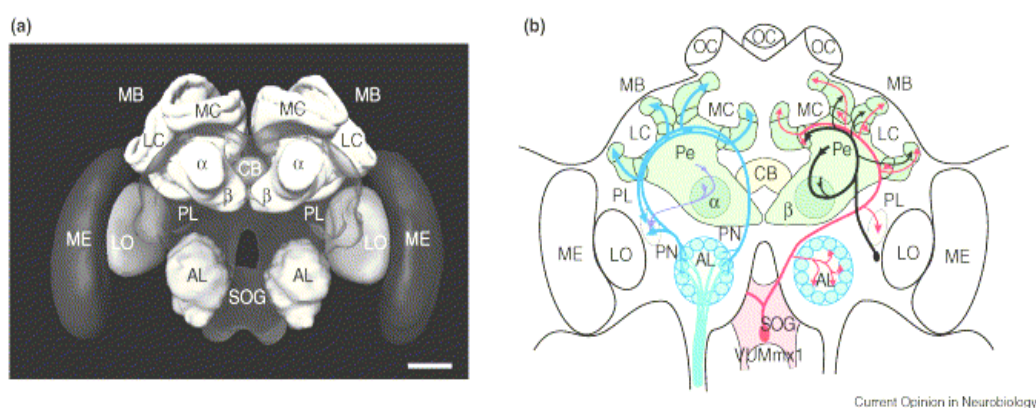
Usando a estratégia ORESTES (*Open Reading frame Expressed Sequence Tags*), foram geradas 5021 seqüências gênicas (cDNA) de todos os estágios de vida das abelhas operárias *A. mellifera* sendo que, mais de 50% dessas seqüências foram validadas (Nunes *et al.*, 2004). Dessa forma, o genoma da *Apis* tornou-se uma realidade que facilitará e completará inúmeros estudos de

ortologia, filogenia, similaridade e homologia de seus vários genes com de outros organismos.

As abelhas trocam informações através de movimentos corporais, orientando sobre fontes de alimento, distâncias e direções da colônia (Vom Frisch, 1967). Enquanto, as operárias nutridoras possuem comportamento higiênico bem desenvolvido, removendo pertencentes da ninhada que estejam doentes ou contaminados para fora da colônia (Spivak *et al.*, 2003) e cuidando das larvas, nutrindo-as com GR (Winston, 1987); as operárias campeiras forrageiam, navegando vários quilômetros, visitando centenas de flores, de maneira rápida e eficiente em busca de comida, aprendendo e memorizando os locais de interesse (Robinson *et al.*, 1997; Menzel e Giurfa, 2001).

### **Sistema Nervoso da abelha *A. mellifera***

As abelhas possuem um sistema nervoso central simples, composto de um cérebro e um cordão nervoso ventral (Oleskevich e Clements, 1997). Em sua forma adulta, a *A. mellifera* apresenta o cordão nervoso com sete gânglios e um cérebro dividido em três regiões: protocérebro compreendido pelos corpos de cogumelo e lobos ópticos; deutocérebro formado pelos lobos antenais; e tritocérebro aparecendo reduzido no adulto (Snodgrass, 1956).



**Figura 02: Organização básica do cérebro da abelha**

**(a)** Reconstrução tri-dimensional do cérebro da abelha em visão frontal. Bar: 200  $\mu$ m. **(b)** Um esquema das neurópilas do cérebro da abelha mostrando as convergências entre os padrões olfatórios (a esquerda, em azul) e os processos gustatórios (a direita, em vermelho). Dois tratos neurais (setas azuis) que transmitem informações olfatórias do lobo antenal para os corpos de cogumelo (a direita, em preto). Abreviações: AL, lobo antenal; CB, corpo central; LO, lóbula; MB, corpos de cogumelo; ME, medula; OC, ocelo; Pe, pedúnculo; PL, protocérebro; PN, projeções neuronais; SOG, gânglio subesofágico; VUMmx1, neurônios ventrais medianos da maxila (GIURFA, 2003).



No protocérebro localizam-se estruturas bilaterais denominadas “*mushroom bodies*”, “*corpora pendunculata*” ou corpos de cogumelo. Esses são relativamente maiores quando comparados com de outros insetos. O aumento da complexidade estrutural pode estar relacionado com a variedade de sinais sensoriais que podem processar (Kamikouchi *et al.*, 2000). Estudos mostram evidências de que os corpos de cogumelo equivalem ao hipocampo dos vertebrados em relação à aprendizagem espacial e estímulos sensoriais dos olhos e antenas. Além disso, muitos pesquisadores relacionam diretamente os corpos de cogumelo com a aprendizagem olfatória e ao comportamento sexual dos insetos (Capaldi *et al.*, 1999).

Cada corpo de cogumelo possui dois cálices e um pedúnculo (Cayre, 1998). Os cálices contêm neurônios intrínsecos, denominados células Kenyon (aproximadamente 170.000 por hemisfério cerebral) (Oleskevich e Clements, 1997). Elas recebem informações de diferentes áreas do cérebro, principalmente dos lobos ópticos e antenais, sendo estruturas essenciais para a associação e integração das informações recebidas. Os estímulos são recebidos pelos neurônios dos cálices, que se ramificam e conduzem a informação para os lobos alfa e beta, localizados no pedúnculo (Cayre, 1998).

As células Kenyon podem ser subdivididas em três tipos: compactadas internas, compactadas externas e não compactadas. As compactadas internas têm um corpo celular muito pequeno e estão empacotadas na região central do cálice. As compactadas externas têm um tamanho e aparência similar às compactadas internas, mas estão no lado externo dos cálices; enquanto as não compactadas estão dispersas no restante dos cálices. (Nässel, 1996).

O lobo óptico das abelhas é uma massa de fibras e células nervosas, presentes em três gânglios sinápticos internos: lâmina, medula e lóbula, os quais contêm receptores sinápticos específicos para as projeções de axônios enviados de fotorreceptores da retina (Nässel *et al.*, 1986). A retina é formada por elementos ópticos, células pigmentadas e fotorreceptores, arranjados em aproximadamente 4.000 omatídeos. Dez tipos de neurônios conectam a lâmina à medula e apenas um tipo conecta a lâmina à lóbula. A medula é formada por aproximadamente sessenta tipos de neurônios, os colunares, que formam estruturas com cerca de trinta axônios, conectando a medula à lóbula e, os

tangenciais, que se projetam para diferentes pontos do lobo óptico. A lóbula possui arborizações mais extensivas dos elementos colunares, formando canais que convergem às nove colunas de neurônios da lóbula para a medula (Nässel, 1986).

Os ocelos, três pequenos “olhos”, encontram-se ligados ao protocérebro e situados na porção anterior da cabeça. A parte externa de cada ocelo é formada por uma lente biconvexa, que contém aproximadamente 800 a 1.000 células da retínula que irão conduzir os estímulos até o restante do protocérebro (Iwama e Shibuya, 1998). A estrutura e a fisiologia dos ocelos indicam que eles são responsáveis pela percepção da quantidade e da intensidade da luz, influenciando na orientação espacial das abelhas (Fent e Wehner, 1985).

No deutero cérebro, o lobo antenal, compreendendo cerca de cento e cinquenta e seis glomérulos, possui neurônios receptores de estímulos olfatórios captados pelas antenas. Esses estímulos são distribuídos para o lobo óptico e corpos de cogumelo, os quais enviam o sinal para neurônios descendentes, que induzirão uma resposta comportamental tanto na região da cabeça, como no tórax e abdômen (Nässel, 1986). O tritocérebro corresponde à porção inferior do cérebro que se encontra relacionada com o gânglio frontal (origem do sistema nervoso estomodeal) e por meio de conectivos com gânglio subesofágico, forma um anel nervoso ao redor do esôfago.

### ***Geléia Real***

A GR é secretada a partir das glândulas hipofaringeais e mandibulares das abelhas operárias jovens, principalmente entre a sexta e décima segunda semana de vida (Nagai *et al.*, 2004; Knecht e Kaatz, 1990; Lensky e Rakover, 1983). A glândula hipofaringeal é bem desenvolvida nas abelhas nutridoras quando comparadas com as abelhas operárias, pois essas se adaptaram para o forrageamento e produção de mel a partir de pólen e aquelas para a produção de GR (Ohashi *et al.*, 1999).

Na constituição química da GR encontram-se vários compostos com atividade biológica como (60 a 70%) água, (12 a 15%) proteínas, (10 a 16%) açúcares, (3 a 6%) lipídeos (principalmente o 10-hidroxi-2-decenóico), (2 a 3%) minerais (ferro e cálcio) e vitaminas (principalmente tiamina, niacina e riboflavina)

(Albert *et al.*, 1999 e Schimitszová *et al.*, 1998; Palma, 1992; Bincoletto *et al.*, 2005).

Entre as proteínas da GR destacam-se as proteínas hidrossolúveis (WSP). As WSP melhor caracterizadas são denominadas de principais proteínas da GR (MRJPs). A família das MRJPs consiste de cinco membros principais: MRJP1 (57kDa), MRJP2 (49kDa), MRJP3 (60-70kDa), MRJP4 e MRJP5 (77-87kDa) (Hanes e Simuth, 1992; Ohashi *et al.*, 1997; Schimitszova *et al.*, 1998; Simuth, 2001). Além dessas, Albert *et al.*, 2004 encontrou três MRJPs (MRJP6 – MRJP8) em bibliotecas de cDNA de cérebro de *A. mellifera*.

A composição da GR, produzida por abelhas européias e africanizadas, foi analisada por pesquisas proteômicas que identificaram a presença de diferentes formas da MRJP1 à MRJP5 e glicose oxidase, apresentando heterogeneidade em termos de massa molecular e ponto isoelétrico (Sato *et al.*, 2004). Posteriormente, Santos *et al.*, (2005) demonstraram que o S1 de glândula hipofaríngea é constituído de 61 diferentes polipeptídeos, dos quais 27 são isoformas da MRJP1 à MRJP8, cinco são proteínas relacionadas com a síntese de carboidratos e metabolismo de oxido-redução de substratos energéticos, uma proteína responsável pelo acúmulo de ferro no corpo da abelha e uma proteína que pode regular o oligômero da MRJP1. As MRJPs representam 82% do total das WSP e cerca de 90% do total de proteínas da GR (Schimitszova *et al.*, 1998).

A GR é o principal alimento da rainha *A. mellifera* desde seu estágio larval. Pesquisas evidenciaram que a determinação das castas pode ser regulada tanto em nível hormonal, pela expressão diferencial de genes (Evans e Wheeler, 1998; Kucharski e Maleszka, 2002; Kamikouchi *et al.*, 2000) como também pelo consumo diário da GR pela larva dessa abelha (Schimitszová *et al.*, 1998).

Estudos com esta classe protéica revelam que são proteínas evolutivamente correlacionadas com as proteínas Yellow de *Drosophila melanogaster*. O transcriptoma de Apis revelou vários contigs de MRJPs, especialmente na biblioteca de cérebro, sendo a MRJP1 altamente representativa. Usando técnicas de *microarray*, *Northern blot* e *Southern blot*, foram encontradas seqüências de DNA complementar (cDNA) e RNA mensageiro (mRNA) das MRJP1 e MRJP2 no cérebro da *A. mellifera* (Kucharski *et al.*, 1998, Kucharski e Maleszka, 2002).

A GR é amplamente utilizada como suplemento alimentar associado à longevidade e está presente na composição de cosméticos em vários países (Kamakura *et al.*, 2001). Além disso, apresenta diversas atividades biológicas e farmacológicas, dentre as quais destacam-se: atividade vasodilatadora e hipotensora (Shimoda *et al.*, 1978; Tokunaga *et al.*, 2004), fatores regulatórios no controle de desenvolvimento da abelha (Malekova *et al.*, 2003) e na modulação de respostas imunes (Okamoto *et al.*, 2003), atividade antihipercolesterolêmica (Nakajin *et al.*, 1982), atividade antiinflamatória podendo atuar na inibição da produção de citocinas próinflamatórias (Kohno *et al.*, 2004), atividade bactericida (Klaudiny *et al.*, 2005), atividade anti-alérgica (Kataoka *et al.*, 2001), antitumoral (Tamura *et al.*, 1987), antifadiga (Kamakura *et al.*, 2001) e antioxidante (Takeshi *et al.*, 2001).

Simuth *et al.*, (2004), utilizando anticorpos policlonais contra as WSPs, verificaram a presença de proteínas da GR (principalmente a de 57kDa) em amostras de mel produzidas a partir de diferentes plantas, e em pólen de abelha. Desta forma, sugeriu-se que essa proteína pode ser usada na avaliação biológica e valorização do mel e do pólen.

### **Anticorpos**

Os anticorpos tem sido uma importante ferramenta laboratorial por suas diversas aplicações, no qual destacamos *Western blotting*, imunohistoquímica, imunocitoquímica, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), imunoprecipitação, dentre outros (Harlow, 1988).

Os anticorpos são classificados de acordo com a quantidade de epítomos que conseguem reconhecer no antígeno, podendo ser classificados como policlonal e monoclonal. Os policlonais são conhecidos por ligarem a vários epítomos de um mesmo antígeno, ao contrário os monoclonais têm a especificidade elevada e se ligam a um único epítomo (Ausubel, 2001). Por esta razão existe uma escolha preferencial dos anticorpos policlonais para detecção de proteínas desnaturadas entre outros variantes (Marshak, 1996). Porém, existem desvantagens. Os anticorpos policlonais, por reconhecerem vários epítomos do antígeno, podem originar reações cruzadas com outros antígenos não específicos e formar *background* indesejável. Para reduzir estes problemas purifica-se a IgG de interesse por imunoafinidade a partir do antígeno imobilizado (Marshak, 1996).

O epítopo é uma característica estrutural de uma molécula na qual a região variável da imunoglobulina se liga. As seqüências curtas de aminoácidos, as cadeias laterais de hidratos de carbono ou mesmo o local de fosforilação de um peptídeo podem servir como um epítopo (Ausubel, 2001). As proteínas contêm diferentes epítopos, e quando uma proteína é injetada em um animal, existe a produção de diferentes anticorpos para todos os epítopos (Ausubel, 2001)

Dessa forma, os anticorpos representam uma intrigante classe de proteínas, por sua inerente capacidade de reconhecer um excesso de epítopos com alta afinidade e especificidade, e também pela sua estabilidade e possibilidades de se montarem (Kretzschmar e Von Ruden, 2002). Esforços em determinar funções de novos produtos gênicos identificados por seqüenciamento de genomas têm se tornado um importante desafio científico. Identificar proteínas que interajam com estes novos produtos gênicos pode ajudar na dedução de sua ação, regulação e função (Benhar, 2001)

O advento da genética molecular tem potencializado o estudo de interações proteína-ligante propiciando meios de produzir moléculas raras em grandes quantidades via sistemas de expressão gênica e focando em regiões específicas ou resíduos de proteínas usando mutagênese sítio dirigida. No entanto, as tecnologias mais comumente usadas na identificação de interações ligante-proteína são laboratorialmente intensivas e muitas vezes não receptivas em avaliações para alta capacidade de processamento de múltiplos produtos gênicos (Benhar, 2001).

### ***Apresentação de peptídios randômicos em fagos (phage display)***

Biblioteca de peptídeos sintéticos apresentados em fagos é uma ferramenta importante para identificar os sítios ligantes de moléculas biológicas no qual uma biblioteca de peptídeos ou proteínas é expressa no exterior da partícula viral, enquanto o material genético codificante para cada peptídeo encontra-se no genoma viral (Azzazy e Highsmith, 2002). Phage display é baseado em clonagem de fragmentos de DNA codificante de milhares de ligantes (ex: peptídeos, proteínas ou fragmentos destas) no interior do genoma de fagos, fusionado ao gene codificante de uma das proteínas do capsídeo deste fago (geralmente PIII, PIV, PVI ou PVIII) (Benhar, 2001).

Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam uma variedade de bactérias Gram-negativas usando *pili* como receptores. Partículas de fagos filamentosos (Ff-cepas M13, f1 e fd) que infectam *Escherichia coli* via F *pili*, consiste em uma fita simples de DNA que é envolta por uma cápsula protéica. Um fago viável expressa de 3 a 5 cópias do gene III (g-3) que codifica a proteína de adsorção pIII composta de 406 aminoácidos, a qual é uma das menores proteínas capsidiais de fago filamentosos, na sua ponta/extremidade (Azzazy e Highsmith, 2002).

Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que fagos filamentosos não geram uma infecção lítica em *E. coli*, mas preferencialmente induz um estado na qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago. A infecção é iniciada pelo acoplamento da g3p do fago ao f *pilus* de uma *E. coli* do gênero masculino. Somente o DNA de fita simples e circular do fago penetra na bactéria onde é convertido pela maquinaria de replicação do DNA bacterial em uma forma replicativa de plasmídeo de fita dupla. Esta forma do plasmídeo sofre constantes replicações do DNA circular para gerar DNA de fita simples e ainda servir como template para expressão das proteínas de fago gp3 e gp8. A progênie de fago é montada por empacotamento do DNA de fita simples em capsídeos protéicos e expulsos através da membrana bacteriana no meio (Azzazy e Highsmith, 2002).

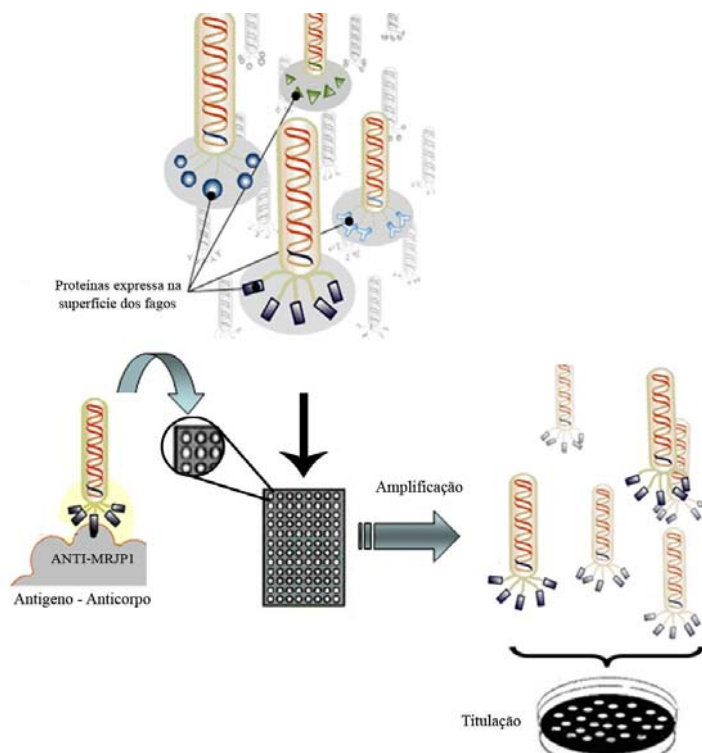


Figura 03: **Esquema dos ciclos do Biopanning**

Phage display tem se destacado pela identificação de epítomos imunogênicos ou mimetopos em peptídeos expostos. (Benhar, 2001). Pesquisas mostram que bacteriófago filamentoso tal como M13 e sua proteína capsidial III (pIII) são mais normalmente usados para exposição de anticorpos, apesar de que mostrou-se que bacteriófagos T7 também podem ser usados na exposição de anticorpos (Rosenberg *et al.*, 1996).

Durante os últimos 10 anos, exposição de anticorpos em fagos tem se transformado em uma técnica bem aceita e, num pequeno espaço de tempo tem gerado anticorpos de altíssima qualidade. Epítomos ou mimetopos isolados por esta técnica pode ser uma ferramenta útil, no qual se destacam: desenvolvimento de vacinas (Benhar, 2001); determinantes antigênicos do parasita da malária, *P. falciparum* (Willis *et al.*, 1993); exposição de fagos em fluido gástrico (Zuercher *et al.*, 2000); estudo do vírus da Dengue (Wu *et al.*, 2001); do vírus da AIDS (Guardiola *et al.*, 2001); hepatite E (Gu *et al.*, 2004); hepatite B (Lu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004); hepatite A (Kim *et al.*, 2004a); hepatite C (Cao *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Houshmand e Bergqvist, 2003; Petit *et al.*, 2003); mal de Parkinson (Gearhart *et al.*, 2002); descoberta de novas drogas (Kretzschmar e Von Ruden, 2002); exposição de peptídeos em superfície tecido-específico (Trepel *et al.*, 2002; Pasqualini e Ruoslahti, 1996); produção de anticorpos recombinantes fusionado na superfície de um biossensor capaz de gerar detecção em tempo real de antígenos-alvo (Azzazy e Highsmith, 2002).

## **Referências Bibliográficas**

Albert, S., Bhattacharya, D., Klaudiny, J., Shmitzová, J., Imúth, J., 1999<sup>a</sup>. The family of major royal jelly proteins and its evolution. *J. Mol. Evol.* 49, 290-297.

Albert, S., Klaudiny, J., 2004. The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identifications of new members in the EST library. *J. Insect. Physiol.* In Press, 50, 51-50.

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E., Kingston, D.D., Moore, J.G., Seidman, J.A., Smith, & K. Struhl, editors., 2001. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, New York.

Azzazy, H.M., Highsmith, W.E.Jr., 2002. Phage display technology: clinical applications and recent innovation. *Clin. Biochem.* 35, 425-45.

Benhar, I., 2001. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol. Adv.* 19, 1-33.

Ben-Shahar, Y., Leung, H.T., Pak, W.L., Sokolowski, M.B., Robinson, G.E. 2003. cGMP-dependent changes in phototaxis: a possible role for the foraging gene in honey bee division of labor. *J Exp Biol.* 206, 2507-2515.

Ben-Shahar, Y., Robichon, A., Sokolowski, M.B., ROBINSON, G.E., 2002. Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science* 296, 741-744.

Beshers, S., Huang, Z. Y., Oono, Y., Robinson, G.E. 2001. Social inhibition and the regulation of temporal polyethism in honey bee. *J Theor Biol.* 213, 461-479.

Bincoletto, C., Eberlin, S., Figueiredo, C.A., Luengo, M.B., Queiroz, M.L., 2005. Effects produced by Royal Jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *Int. Immunopharmacol.* , 5(4), 679-88.



Cao, J., Zhao, P., Miao, X.H., Zhao, L.J., Xue, L.J., Qi Zt, Z., 2003. Phage display selection on whole cells yields a small peptide specific for HCV receptor human CD81. *Cell Res.* 13, 473- 479.

Capaldi, E.A., Robinson, G.E., Fahrbach, S.E., 1999. Neuroethology of spatial learning: the birds and the bees. *Annu Rev Psychol.* 50, 651-682.

Cassier, P., Lensky, Y., 1991. The ontogeny of juvenile hormone III, ecdysteroids and 2-heptanone level in developing and adult worker honey bees. *C R Acad Sci II.* 321, 343-348.

Cayre, M., 1998. Adult insect mushroom body neurons in primary culture: cell morphology and characterization of potassium channels. *Cell Tissue Res.* 291, 537-547.

Evans, J.D., Wheeler, D.E., 1998. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5575-5580.

Fent, K., Wehner, R., 1985. Ocelli: A celestial compass in the desert ant *Cataglyphis*. *Science* 228, 192-194.

Fukuda, H., Ohtani, T., 1977. Survival and life span of drone honey bees. *Res. Popul. Ecol.* 19, 51-68.

Gearhart, D.A., Toole, P.F., Warren Beach, J., 2002. Identification of brain proteins that interact with 2-methylnorharman. An analog of the parkinsonian-inducing toxin, MPP+. *Neurosci Res.* 44, 255-65.

Giorgini, J.F., Gusman. A.B., A importância das abelhas na polinização. In: Camargo, J. M. F., 1972. *Manual de Apicultura*. Ed Agronômica Ceres, Brasil, pp 155-163

Giray, T., Robinson, G.E., 1996 Common endocrine and genetic mechanisms of behavioral development in male and worker honey bees and the evolution of division of labor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 11718-11722.

Giurfa, M., 2003. Cognitive neuroethology: dissecting non-elementar learning in a honeybee brain. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 13, 726-735.

Grozing, C.M., Sharabash, N.M., Whitfiels, C.W., Robinson, G.E., 2003. Pheromone-mediated gene expression in the honey bee brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 14519-14525.

Grünbaum, L., Müller, U., 1998. Induction of a specific olfactory memory leads in a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *J Neurosci* 18, 4384-4392.

Gu, Y., Zhang, J., Wang, Y.B., Li, S.W., Yang, H.J., Luo, W.X., Xia, N.S., 2004. Selection of a peptide mimicking neutralization epitope of hepatitis E virus with phage peptide display technology. *World J. Gastroenterol.* 10, 1583-1588.

Guardiola, J., De Berardinis, P., Sartorius, R., Fanutti, C., Perham, R.N, Del Pozzo, G., 2001. Phage display of epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses *in vitro* and *in vivo*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 495, 291-298.

Hanes, J., Simuth, J., 1992. Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J. Apic. Res.* 31, 22-26.

Harlow E, Lane D. 1988. Monoclonal Antibodies, Chapter 6 in: Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. ISBN 0-87969-314-2.

Hartfelder, K., 2000. Insect juvenile hormone: from “status quo” to high society. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 157-177.

Houshmand, H., Bergqvist, A., 2003. Interaction of hepatitis C virus NS5A with La protein revealed by T7 phage display. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 695-701.

Iwama, A., Shibuya, T., 1998. Physiology and morphology of olfactory neurons associating with the protocerebral lobe of the honeybee brain. *J. Insect Physiol.* 44, 1191-1204.

Kaatz, H. H.; Hildebrandt, H.; Engels, W., 1992. Primer effect of queen pheromone on juvenile hormone biosynthesis in adult worker honey bees. *J. Comp. Physiol. B*, 162, 588-592.

Kamakura, M., Mitani, N., Fukuda, T., Fukushima, M., 2001. Antifatigue effect of fresh royal jelly in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 47, 394-401.

Kamikouchi, A., Morioka, M., Kubo, T., 2004. Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex- and/or caste selective manner. *Zoolog Sci.* 21, 53-62.

Kataoka, M., Sasaki, M., Hidalgo, A. R., Nakano, M., Shimizu, S., 2001. Glycolic acid production using ethylene glycol-oxidizing microorganisms. *Biosci Biotechnol Biochem.* 10, 2265-2270.

Kim, S.J., Jang, M. H., Stapleton, J. T., Yoon, S. O., Kim, K.S., Jeon, E.S., Hong, H.J., 2004a. Neutralizing human monoclonal antibodies to hepatitis A virus recovered by phage display. *Virology* 318, 598-607.

Klaudiny, J., Hanes, J., Kulifajova, J., Albert, S., Simuth, J., 1994. Molecular cloning of two cDNA from the heads of the nurse honey bee (*Apis mellifera* L.) for coding related proteins of royal jelly. *J. Apic. Res.* 33, 105-111.

Knecht, D., Kaatz, H.H., 1990. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honeybees. *Apidologie* 21, 457-468.

Kohno, K., Okamoto, I., Sano, O., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M., 2004. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1, 138-145.

kraus, B., Page, R. E., 1995. Effect of *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae) on feral *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in California. *Environ. Entomol.* 24, 1473-1480.

Kretzschmar, T., Von Ruden, T., 2002. Antibody discovery: phage display. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 598-602.

Kucharski, R., Maleszka, R., 2002. Molecular profiling of behavioural development: differential expression of mRNAs for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoforms in naive and experienced honeybees (*Apis mellifera*). *Brain Res Mol Brain Res.* 99, 92-101.

Kucharski, R., Maleszka, R., Hayward, D.C., Ball, E.E., 1998. A royal jelly protein is expressed in a subset of Kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee brain. *Naturwissenschaften* 85, 343-346.

Lensky, Y., Rakover, Y., 1983. Separate protein body compartments of the workers honeybee (*Apis mellifera* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 75, 607–615.

Lu, X., Weiss, P., Block, T., 2004. A phage with high affinity for hepatitis B surface antigen for the detection of HBsAg. *J Virol Methods.* 119, 51-54.

Malecova, B., Ramser, J., O'Brien, J.K., Janitz, M., Judova, J., Lehrach, H., Simuth J., 2003. Honeybee (*Apis mellifera* L.) mrjp gene family: computational analysis of putative promoters and genomic structure of mrjp1, the gene coding for the most abundant protein of larval food. *Gene* 16, 165-175.

Marshak, D.R., J.T. Kadonaga, R.R. Burgess, M.W. Knuth, W.A. Brennan, Jr, & S.-H. Lin., 1996. Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Press, New York.

Maurizio, A., 1965. Breakdown of sugars by inverting enzymes. *An. Abeille* 5, 215-232.

Menzel, R., Giurfa, M., 2001. Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee.. *Trends Cogn Sci.* 5, 62-71.

Michener, M.H., 1944. Comparative external morphology, phylogeny and a classification of the bees (Hymenoptera). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 82, 151-326.

Nagai, T., Inoue, R., 2004. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chem.* 84, 181-186.

Nakajin, S., Okiyama, L., Yamasyita, S., Akiyama, Y., Shinoda, M., 1982. Effect of royal jelly on experimental hypercholesterolemia in rabbits. *Yakugaku Zasshi* 36, 65-69.

Nässel, D.R., 1993. Neuropeptides in the insect brain: a review. *Cell Tissue Res.* 273, 1-29.

Nässel, D.R., Helgee, A., Sivasubramanian, P., 1986. Development of axon paths of motoneurons after removal of target muscles in holometabolous insect. *Brain Res.* 391, 211-219.

Nässel, D.R., Helgee, A., Sivasubramanian, P., 1986. Development of axon paths of motoneurons after removal of target muscles in holometabolous insect. *Brain Res.* 391, 211-219.

Nunes, F.M., Valente, V., Sousa, J.F., Cunha, M.A., Pinheiro, D.G., Maia, R.M., Araujo, D.D., Costa, M.C., Martins, W.K., Carvalho, A.F., Monesi, N., Nascimento,

A.M., Peixoto, P.M., Silva, M.F., Ramos, R.G., Reis, L.F., Dias-Neto, E., Souza, S.J., Simpson, A.J., Zago, M.A., Soares, A.E., Bitondi, M.M., Espreafico, E.M., Espindola, F.S., Paco-Larson M.L., Simoes, Z.L., Hartfelder, K., Silva, W.A. Jr., 2004. The use of Open Reading frame ESTs (ORESTES) for analysis of the honey bee transcriptome. BMC Genomics 3;5(1):84.

Ohashi, K., Natori, S., Kubo, T., 1997. Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. Eur J Biochem. 249, 797-802.

Ohashi, K., Natori, S., Kubo, T., 1999. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). Eur J Biochem. 265, 27-33.

Okamoto, I., Taniguchi, Y., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M., 2003. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses *in vitro* and *in vivo*. Life Sci. 73, 2029-2045.

Oleskevich, S., Clements, J.D., 1997. Srinivasan MVJ Long-term synaptic plasticity in the honeybee. J Neurophysiol. 78, 528-532.

Palma, M.S., 1992. Composition of freshly harvested Brazilian royal jelly identification of carbohydrates from the sugar fraction. J. Apic. Res. 31, 42–44.

Pankiw, T., Huang, Z.Y., Winston, M.L., Robinson, G.E., 2003. Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers. J Insect Physiol. 44, 685-692.

Pasqualini, R., Ruoslahti, E., 1996. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. Nature 380, 364-366.

Petit, M.A., Jolivet-Reynaud, C., Peronnet, E., Michal, Y., Trepo, C., 2003. Mapping of a conformational epitopes shared between E1 and E2 on the serum-derived human hepatitis C virus envelope. *J Biol Chem.* 278, 44385-44392.

Robinson, G. E., 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Entomol.* 37, 637-665.

Robinson, G. E., Winston, M. L., Huang, Z., Pankiw, T., 1998. Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers. *J Insect Physiol.* 44, 685-692.

Robinson, G.E., Fahrbach, S.E., Winston, M.L., 1997. Insect societies and the molecular biology of social behavior. *Bioessays.* 19, 1099-1108.

Rosenberg, A., Griffin, K., Studier, F.W., McCormick, M., Berg, J., Novy, R., Mierendorf, R., 1996. T7 Select phage display system: a powerful new protein display system based on bacteriophage T7. *Innovations* 6, 1-6.

Santos, K. S., dos Santos, L. D., Mendes, M. A., de Souza, B. M., Malaspina, O., Palma, M. S., 2005. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Biochem Mol Biol.* 35, 85-91.

Sato, O., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M., 2004. Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by two-dimensional gel electrophoresis. *J Agric Food Chem.* 52, 15–20.

Schimitzová, J., Klaudivy, J., Albert, S., Schroder, W, Shreckengost, W., Hanes, J., Júdová, J., Simúth, J., 1998. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol Life Sci.* 54, 1020-1030.

Schulz, D.J., Robinson, G.E., 1999. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies. J Comp Physiol [A]. 184, 481-488.

Shimoda, M., Nakajin, S., Oikawa, T., Sato, K., Kamogawa, A., Akivama, Y., 1978. Biochemical studies on vasodilative factor in royal jelly. Yakugaku Zasshi 2, 139-145.

Simpson, J., Riedel, L.B.M., Wilding, N., 1968. Invertase in the hypopharyngeal glands of the honey bee. J. Apic. Res. 7, 29-36.

Simúth, J., Bíliková, K., Kováčová, E., Kuzmová, Z., Schroder, W., 2004. Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF-alpha release is a regular component of honey..J Agric Food Chem. 52, 2154-2158.

Simuth, U., 2001. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. Apidologie 32, 69-80.

Snodgrass, R. E., 1956. In: Anatomy of the honey bee. (Comstock Publ. Ass. New. York., USA).

Spivak, M., Masterman, R., Ross, R., Mesce, K.A., 2003. Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. J Neurobiol. 55, 341-354.

Sullivan, J., Jassim, O., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E., 2000 Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. Horm Behav. 37, 1-14.

Takeshi, N., Mizuho, S., Reiji I., Hachiro, I., Nobutaka, S., 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. J Agric Food Chem 75, 237-240.



Tamura, T., Fujii, A., Kuboyama, N., 1987. Antitumor effects of royal jelly RJ. Nippon Yakurigaku Zasshi. 89, 73-80.

Tokunaga, K. H., Yoshida, C., Suzuki, K. M., Maruyama, H., Futamura, Y., Araki, Y., Mishima, S., 2004. Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats. Biol Pharm Bull. 2, 189-192.

Toma, D.P., Bloch, G., Moore, D., Robinson, G.E., 2000. Changes in period mRNA levels in the brain and division of labor in honey bee colonies. Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 6914-6919.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. . Proc Natl Acad Sci U S A. 76, 4350-4354.

Trepel, M., Arap, W., Pasqualini, R., 2002. *In vivo* phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine. Curr. Opin. Chem. Biol.6, 399-404.

Wagener-Hulme, C., Schulz, D.J., Robinson, G.E., 1999. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. J Comp Physiol [A]. 184, 471-479.

Whitfield, C. W., CZIKO, A. M., ROBINSON, G. E., 2003. Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. Science 302, 296-299.

Willis, A.E., Perham, R.N., Wraith, D., 1993. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. Gene 128, 79-83.

Winston, M.L., 1979. Intra-colony demography and reproductive rate of the Africanized honeybee in South America. Behav. Ecol. Sociobiol. 4, 279-292.

Winston, M.L., 1987. In: *The Biology of the Honey Bee* (Harvard Univ. Press, Cambridge).

Winston, M.L., Slessor, K.N., 1992. The essence of royalty: honey bee queen pheromone. *American Scientist*, 80, 374-385.

Withers, G.S., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E., 1993. Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature* 364, 238-240.

Wu, H.C., Huang Y.L., Chao, T.T., Jan, J.T., Huang, J.L., Chiang, H.Y., King, C.C., Shaio, M.F., 2001. Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. *J. Clin. Microbiol.* 39, 977-982.

Zhang, X.X., Deng, Q., Zhang, S.Y., Liu, J., Cai, Q., Lu, Z.M., Wang, Y., 2003. Broadly cross-reactive mimotope of hypervariable region 1 of hepatitis C virus derived from DNA shuffling and screened by phage display library. *J. Méd. Virol.* 71, 511-517.

Zhang, Z.C., Hu, X.J., Yang, Q., 2004. Generation of high affinity human single-chain antibody against PreS1 of hepatitis B virus from immune phage-display antibody library. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 3, 77-81.

Zuercher, A.W., Miescher, S.M., Vogel, M., Rudolf, M.P., Stadler, M.B., Stadler, B.M., 2000. Oral anti-IgE immunization with epitope-displaying phage. *Eur. J. Immunol.* 30, 128-135.

**Identificação e localização de proteínas relacionadas às MRJPs no cérebro  
da abelha *Apis mellifera***

**Capítulo 01**

## **Resumo**

As principais proteínas da geléia real (MRJPs) são uma família única de proteínas da abelha *Apis mellifera*, as quais são altamente expressa na glândula hipofaríngea das abelhas operárias. Para identificar proteínas relacionadas às MRJPs no sistema nervoso destas abelhas, anticorpos foram imunopurificados e testados para revelar polipeptídeos que são reativos a estes anticorpos no cérebro e glândula hipofaríngea desta abelha. As identidades entre as seqüências das MRJPs foram analisadas por bioinformática, e a distribuição das MRJPs nestes tecidos foram testados imunohistoquimicamente. Dentre as espécies de himenópteros investigados somente a *A. mellifera* mostrou reação cruzada dos polipeptídeos com os anticorpos anti-MRJP1 e o anti-MRJPtotal. Três polipeptídeos, p57, p70 e p128, foram detectados na cabeça, cérebro e glândula hipofaríngea desta abelha, apresentando diferenças entre castas, idade e regiões investigadas do cérebro. Esses resultados mostraram: a) O p57 foi o único polipeptídeo imunoprecipitado pelo anti-MRJP1 sugerindo que esse polipeptídeo pode estar relacionado com uma proteína específica do cérebro MRJP1; b) O p70, baseado na massa molecular relativa, pode estar relacionado com a MRJP3 e c) o p128 é um novo polipeptídeo relacionado às MRJPs em regiões do cérebro da abelha e glândula hipofaríngea detectado com o anti-MRJP total e anti-MRJP1 mostrando a localização das MRJPs nas diferentes áreas como os corpos de cogumelo, lobos antenal e ópticos e com uma forte marcação na glândula hipofaríngea. Neste estudo, nós mostramos polipeptídeos imunoreativos com anticorpos para as MRJPs no cérebro e glândula hipofaríngea da *A. mellifera*. A localização das MRJPs em regiões do cérebro pode contribuir para elucidar o papel biológico desta família de proteínas desta abelha.

Palavras-chave: geléia real, MRJPs, cérebro da abelha, glândula hipofaríngea, imunolocalização.

## **Abstract**

The major royal jelly proteins (MRJPs) are a honeybee (*Apis mellifera*) unique protein family, which highly expressed in the hypopharyngeal gland of the worker bee. To identify proteins related to the MRJPs in the bee's nervous system, antibodies were immunopurified and assayed to reveal polypeptides that are reactive to these antibodies in the bee brain and hypopharyngeal gland. The identities between the MRJPs sequences were analyzed through bioinformatics, and the distribution of the MRJPs in these tissues was investigated immunohistochemically. Among some hymenoptera species investigated only *Apis mellifera* showed polypeptides that cross-reacted to the anti-MRJP1 and anti-MRJP total antibodies. Three polypeptides, p57, p70 and p128, were detected in the honeybee head, brain and hypopharyngeal gland with some detection pattern upon differences of bee caste, age and brain areas investigated. The results showed: a) p57 was the only polypeptide immunoprecipitated by anti-MRJP1 suggesting that it may be related to a MRJP1 brain specific protein; b) p70, based in the relative molecular mass, may be related to MRJP3 and c) p128 is a new not yet reported MRJP-like protein in the brain sections of the bee brain and hypopharyngeal gland probed with both anti-MRJP total and anti-MRJP1 showed the localization of MRJPs in different brain areas such as mushroom bodies, optical and antennal lobe and a strong staining in the whole gland. In this study, we showed polypeptides immunoreactive to the antibodies for the MRJPs in the brain and hypopharyngeal gland of *A. mellifera*. The localization of these MRJPs in regions of the brain may contribute to elucidate the biological role of this family of proteins present in these honeybees.

Key words: royal jelly, MRJPs, honeybee brain, hypopharyngeal gland, immunolocalization.

## **Introdução**

A determinação das castas nas abelhas *Apis mellifera* L., o seu desenvolvimento, sua plasticidade fenotípica e seu comportamento estão relacionados com a expressão de diferentes genes e pelo consumo de geléia real (GR) no estágio larval. (Schmitzová *et al.*, 1998; Kucharski e Maleszka, 2002; Kamikouchi *et al.*, 1998, 2004; O'shea e Schaffer, 1985; Tublitz *et al.*, 1986, 1991; Nässel, 1993; Evans e Wheeler, 1998; Page e Erber, 2002; Malekova *et al.*, 2003). A expressão do mRNA da MRJP1, bem como a expressão diferencial do cDNA da MRJP2 em relação a idade, foi observada no cérebro das abelhas operárias (Kucharski *et al.*, 1998, Kucharski e Maleszka, 2002). O transcriptoma da *A. mellifera* revelou contigs de MRJPs, principalmente a MRJP1, em bibliotecas de cérebro dessa abelha (Whitfield *et al.*, 2002). Sendo ainda que os genes das MRJPs expressam proteínas únicas evolutivamente e apresentam homologia apenas com genes conservados em dípteros (*D.melanogaster* e *A. gambiae*) (NCBI/homologene/honeybee).

A GR é sintetizada e secretada pelas glândulas cefálicas, das abelhas operárias jovens *A. mellifera*, entre a sexta e a décima segunda semana de vida (Nagai *et al.*, 2004; Knecht e Kaatz, 1990; Lensky e Rakover, 1983). Essa secreção é o principal alimento da abelha rainha desde seu estágio larval, sendo uma das suas funções a diferenciação das castas (Schmitzová *et al.*, 1998). A constituição da GR é de 60 a 70% de água, 12 a 15% de proteínas, 10 a 16% de açúcar, 3 a 6% de lipídeos e os 2 a 3% restantes são vitaminas, aminoácidos livres, moléculas de baixo peso molecular e sais minerais (Albert *et al.*, 1999; Schmitzová *et al.*, 1998; Bincoletto *et al.*, 2005).

As glândulas cefálicas (hipofaringeal e mandibular) são separadas morfológica e funcionalmente. As glândulas hipofaringeais têm como principais funções a produção de GR e o processamento do néctar em mel (abelhas nutridoras) e as glândulas mandibulares de secretar ferormônio de alarme (abelhas campeiras) (Maurizio, 1965; Simpson *et al.*, 1968; Winston, 1987; Kubo *et al.*, 1996). Portanto, diferenças da idade e do comportamento podem influenciar na presença de certas proteínas e enzimas envolvidas em funções específicas da glândula hipofaringeal da abelha operária nutridora e campeira (Kubo *et al.*, 1996; 1999).

Entre as proteínas secretadas pela glândula hipofaríngeal, destacam-se as proteínas hidrossolúveis (WSP). As WSP melhor caracterizadas são denominadas de principais proteínas da GR (MRJPs). As MRJPs consistem de cinco principais proteínas (MRJP1 – MRJP5) (Hanes e Simuth, 1992; Ohashi *et al.*, 1997; Schimitszova *et al.*, 1998; Simuth, 2001). Além dessas foram encontradas três MRJPs (MRJP6 – MRJP8) em bibliotecas de cDNA de cérebro de *A. mellifera* (Albert e Klaudiny, 2004)

As MRJP1 (57kDa), MRJP2 (49kDa), MRJP3 (60-70kDa), MRJP4 e MRJP5 (77-87kDa), representam 82% do total das WSP e cerca de 90% do total de proteínas da GR (Hanes e Simuth, 1992; Ohashi *et al.*, 1997; Schimitszova *et al.*, 1998; Simuth, 2001). Homogeneizado da glândula hipofaríngeal da abelha *A. mellifera* africanizada quando submetido à análise proteômica apresentou 61 diferentes polipeptídios, dos quais 27 são isoformas das MRJPs (6 MRJP1; 8 MRJP2; 5 MRJP3; 2 MRJP4; 3 MRJP5, 1 MRJP6; 1MRJP7 e 1 MRJP8) (Santos *et al.*, 2005).

Para identificar proteínas relacionadas às MRJPs no sistema nervoso da abelha, anticorpos foram produzidos contra a MRJP1, MRJP2 e MRJPtotal, e utilizados em ensaios bioquímicos e imunohistoquímicos. Nesse sentido, procurou-se detectar polipeptídeos relacionados às MRJPs nos diferentes tecidos da *A. mellifera*. Nos tecidos onde as proteínas foram imunodetectadas, buscou-se determinar qual proteína imunoreagiria com os anticorpos produzidos neste estudo, bem como averiguar se existe diferentes distribuições dessas proteínas nesses tecidos. As identidades entre as seqüências das MRJPs foram investigadas por bioinformática, e a distribuição das MRJPs nestes tecidos foi investigada imunohistoquimicamente.

## **Material e métodos**

### **Animais**

As abelhas *Apis mellifera*, *Mellipona scutellaris* e *Scaptotrigona postica* e a formiga *Camponotus atriceps* foram coletadas no Jardim experimental do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia. Os coelhos e camundongos utilizados nos ensaios de imunização foram mantidos no centro de Bioterismo e Laboratório de Experimentação Animal desta Universidade.

### **Preparação das amostras**

Os tecidos de interesse (cabeças, cérebros e glândulas hipofaringeais) (n=30) dos insetos foram dissecados, congelados em ultra-freezer -80°C até o processamento. Para a obtenção do homogeneizado processou-se o material dissecado em 1 mL de tampão TH (40 mM Hepes pH 7.7; 10 mM EDTA; 2 mM EGTA; 5 mM ATP; 2 mM DTT; 1 mM benzamidina; 0.1 mM aprotinina e 0.5 mM PMSF).. Para obtenção da amostra sobrenadante centrifugou-se o homogeneizado a 40.000xg por 40 minutos a 4°C. Em ambas as amostras de homogeneizado e sobrenadante determinou-se a concentração de proteína para análise em SDS-PAGE e *Western blotting*.

Os cérebros da *A. mellifera* (n=30) foram dissecados, isolando-se os lobos ópticos, os lobos antenais, os pedúnculos e os corpos de cogumelo. Cada região foi homogeneizada em 500µL de tampão TH, e centrifugadas a 40.000xg por 40 minutos a 4°C. A fração sobrenadante obtida desta centrifugação foi processada como descrito acima.

A GR (Apiário Girassol LTDA, Uberlândia – MG), foi estocada em ultrafreezer -80°C. Alíquotas de 2g de GR foram homogeneizadas em 12mL de tampão TH' pH 8.0 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; 20 mM EDTA) durante 30 minutos em gelo com agitação em vórtex a cada 5 minutos e em seguida centrifugada a 10000xg a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante (S1) foi dializado em tampão TH'' pH 8.0 (20 mM Tris HCl; 0.5 mM EDTA), por 24 horas e novamente centrifugado na mesma condição para obtenção do sobrenadante (S2) da GR. A amostra S2 foi preparada após a determinação da concentração de proteína para ensaios de imunização, SDS-PAGE e *Western blotting*.



### **Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)**

As amostras foram preparadas na proporção de 1/10 (v/v) em tampão desnaturante TD (10% SDS, 20% sacarose, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol, 5% EGTA-Na, azul de bromofenol). 10 vezes concentrado. Cada amostra foi ajustada para uma concentração final de 2 $\mu$ g/ $\mu$ L de proteína. Para análise em SDS-PAGE utilizou-se mini-géis com gradiente 5-22% de poliacrilamida, aplicando em cada *lane* 10 $\mu$ g de proteína por amostra. Os géis foram corados com Comassie brilhant Blue - R 250.

### **Produção de anticorpos**

Os coelhos e camundongos foram imunizados dorsalmente com S2 de GR em intervalos de 15 dias. A primeira dose foi administrada com 500  $\mu$ g/mL juntamente com Adjuvante Completo de Freund's. As doses de reforço foram administradas com 250  $\mu$ L/mL juntamente com Adjuvante Incompleto de Freund's. Cada coelho recebeu doses de 1 mL e os camundongos de 250  $\mu$ L.

O sangue foi coletado pelo lobo da orelha (coelho) ou pulsão cardíaca (camundongo), após três administrações de reforço. O soro foi centrifugado a 600xg por 5 minutos a temperatura ambiente e estocado a -20°C. Em seguida, fez-se o teste de ELISA para validação do anticorpo. Depois de três dias da última aplicação realizou-se a sangria do animal para purificação dos anticorpos.

### **Purificação do anticorpo**

Os anticorpos foram purificados pelo método de imunoafinidade. Aplicou-se 10 $\mu$ g/linha de proteína total da GR em gel SDS-PAGE. Os polipeptídios foram eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose 0,45 $\mu$ m com amperagem constante de 100mA overnight a 4°C. A banda de interesse, correspondente a MRJP1 e MRJPtotal (denominados anti-MRJP1 e anti-MRJPt respectivamente), foram cortadas em fitas de nitrocelulose, colocadas em microtubos e incubadas com solução bloqueio SB (50 mM tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 0.5% de leite desnatado) por 12 horas a 4°C, lavadas 3 vezes 5 minutos com TBS-T (50 mM tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20). Posteriormente incubou-se as fitas com o soro coletado dos coelhos por 12 horas a 4°C. Os anticorpos foram eluídos contra as MRJPs de interesse com 1,4% trietilamina por 5 minutos sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, a reação foi

neutralizada adicionando 100µL de Tris-HCl 1M pH 8,5. A fração eluída foi dialisada contra TBS (50 mM tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCl) por 2 dias.

Após a diálise foi lida a absorbância da amostra em 280nm, a qual possibilitou calcular a concentração dos anticorpos a partir do coeficiente de extinção molar da IgG (1,32).

### **Titulação do antígeno e do anticorpo**

Na titulação do anti-MRJP1 fez-se diluição seriada desse anticorpo nas concentrações 0.4µg (1/2251), 0.2µg (1/4510), 0.15µg (1/6000), 0.1ng (1/9000), e 0.05ng (1/18000). O anticorpo diluído foi incubado com as fitas de nitrocelulose contendo MRJP1 na concentração de 2µg/µL. Para imunodeteção foi usado o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com AP na diluição de 1: 4000. As membranas foram reveladas com NBT/BCIP em tampão de fosfatase alcalina (AP).

Para a titulação do antígeno, fez-se uma diluição seriada do sobrenadante da GR total nas concentrações 2µg/µL, 0.2µg/µL, 0.02µg/µL, 0.002µg/µL, 0.2ng/µL, 0.02ng/µL e 0.002ng/µL. O *immunoblotting* foi realizado eletrotransferindo as diferentes diluições do antígeno para membrana de nitrocelulose 0,45 µm e sondadas com o anti-MRJP1 na concentração de 0.2µg (1/4510).

Para a comparação da imunodeteção dos anticorpos anti-MRJP1 e anti-MRJPt, fez-se diluições seriadas destes anticorpos, nas concentrações 1/250 (1,2 x 10<sup>-3</sup>µg/µL) ; 1/500 (0,6 x 10<sup>-3</sup>µg/µL); 1/1000 (0,3 x 10<sup>-3</sup>µg/µL); 1/2000 (0,15 x 10<sup>-3</sup>µg/µL); 1/4000 (7,5 x 10<sup>-5</sup>µg/µL); 1/8000 (3,510<sup>-5</sup>µg/µL); 1/16000 e 1/ 32000. Realizou-se o teste de ELISA para visualização dos resultados.

Na determinação da melhor interação antígeno-anticorpo, fez-se diferentes diluições dos anticorpos anti-MRJP1 e anti-MRJPt (1/250; 1/500; 1/1000; 1/2000); diferentes concentrações da GR (10 µg/µL e 20 µg/µL) e também diferentes diluições do anti-Rabbit POD (1/2000; 1/4000; 1/6000). Realizou-se o teste de ELISA para visualização dos resultados.

### **Imunoprecipitação**

As amostras de sobrenadantes de cérebro da abelha *A. mellifera*, previamente descrito, foi pré-clareado com 0.1 do volume com a proteína A-sepharose por 1 hora a 4°C. Manteve-se a proporção de 1/10 volume entre as

beads e a amostra. As amostras de sobrenadantes pré-clareados foram incubadas com 10 µg/µL do anticorpo anti-MRJP1, ou IgG não imune como controle por 12 horas a 4°C. Em seguida, incubou-se novamente as amostras com a proteína A-sepharose por 1 hora a 4°C. Após centrifugação os pellets contendo o imunocomplexo ligado foram lavados 5 vezes de 1 minuto, com tampão TH acrescido de 150 mM de NaCl e 0,1% de Tween-20. Em seguida, incubou-se os pellets com tampão TD para eluição dos imunocomplexos. Após centrifugação as amostras eluídas foram armazenadas a -20°C até processamento em SDS-PAGE e *Western blotting*.

### **Deteção de polipeptídios por *Western blotting*.**

As proteínas separadas em SDS-PAGE foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose 0,45µm em corrente constante 100mA por 12 horas a 4°C, utilizando tampão TT (25 mM Tris-HCl, 190 mM glicina, 20% metanol). Em seguida, incubou-se os filtros de nitrocelulose em solução SB acrescida de TBS-T e azida sódica 0,03%. Os filtros foram em seguida incubados com os anti-MTJP1 ou anti-MRJPt por 12 horas a 4°C. Após lavar os filtros 3 vezes por 5 minutos com TBS-T, incubou-se com anticorpos secundário anti-coelho ou anti-camundongo conjugados com fosfatase alcalina por 3 horas a 4°C. Os polipeptídeos imunoreativos foram detectados utilizando o kit cromogênico NBT/BCIP.

### **Imunohistoquímica**

Os cérebros foram dissecados e fixados em 4% paraformaldeído conforme descrito por McLean & Nakane. Em seguida os cérebros foram desidratados em bateria crescente de álcool etílico (50%, 75%, 90% e 100%), xilol e parafinizados por 30 minutos cada. Cortes de 5µm foram montados em lâmina previamente tratadas com 0.2% gelatina-cromo, desparafinizados e hidratados (xilol, álcool etílico 100%, 70% e 50%) 5 minutos cada. Após a hidratação, as secções foram submetidas ao bloqueio de peroxidase endógena com 4.5% água oxigenada em tampão salina-fosfato por 15 minutos e à incubação com tampão 0.1M Tris-glicina, pH 7.4 por 30 minutos e tampão B (20 mM fosfato de sódio, pH 7.4; 0.4 M NaCl; 0.3% Triton X-100) acrescido de 5% leite desnatado por 4 horas. Em seguida, adicionou-se anticorpo primário anti-MRJP1 e anti-MRJPt diluído 1:50 por 18 horas à temperatura ambiente; lavou-se as lâminas com o tampão B por 1

hora à temperatura ambiente e adicionou-se o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-coelho) diluído 1:200 por 45 minutos. Para a revelação, utilizou-se 10 mg/mL DAB (3, 3'- diaminobenzidina) e a reação foi interrompida com água. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina Harris e desidratados (álcool etílico 50%, 70%, 100% e xilol). As lâminas foram montadas com entelan e lamínula. Para a recuperação antigênica as lâminas foram incubadas em coplin plástico com tampão 10mM citrato de sódio, pH 6.0 por 30 minutos na panela à vapor (Tefal Steam Cuisine potência 100%), previamente aquecida.

### **Análise bioinformática das MRJPs**

Pesquisas no BLAST, de banco de dados de EST de abelha, foram feitas com seqüências de cDNA que codificam as proteínas MRJPs (GenBank número de acesso: MRJP1 (AAC61895), MRJP2 (AAC61894), MRJP3 (CAA81227), MRJP4 (CAA81228), MRJP5 (AAD01205) MRJP6 (AAQ82184), MRJP7 (DAA01512), MRJP8 (AAR83734), MRJP9 (AAY21180) (Albert S. 2004)

As seqüências peptídicas das MRJPs, disponíveis em bancos de dados, foram comparadas entre si, usando o software Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). O alinhamento das seqüências protéicas foi realizado utilizando o software Clustal W (1.8.1) (<http://www.expasy.ch/tools/clustalw>).

## **Resultados**

### **Titulação dos anti-MRJP1 e anti-MRJPt**

Os anticorpos produzidos contra a MRJPtotal e MRJP1 foram denominados anti-MRJPt e anti-MRJP1 respectivamente. A reatividade destes anticorpos foi examinada sondando proteínas hidrossolúveis da GR imobilizadas em membrana de nitrocelulose. Nos *Western blottings* destas proteínas, os anticorpos obtiveram reações cruzadas com polipeptídeos da GR correspondente à massa molecular relativa às proteínas MRJP1-MRJP5 em SDS-PAGE 5-22%. A análise da titulação do anti-MRJP1 contra as WSPs mostrou que estes anticorpos nas diluições de 0.4µg a 0.05ng de anti-MRJP1 foram capazes de reconhecer os polipeptídeos da GR imobilizados na membrana de nitrocelulose com uma concentração de 10 µg/linha. A diluição de 0.1µg do anti-MRJP1 diminuiu o background permitindo uma melhor visualização das bandas polipeptídicas (Fig-01a). Através da titulação das WSPs determinou-se que a melhor diluição da fração solúvel da GR é de 0.2µg/mL, reconhecendo uma única banda polipeptídica de aproximadamente 57kDa (Fig-01b). A comparação de diferentes diluições dos anticorpos anti-MRJP1 e anti-MRJPt, determinou que ambos reconhecem as proteínas da geléia real até uma concentração mínima de  $7,5 \times 10^{-2}$  ng/mL de anticorpo (1/4000) (Fig-01c). Para analisar qual a melhor diluição dos anticorpos produzidos contra as WSPs frente a diferentes diluições do antígeno e do anticorpo secundário, fez-se diferentes diluições do anti-MRJP1 e anti-MRJPt em diferentes concentrações das WSPs e diferentes concentrações do anticorpo secundário, mostrando que a melhor diluição do complexo anti-MRJP1 e anti-MRJPt, antígeno e anti-Rabbit foi de 1/2000 dos anticorpos anti-MRJP1 e anti-MRJPt, 10 µg/µL do antígeno e 1/4.000 do anti-Rabbit (fig-01d).

Para investigar a reatividade dos anticorpos produzidos contra as proteínas hidrossolúveis da GR, em diferentes tecidos da abelha *A. mellifera*, sondou com os anticorpos imunopurificados contra a MRJPtotal (anti-MRJPt), MRJP1 (anti-MRJP1) e MRJP2 (anti-MRJP2), o sobrenadante de homogeneizado (S1) de cabeça e de cérebro da abelha operária campeira. Os três anticorpos reconheceram no S1 de cabeça os polipeptídeos de 57, 70 e 128kDa e no S1 de cérebro dois polipeptídeos de 57 e 70kDa dessa abelha (dados não mostrados). Os estudos foram conduzidos utilizando o anti-MRJPt apenas na análise

imunohistoquímica (Fig-04) e o anti-MRJP1, além da imunohistoquímica, nas outras análises de Western blotting (Fig-02 e 03). Os polipeptídeos identificados nos *immunoblottings* serão denominados p57, p70 e p128, no decorrer deste texto.

### **Análise da expressão dos polipeptídeos correlacionados às MRJPs nos tecidos de abelha**

A análise em SDS-PAGE do S1 de cabeça dos diferentes himenópteros revelou diferença na expressão protéica nos tecidos de cabeça e cérebro, características de cada espécie (Fig-02a). Essa diferente expressão protéica foi corroborada pela imunodeteção dos p57, p70 e p128 apenas no S1 de cabeça da abelha *A. mellifera* não havendo marcação nos outros himenópteros (Fig-02a` ). Para examinar a distribuição desses polipeptídeos nas diferentes castas desta abelha, nós sondamos com o anti-MRJP1 as frações S1 de cabeça de operárias e zangões. O anti-MRJP1 detectou os p57 e p128 em zangão e dos p57, p70 e p128 nas operárias campeiras e nutridoras (Fig-02b` ).

A distribuição dos polipeptídeos no cérebro das diferentes castas da abelha *A. mellifera* foi analisada sondando os sobrenadantes de cérebro de rainha, zangão e operárias com o anti-MRJP1. A análise da imunodeteção mostrou marcação diferencial dos polipeptídeos nas castas, sendo o p70 no cérebro da rainha, do p57 no cérebro de zangão e p57, 70 nos cérebros de nutridora e campeira (Fig-02c` ). O anti-MRJP1 reconheceu no S1 do cérebro e da glândula hipofaríngea de abelhas operárias, os polipeptídeos p57, p70 e p128 (Fig-02d` ).

As regiões do cérebro (lobo óptico, lobo antenal, pedúnculo (lobos  $\alpha$  e  $\beta$ ) e corpos de cogumelo) foram dissecadas, homogeneizadas e sondadas com o anti-MRJP1 para investigar a distribuição dos polipeptídeos imunoreativos a esse anticorpo nessas regiões. A análise dessa distribuição mostrou que os p57 e p70 encontram-se presente em todas as regiões investigadas, havendo uma imunomarcação diferencial apenas nos corpos de cogumelo no qual o p128 foi imunodetectado (Fig-02e` ).

### **Imunoprecipitação do p57 do S1 de cérebro da abelha operária *A. mellifera***

A análise da imunoprecipitação do S1 de cérebro de operária com o anti-MRJP1 revelou um polipeptídio de 57kDa em SDS-PAGE, o que não foi observado quando utilizou-se o anti-IgG controle (IgG de coelho não imune) (Fig-03a). O *Western blotting* das frações sobrenadante e pellet desse ensaio de imunoprecipitação, foi sondado utilizando o anticorpo anti-MRJP1 purificado por imunoafinidade a partir de soro de camundongo imunizado com GR. Identificou-se apenas o polipeptídio de 57kDa na fração imunoprecipitada com o anti-MRJP1 enquanto nenhum polipeptídeo foi revelado na fração sedimentada com o anti-IgG controle. Além disso observa-se no sobrenadante do ensaio de imunoprecipitação a detecção do p70 pelo anti-MRJP1 de camundongo indicando que essa MRJP não foi imunoprecipitada (Fig-03b).

### **Imunolocalização das MRJPs na glândula hipofaríngea e nas principais regiões do cérebro da abelha *A. mellifera***

Os dados imunohistoquímicos obtidos neste ensaio mostraram que os polipeptídeos correspondentes as MRJPs, se localizam com grande intensidade em toda a glândula hipofaríngea, e se distribui de maneira específica nos lobos antenal, lobos ópticos e nos corpos de cogumelo. (Fig-04). A reatividade, representada pela coloração castanho, na glândula hipofaríngea para o anti-MRJPt é intensa em toda a célula secretora do alvéolo, como também nas células do canalículo (Fig-04A). Para o anti-MRJP1, a marcação é fraca ao redor do núcleo da célula secretora do alvéolo e no canalículo extracelular, ao contrário do ducto da glândula que apresenta intensa reatividade (Fig-04B). Por outro lado, a localização das MRJPs representada pela coloração castanho nas diferentes regiões do cérebro referente ao anti-MRJP1 e anti-MRJPt revelam uma marcação notável do anti-MRJPt entre os interneurônios, nos glomérulos e no nervo antenal (Fig-04D) e do anti-MRJP1 nos glomérulos e no nervo antenal (Fig-04E). No lobo óptico, o anti-MRJPt reconhece de forma difusa as células da retina, neurônios monopares na camada fenestrada e fibras na lâmina (fig-04G). No mesmo padrão, o anti-MRJP1 é reativo a essas neurópilas, no entanto mais fracamente (Fig-04H). O corte controle evidencia as células pigmentadas da retina. Para os corpos de cogumelo, o anti-MRJPt é fortemente imunoreativo nas células Kenyon, em neurônios específicos na base do cálice, além da região do lábio (Fig-04J).

Para o anti-MRJP1 é possível notar uma marcação que se destaca na região do lábio e basal do cálice, além das células Kenyon não-compactadas e compactadas externas (Fig-04K).

### **Análise da identidade das MRJPs**

Foram encontradas 81 seqüências protéicas relacionadas com as proteínas da GR, usando a palavra-chave “Royal Jelly” e o programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query/protein>). A análise do alinhamento das seqüências fornecidas pelo Blast mostrou que 68% das seqüências são MRJPs, 17% são proteínas yellow, 8% são proteínas da *D. melanogaster* com similaridade com as proteínas da GR e 7% das seqüências restantes são outras proteínas da GR que também possui similaridade com as proteínas da GR como a Royalisina. Dentre os 68% das MRJPs encontramos que 49% são MRJPs da abelha *Apis mellifera*, 24% são MRJPs da abelha *Apis cerana cerana*, 8% são proteínas do *Pseudomonas syringae*, 6% são proteínas da *Apis dorsata* e 13% são MRJPs de outros organismos (Fig-05a).

Investigando a identidade e a similaridade das MRJPs, observamos que o alinhamento destas proteínas apresentou uma quantidade total de 606 aminoácidos (aa), e uma identidade igual a 25,58% (155 aa). Entre as MRJPs, as seqüências de aminoácidos com propriedades similares entre suas cadeias laterais mostraram identidade de 18,32% (111 aa) e as seqüências em que estas propriedades não eram tão similares foi de 7,76% (47 aa), sendo que 48,35% (293 aa) não apresentaram identidade. Porém, ao analisarmos as combinações dos pares de alinhamentos protéicos entre as MRJPs, observamos que a MRJP1 e MRJP2 possuem a maior identidade (62,64%) e a menor diferença entre os aa (15,82%). Além disso, a MRJP1 possui mais de 44% de identidade com todas as proteínas da GR, tendo maior diferença dos aminoácidos em relação a MRJP5 (37,38%) (Fig-05b).



## Figuras

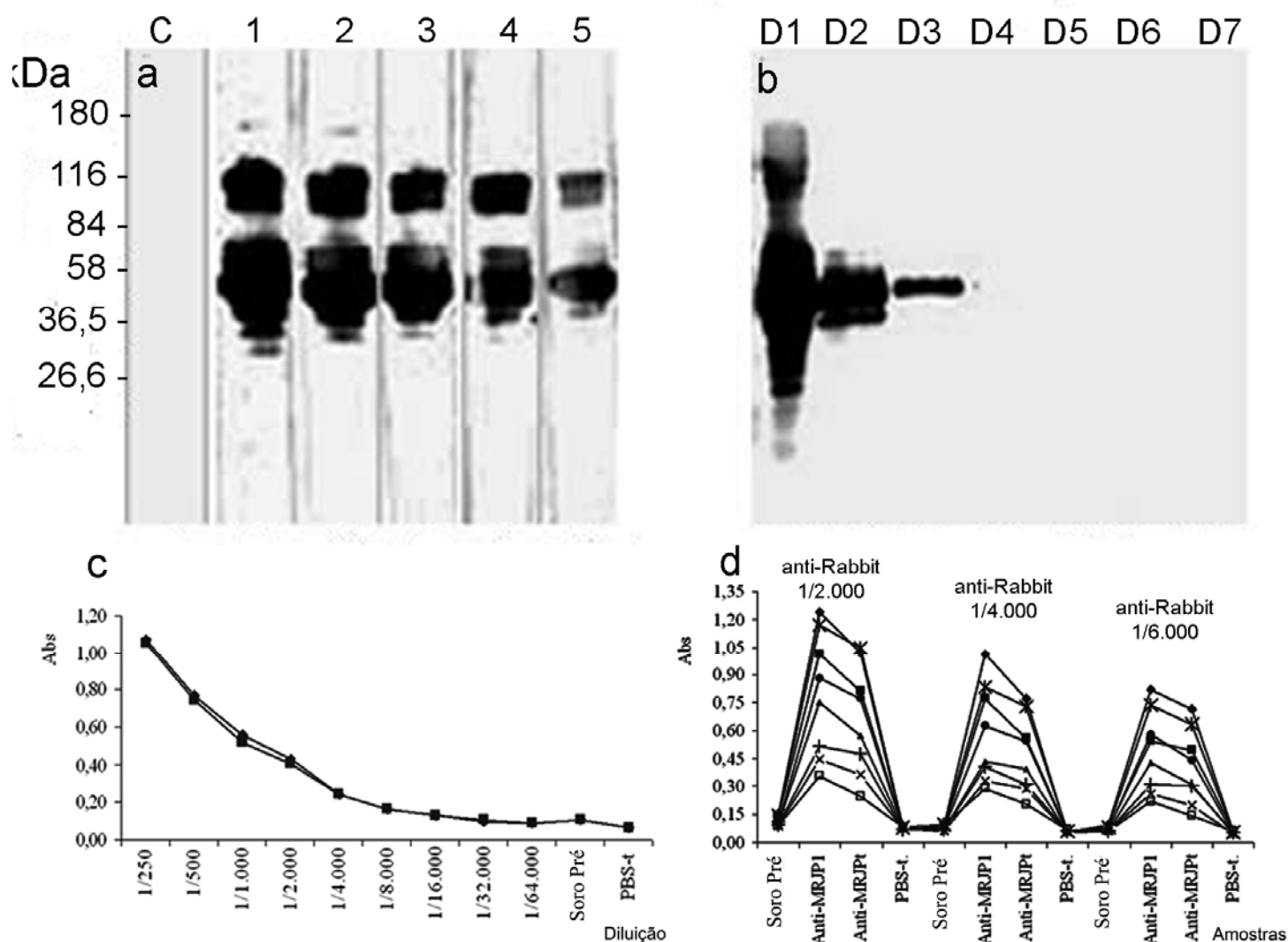


Figura 01: **Titulação dos anticorpos anti-MRJP1 e anti-MRJPt.** Os anticorpos produzidos contra as WSPs foram analisados por Western blotting (a, b) e ELISA (c, d) a- diluição do anticorpo: C- Controle positivo, 1- 0,4 $\mu$ g (1/2250), 2- 0,2 $\mu$ g (1/4500), 3- 0,15 $\mu$ g (1/6000), 4- 0,1 $\mu$ g (1/9000), 5- 0,05 $\mu$ g (1/18000). b- diluição da geléia real: D1- 2 $\mu$ g/ $\mu$ L, D2- 0,2 $\mu$ g/ $\mu$ L, D3- 0,02 $\mu$ g/ $\mu$ L, D4- 0,002 $\mu$ g/ $\mu$ L, D5- 0,2 $\eta$ g/mL, D6- 0,02 $\eta$ g/mL, D7- 0,002 $\eta$ g/mL. c- Comparação das diluições seriadas dos anticorpos anti-MRJP1 (0,3 $\mu$ g/ $\mu$ L) ( $\blacktriangle$ ) e anti-MRJPt (0,2 $\mu$ g/ $\mu$ L) ( $\blacksquare$ ), usando como antígeno a geléia real em uma concentração de 10 $\mu$ g/ $\mu$ L. d- Comparação entre diferentes diluições do anti-Rabbit POD, com diferentes concentrações da geléia real (10  $\mu$ g/ $\mu$ L e 20  $\mu$ g/ $\mu$ L), e com diferentes diluições dos anticorpos anti-MRJP1 e anti-MRJPt (1/250; 1/500; 1/1000; 1/2000) a saber: (( $\blacklozenge$ ) 10 $\mu$ g/ $\mu$ L, 1/250; ( $\blacksquare$ ) 10  $\mu$ g/ $\mu$ L, 1/500; ( $\blacktriangle$ ) 10  $\mu$ g/ $\mu$ L, 1/1000; (x) 10  $\mu$ g/ $\mu$ L, 1/2000; (\*) 20 $\mu$ g/ $\mu$ L, 1/250; ( $\bullet$ ) 20  $\mu$ g/ $\mu$ L, 1/500; ( $\mid$ ) 20  $\mu$ g/ $\mu$ L, 1/1000; ( $\square$ ) 20  $\mu$ g/ $\mu$ L, 1/2000 ) Os números a esquerda indicam o padrão de massa molecular.

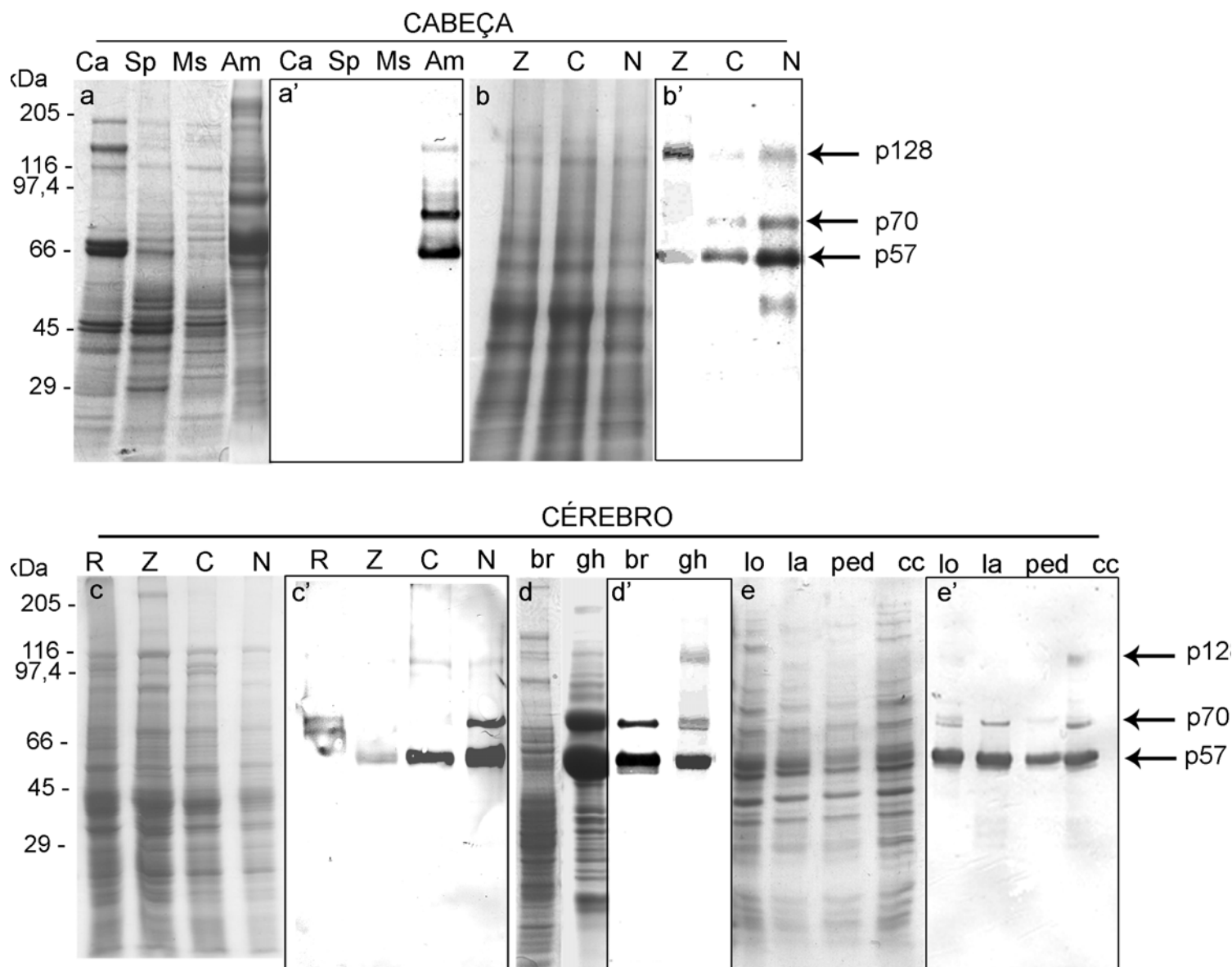


Figura 02: **Diferenças na expressão dos polipeptídeos correlacionados as MRJPs nos tecidos de abelha.** S1 de cabeça, cérebro e glândula hipofaríngea foram analisadas em SDS-PAGE (a; b; c; d; e) e por Western blotting (a'; b'; c'; d'; e'). a- Fração S1 de cabeça de: Ca- C. atriceps; Sp- S. postica; Ms- M. scutellaris; Am- *A. mellifera*; a'- Imunodeteção dos p57, p70 e p128 no S1 de cabeças da *A. mellifera* (Am). b- S1 de cabeças de diferentes castas da *A. mellifera*: Z- zangão; C- campeira e N- nutridora. b'- Imunodeteção nos S1 de cabeça dos p57 e p128 (Z) e dos p57, p70 e p128 (C,N). c- S1 do cérebro de diferentes castas da abelha *A. mellifera*: R- rainha; Z- zangão; C- campeira; N- nutridora. c'- Imunodeteção no S1 de cérebro dos p70 e p128 (R), p57 e p128 (Z), p57, p70 e p128 (C, N). d- S1 de cérebro e glândula hipofaríngea da *A. mellifera*: br- cérebro; gh- glândula hipofaríngea. d'- Imunodeteção no S1 de cérebro e da glândula hipofaríngea dos p57, p70 e p128 (br, gh). e- S1 de diferentes regiões do cérebro da *A. mellifera*: lo- lobo óptico; la- lobo antenal; ped- pedúnculo; cc- corpo de cogumelo. e'- Imunodeteção no S1 dos p57 e p70 (lo, la e ped) e dos p57, p70 e p128 (cc). Os números à esquerda indicam o padrão de massa molecular.

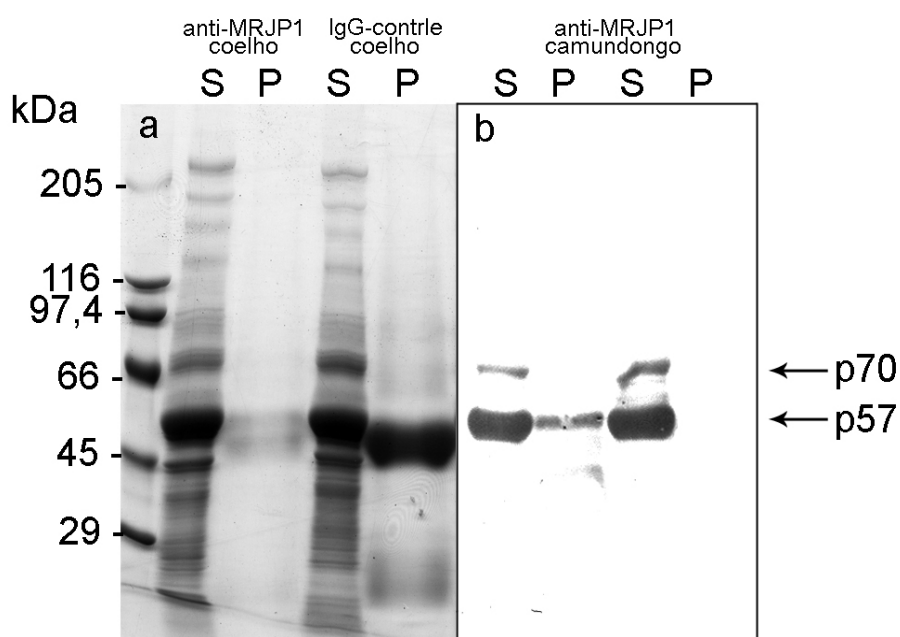


Figura 03: **Imunoprecipitação do p57 da fração solúvel de cérebro da abelha operária *A. mellifera*.** As proteínas imunoprecipitadas foram analisadas em SDS-PAGE (a) e Western blotting (b) utilizando como sonda o anti-MRJP1 de camundongo. Sobrenadante (S) e pellet (P) da fração imunoprecipitada. a-P imunoprecipitação, utilizando o anti-MRJP1 de coelho, de um polipeptídeo de 57kDa. b-S imunodeteccão dos p57 e p70 das frações sobrenadantes; b-P imunodeteccão do p57 somente na fração imunoprecipitada com o anti-MRJP1 coelho. Os números à esquerda indicam o padrão de peso molecular (Sigma SDS-6H)

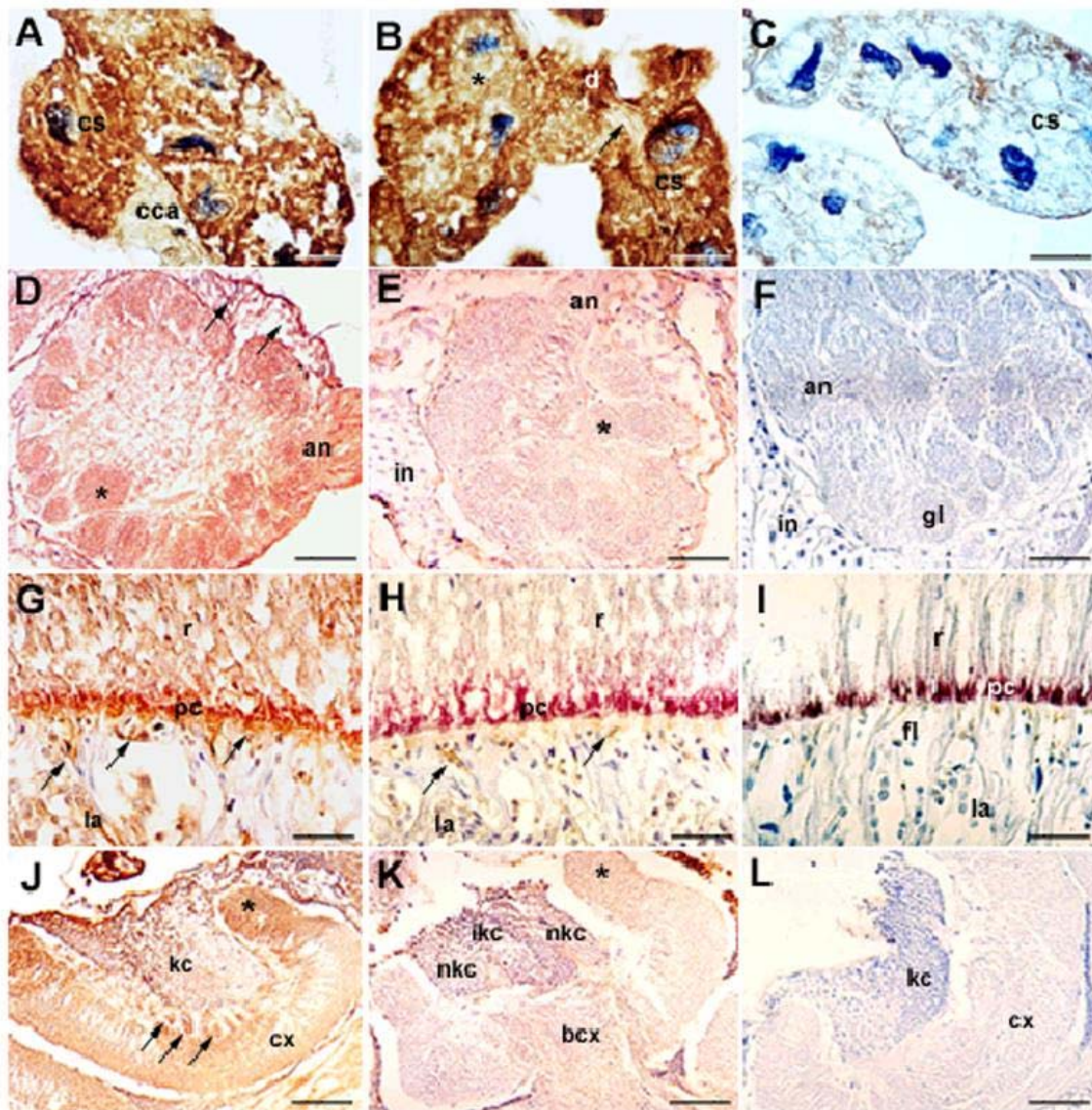


Figura 04. **Imunolocalização das MRJPs na glândula hipofaríngea e nas principais regiões do cérebro da abelha *A. mellifera*.** A-L – marcação em castanho. A-C – imunolocalização intensa e difusa do anti-MRJPt (A) na célula secretora do alvéolo (cs) como também nas células do canalículo (cca). Para o anti-MRJP1. (B) marcação fraca ao redor do núcleo (\*) da célula secretora do alvéolo (cs) e no canalículo extracelular (seta), ao contrário do ducto da glândula (d) que apresenta intensa marcação. (C) controle, bar = 12  $\mu$ m. D-F – reconhecimento do anti-MRJPt (D) entre os interneurônios (setas) do lobo antenal, nos glomérulos (\*) e no nervo antenal (na). Imunomarcacão fraca do anti-MRJP1 (E) nos glomérulos (\*) e no nervo antenal. (F) controle, bar = 40  $\mu$ m. G-I – reconhecimento do anti-MRJPt (G) na retina (r), camada fenestrada (setas) e fibras da lâmina (la). Marcação do anti-MRJP1 (H) preferencialmente na camada fenestrada (setas). (I) controle evidenciando a região pigmentada (pc), bar = 12.5  $\mu$ m. J-L – imunolocalização do anti-MRJPt (J) nas células Kenyon (kc) e em neurônios específicos (setas) na base do cálice (cx) do corpo de cogumelo, além do lábio (\*). Para o anti-MRJP1 (K), a marcação se destaca na região do lábio (\*) e basal (bcx) do cálice do corpo de cogumelo, como também nas células Kenyon não compactadas (nkc) e compactadas externas (okc). (L) controle, bar = 30  $\mu$ m.

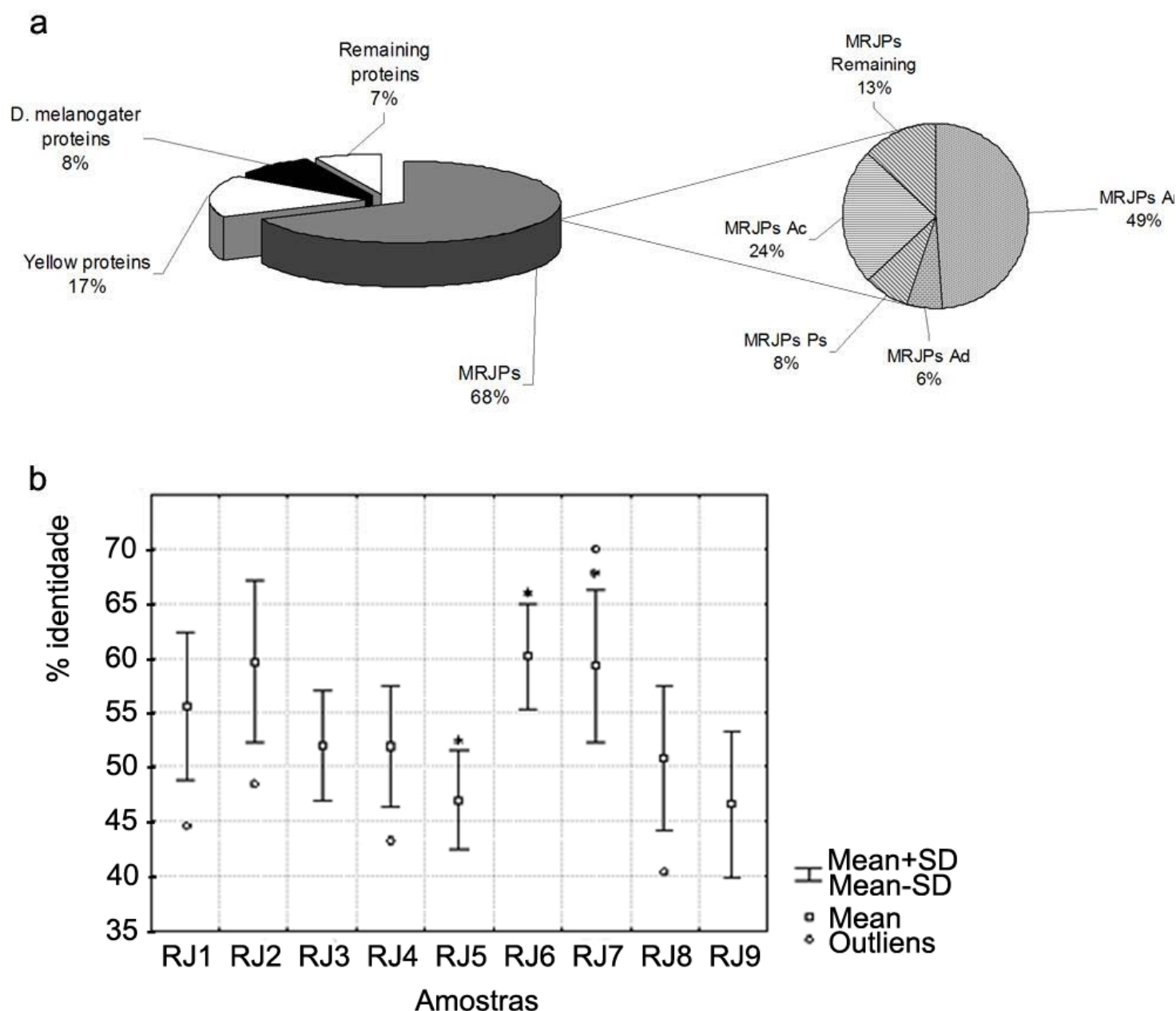


Figura 05: **Análise de bioinformática da distribuição e da identidade das MRJPs em bancos de dados públicos.** a- Determinação das principais classes protéicas relacionadas as MRJPs baseados nos dados resultante da busca da palavra chave “Royal Jelly” no NCBI. b- Análise das identidades entre as MRJPs agrupadas por combinação binária em nove classes (MRJP1-MRJP9), os asteriscos indicam as classes com maior diferença entre as identidades.



## **Discussão**

A presença de proteínas relacionadas às MRJPs nos tecidos de diferentes himenópteros foi investigada a partir de anticorpos produzidos por imunoafinidade. Estes anticorpos reconheceram com especificidade proteínas relacionadas às MRJPs somente nos tecidos da *A. mellifera*. A análise da reação cruzada desses anticorpos com as proteínas hidrossolúveis da GR apresentou alto título, sendo o anti-MRJPt e o anti-MRJP1 capazes de reconhecer todas as MRJPs imobilizadas em membrana de nitrocelulose. Isto pode ser explicado pela alta identidade apresentadas entre essas proteínas, as quais podem possuir em suas seqüências possíveis motivos antigênicos que se repetem. Isto corrobora com os resultados de Albert e Klaudiny (2004), que identificaram mais de 50% de identidade dentre as MRJPs.

Os anticorpos produzidos neste estudo foram usados como ferramentas para investigar se proteínas relacionadas às MRJPs estão presentes no sistema nervoso da abelha. Para isto, preparações de S1 de cabeça, cérebro e glândula hipofaringeais em diferentes himenópteros, diferentes castas e idade da abelha *A. mellifera* foram sondadas por imunoblot. Os resultados revelam polipeptídeos imunoreativos às MRJPs apenas na *A. mellifera*, apresentando ainda reação cruzada diferencial entre as castas, idade e tecidos analisados. Os polipeptídeos reconhecidos pelos anti-MRJP1 e anti-MRJPt no sistema nervoso da abelha *A. mellifera* estão correlacionados com as MRJPs, haja visto que esses polipeptídeos imunodetectados possuem massas moleculares semelhantes às dessas proteínas, além do que os anticorpos detectam apenas proteínas da GR. Outros estudos mostraram a presença de mRNA da MRJP1 e do cDNA da MRJP2 no cérebro dessa abelha (Kucharski *et al.*, 1998; Kucharski e Maleska, 2002). Além disso, verificou-se que o anti-MRJP1 foi capaz de imunoprecipitar do S1 de cérebro de abelha operária a proteína identificada como p57, sugerindo que essa proteína apresenta uma conformação reconhecida por esse anticorpo.

O p57 imunodetectado no S1 de cabeça, em todas as regiões do cérebro e na glândula hipofaringeal das abelhas nutridora, campeira e do zangão, co-migra em SDS-PAGE próximo à MRJP1 e à MRJP2. Essas proteínas possuem massas moleculares que variam de acordo com suas isoformas (Hanes e Simuth, 1992; Ohashi *et al.*, 1997; Schimitszova *et al.*, 1998; Simuth, 2001; Santos *et al.*,

2005). A MRJP1 possui 6 isoformas com massas moleculares que variam de 48,9 a 59,9kDa (Santos *et al.*, 2005) e a MRJP2 15 isoformas com massas de 50,6 a 59,9kDa (Sato *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2005). Contudo, nossos estudos mostraram que o único polipeptídeo imunoprecipitado com o anti-MRJP1 possui massa molecular de 57kDa, migrando em SDS-PAGE na mesma faixa da MRJP1, sugerindo que esse polipeptídeo esteja relacionado apenas com a MRJP1. Esse resultado corrobora com o apresentado por Kucharski *et al.*, 1998, que encontrou o mRNA da MRJP1 no cérebro da *A. mellifera*. Além do mais, a imunodeteção do p57 no S1 de cabeça, cérebro, glândula hipofaríngea, foi confirmada pela localização dessa proteína nos tecidos investidos do cérebro e da glândula hipofaríngea. A obtenção do corte histológico, utilizado no ensaio de imunolocalização, serve também como um controle na ausência da glândula hipofaríngea que poderia estar contaminando a fração S1 de cérebro nos ensaios de *immunoblotting*.

O p70 imunoreativo no sistema nervoso e na glândula hipofaríngea da abelha operária nutridora e campeira, co-migra na mesma faixa da MRJP3 em SDS-PAGE, concordando com os resultados apresentados por Okamoto *et al.*, (2003); Salazar-Olivo e Gonzáles (2005). Esse polipeptídeo expresso na glândula hipofaríngea de operárias, é diferencialmente expresso no S1 de cérebro de rainha, zangão, campeira e nutridora. Este resultado sugere que o p70 pode ser um marcador para distinguir abelha campeira e nutridora. Sabe-se que duas proteínas de 70kDa são expressas na glândula hipofaríngea, a MRJP3 a qual apresenta polimorfismo e várias isoformas (Albert e Klaudiny, 2004, Santos *et al.*, 2005) e a  $\alpha$ -glicosidase (Kubota *et al.*, 2004). Porém, a análise da identidade entre elas determinou menos de 12% de identidade, o que sugere que o p70 está relacionado com a MRJP3 e não com a  $\alpha$ -glicosidase, coincidindo com os resultados apresentados por Okamoto *et al.*, (2003). Portanto este estudo relata pela primeira vez a presença de uma proteína relacionada à MRJP3 específica para o cérebro da abelha rainha e nutridora.

O p128 foi imunodetectado no S1 de cabeça, cérebro e glândula. Em relação aos dois polipeptídeos anteriormente descritos o p128 com exceção do S1 de cabeça de zangão foi menos imunoreativo. Além disso, observa-se variações na sua presença entre diferentes preparações de S1 de cérebro. Este

estudo utiliza o anticorpo policlonal que reconhece epítomos comuns entre as MRJPs, como descrito anteriormente, sugerindo que o p128 também seja uma proteína relacionada com as MRJPs. Essas proteínas são secretadas unicamente pela glândula hipofaringeal de *A. mellifera* e conservadas evolutivamente, apresentando alta identidade entre si e, juntamente com as proteínas *Yellow* de *D. melanogaster* constituem uma nova família descrita por Albert *et al.*, 2003. Consideramos que o p128 seja provavelmente uma MRJP não descrita, visto que, no estudo de análise proteômica da glândula hipofaringeal de abelha africanizada *A. mellifera* (Santos *et al.*, 2005) está ausente um polipeptídeo de tal massa molecular. Neste estudo foram identificados 27 isoformas das MRJPs em homogeneizado de glândula hipofaringeal, as quais apresentam massa molecular relativa que variam de 48,8 à 87kDa. Como o p128 possui massa molecular distinta das relatadas acima e é imunoreativo com o anti-MRJPt e o anti-MRJP1 sugerimos que esse seja um novo polipeptídeo relacionado com essa família de proteínas presente nos tecidos da abelha.

Nos ensaios de imunolocalização encontrou-se intensa marcação das proteínas correlacionadas com as MRJPs em toda a glândula hipofaringeal quando sondada com o anti-MRJP1 e anti-MRJPt. Os cortes de cérebro, analisados com esses dois anticorpos, revelaram a distribuição no lobo antenal, lobo óptico e corpo de cogumelo das proteínas imunoreativas a esses anticorpos.

No S1 do lobo antenal imunodetectou-se o p57 e o p70 correspondendo respectivamente a MRJP1 e MRJP3. Na análise da imunohistoquímica desta neurópila, ambos os anticorpos utilizados localizaram as MRJPs nos interneurônios, nos glomérulos e no nervo antenal, sendo que o anti-MRJPt marcou mais intensamente os glomérulos. Sabe-se que o lobo antenal é neurópila primária que recebe impulso de 60.000 axônios quimiosensoriais e que as sinapses entre os neurônios olfatórios primários, os interneurônios locais e os neurônios de projeção estão localizados em 156 glomérulos esféricos. Por onde se conduzem as informações oriundas das sinapses dos receptores terminais olfatórios com as projeções dos neurônios que transmitem tais informações para os corpos de cogumelo e para os lobos alfa e beta (Nässel *et al.*, 1986; Kloppenburg, 1995; Menzel e Müller, 1996; Galizia e Menzel, 2000). Os estudos que relatam transcritos de MRJPs no cérebro consideram que sua função é ainda



desconhecida. Neste estudo, a localização de MRJPs no lobo antenal sugere que estas proteína estão presentes tanto no corpo celular dos neurônios, nos seus prolongamentos e nas sinapses dos glomérulos.

No S1 do lobo óptico imunodetectou-se os polipeptídeos correspondentes a MRJP1 e MRJP3. Na análise da imunohistoquímica dessa região imunolocalizou-se as MRJPs na retina, camada fenestrada e fibras da lâmina, sendo observado a maior intensidade na marcação com o anti-MRJPt. Essa localização sugere que as MRJPs possam estar envolvidas em funções relacionadas a informação visual e seu processamento.

Nos corpos de cogumelos localizou-se as MRJPs nas células Kenyon compactadas internas e externas, em neurônios da base do cálice, e no cálice medial e lateral, principalmente nos lábios. O *imunoblotting* dessa região revelou a presença dos polipeptídeos correspondente à MRJP1 e MRJP3 além do p128. Dados sobre a distribuição de mRNA para a MRJP1 no corpo de cogumelo por hibridização *in situ* indicam a presença desta MRJP localizada em neurônios específicos, as células Kenyon intrínsecas, com funções ainda desconhecidas. (Kucharski *et al.*, 1998). Sabe-se que os corpos de cogumelo são centros integração visual e mecanosensorial (primário) e olfatório (secundário) constituídos por neurônios paralelos densamente empacotados denominados de células Kenyon compactadas interna e externas. Esta neuropila constitui-se no centro de processamento de informação e memória no cérebro da abelha (Hammer e Menzel 1995; Capaldi *et al.*, 1999). As MRJPs contêm seqüências com sítios alvo de fosforilação que podem ser reconhecidos por proteínas quinase C e proteína quinase II Ca-calmodulina dependente (Klaudiny *et al.*, 1994). Estas proteínas quinases foram imunolocalizadas nos interneurônios do lobo antenal e altamente expressas nos corpos de cogumelo (Grumbaum e Muller, 2000; Kamikouchi *et al.*, 2000). Os nossos dados sugerem que MRJPs, localizadas nessas neurópilas, poderiam ser alvos potenciais de regulação por transdução de sinal através dessas proteínas quinases.

Este estudo mostrou polipeptídeos imunoreativos aos anticorpos para as MRJPs no cérebro e glândula hipofaríngeal da abelha *A. mellifera*. Esses polipeptídeos correspondentes a MRJP1 e MRJP3 e a uma nova MRJP (p128), não foram imunodetectados em outros himenópteros investigados, e para a *A.*

*mellifera* apresentaram distribuição específica no cérebro entre castas e entre as abelhas operária nutridora e campeira. A localização dessas MRJPs em regiões do cérebro contribui para elucidação do papel biológico desta interessante família de proteínas com ocorrência única nessas abelhas.

## **Referências Bibliográficas**

Albert, S., Klaudiny, J., 2004. The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: identification of new members in the EST library. *J Insect Physiol.* 50 (1), 51-50.

Albert, S., Bhattacharya, D., Klaudiny, J., Shmitzová, J., Imúth, J., 1999. The family of major royal jelly proteins and its evolution. *J Mol Evol.* 49, 290-297.

Bincoletto, C., Eberlin, S., Figueiredo, C.A., Luengo, M.B., Queiroz, M.L., 2005. Effects produced by Royal Jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *Int. Immunopharmacol.* 5(4), 679-88.

Capaldi, E.A., Robinson, G.E., Fahrbach, S.E., 1999. Neuroethology of spatial learning: the birds and the bees. *Annu Rev Psychol.* 50, 651-682.

Evans, J.D., Wheeler, D.E., 1998. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 5575-5580

Galizia, C.G., Menzel, R., 2000. Odour perception in honeybees: coding information in glomerular patterns. *Curr Opin Neurobiol.* 10, 504-510.

Grünbaum, L., Müller, U., 1998. Induction of a specific olfactory memory leads in a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *J Neurosci.* 18, 4384-4392.

Hammer, M., Menzel, R., 1995. Learning and memory in the honeybee. *J Neurosci.* 15, 1617-1630.

Hanes, J., Simuth, J., 1992. Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J. Apic. Res.* 31, 22-26.