

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**Genes de hexamerinas em *Apis mellifera*: busca de
funções alternativas durante o desenvolvimento**

Juliana Ramos Martins

Ribeirão Preto, SP

2012

JULIANA RAMOS MARTINS

Genes de hexamerinas em *Apis mellifera*: busca de funções alternativas durante o desenvolvimento

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: GENÉTICA

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Márcia Maria Gentile Bitondi

Ribeirão Preto, SP

2012

Autorizo a reprodução ou divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada à fonte.

Martins, Juliana Ramos

Genes de hexamerinas em *Apis mellifera*: busca de funções alternativas durante o desenvolvimento. Ribeirão Preto, 2012.

189p.: Il.

Tese de Doutorado, apresentada á Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ciências Biológicas I, com ênfase em Genética.

Orientador(a): Bitondi, Márcia Maria Gentile.

1. *Apis mellifera* 2. Metamorfose 3. Hormônio juvenil 4. Ovário 5. Testículo

Nome: MARTINS, Juliana Ramos

Título: Genes de hexamerinas em *Apis mellifera*: busca de funções alternativas durante o desenvolvimento

Tese apresentada à
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a):.....Instituição:.....

Julgamento:.....Assinatura:.....

Prof(a). Dr(a):.....Instituição:.....

Julgamento:.....Assinatura:.....

Prof(a). Dr(a):.....Instituição:.....

Julgamento:.....Assinatura:.....

Prof(a). Dr(a):.....Instituição:.....

Julgamento:.....Assinatura:.....

Prof(a). Dr(a):.....Instituição:.....

Julgamento:.....Assinatura:.....

Dedicatória

Smile, though your heart is aching
Smile, even though it's breaking
When there are clouds in the sky
You'll get by...
If you smile
With your fear and sorrow
Smile and maybe tomorrow
You'll find that life is still worthwhile if
you'll just..
Light up your face with gladness
Hide every trace of sadness
Although a tear may be ever so near
That's the time you must keep on trying
Smile, what's the use of crying?
You'll find that life is still worthwhile
If you'll just Smile (Charles Chaplin)

Em memória de **Janáina Ramos Martins** e
da Dra. **Maria José de Fátima Bispo
Pereira Okano**, dedico!

Agradecimentos

“A gratidão desbloqueia a abundância da vida. Ela torna o que temos em suficiente, a negação em aceitação, o caos em ordem, a confusão em claridade. Ela pode transformar uma refeição em um banquete, uma casa em um lar, um estranho em um amigo. A gratidão dá sentido ao nosso passado, o traz para o hoje, e cria uma visão para o amanhã” (Melody Beattie).

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Márcia Maria Gentile Bitondi, pela dedicação, apoio, confiança e estímulo. Por todos estes anos de aprendizado.

À Prof^a. Dr^a. Zilá Luz Paulino Simões, pela receptividade no laboratório.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas (LBDA), pelo suporte laboratorial e no Apiário. À Nayara e ao seu Pedro, pela aquisição das rainhas ovipositoras. Ao Omar e ao David pelos zangões. Ao Doutor Rodrigo Pires Dallacqua, aos pós-graduandos André Fernando Ditondo Micas e Guaracini Aparecida Loterio, pela colaboração e amizade. A todas as pessoas que trabalham ou que trabalharam no LBDA (Departamento de Genética – FMRP-USP) durante a produção desta tese e que somaram para o meu crescimento como pesquisadora.

Ao Doutor Alexandre dos Santos Cristino (The Queensland Brain Institute, The University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia) pela colaboração com as análises de Bioinformática.

Ao técnico Paulinho, do Laboratório de Genética e Evolução (Departamento de Genética – FMRP-USP), por autoclavar o meu material.

À Prof^a. Dr^a. Aline Mackert dos Santos, do Departamento de Ciências do Ambiente da UFMS, pela colaboração nos experimentos de alimentação diferencial entre castas, pelo apoio e carinho.

Ao Doutor Lucas Anhezini Araújo, à Técnica Mara Silvia Alexandre e ao Prof. Ricardo Guelerman Pinheiro Ramos do Laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento (Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos – FMRP-USP), pela dedicação e colaboração com os experimentos de imunolocalização e microscopia confocal. À Elizabete Rosa Milani, técnica da microscopia confocal.

Ao Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa, ao Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart, ao técnico Nuno Manuel Domingues, aos pós-graduandos Diana Paola Gómez Mendoza, Humberto Gonczarwska Jorge, Jaques Miranda Ferreira de Souza e Rayner Myr Lauterjung

Queiroz, do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (Departamento de Biologia Celular – Unb); pela colaboração nos ensaios de cromatografia e espectrometria de massa.

Ao doutorando Germano Aguiar Ferreira e à doutora Carolina Thiomé, do Laboratório de Química de Proteínas (Hemocentro de Ribeirão Preto), pela colaboração e auxílio com os experimentos de proteínas de membrana. Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini e sua pós-graduanda Ana Maria Sper Simão (Departamento de Química – FFCLRP – USP) pela colaboração, inúmeros conselhos e consultorias.

À técnica Maria Dolores Seabra Ferreira (Tuca) e ao técnico José Augusto Maulin, do Laboratório de Microscopia Eletrônica (Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos – FMRPUSP); ao Prof. Dr. Marcos Antônio Rossi e sua técnica Lígia Grecco V. B. Santoro (Patologia – FMRP – USP), pela colaboração na microscopia eletrônica.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto e sua técnica Simone Vidigal Alves (Instituto de Biociências da USP – Departamento de Genética e Biologia Evolutiva – Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Oxidantes e Radicais Livres), pelo auxílio na expressão *in vitro* das hexamerinas.

Ao Departamento de Genética, ao qual pertenço como aluna de pós-graduação, em especial ao Prof. Dr. Espencer Egea Soares pela colaboração durante a minha estada em Brasília.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto e de Poços de Caldas pelo apoio e compreensão. À minha família (Marlene Ramos Martins, Rubens Antônio Martins, Rubens Antônio Martins Filho, Luma Martins Tramonte, Liz Martins Tramonte e Lavínia Martins) o meu eterno agradecimento.

Resumo

Martins JR. Genes de hexamerinas em *Apis mellifera*: busca de funções alternativas durante o desenvolvimento. 2012. 189p. Tese de Doutorado – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Introdução: Hexamerinas são proteínas de estocagem sintetizadas pelo corpo gorduroso de larvas de insetos e secretadas na hemolinfa, onde se acumulam. A função canônica das hexamerinas consiste em servir de reserva de aminoácidos e energia para a reconstrução de tecidos e órgãos durante a metamorfose. Este trabalho teve como objetivo a busca por evidências de funções alternativas das hexamerinas durante o ciclo de vida de abelhas *A. mellifera*.

Resultados: Os perfis temporais de expressão das quatro hexamerinas (HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c e HEX 110), verificados por meio de SDS-PAGE e *western blot*, corroboram sua função canônica na metamorfose. Consistente com esta função, as quatro hexamerinas foram localizadas no citoplasma das células do corpo gorduroso utilizando-se anticorpos específicos e microscopia confocal. No entanto, funções adicionais puderam ser inferidas com base nos seguintes resultados: **(1)** *Foci* das quatro hexamerinas foram localizados nos núcleos de algumas células do corpo gorduroso em metamorfose, levando à hipótese de que têm função anti-apoptótica durante este período crítico do desenvolvimento; **(2)** Além disso, HEX 70a e HEX 110 foram localizadas no citoplasma e núcleo de células ovarianas e testiculares, indicando função no desenvolvimento e maturação das gônadas; **(3)** A co-localização de um análogo de timidina (EdU) e HEX 70a nos núcleos das células dos ovariolos, sugeriu fortemente uma função na proliferação celular. O *knockdown* de HEX 70a *in vivo* por meio de injeção de anticorpo específico prejudicou o crescimento dos ovariolos de rainhas, reforçando a hipótese de função na proliferação celular, **(4)** interferiu na esclerotização da cutícula de operárias, indicando função na formação do exoesqueleto e **(5)** provocou a antecipação da ecdise adulta, provavelmente em resposta à ausência (ou diminuição) dos aminoácidos derivados das hexamerinas. Foram investigados também aspectos da regulação dos genes de hexamerinas. A manipulação experimental da dieta alimentar e dos títulos do hormônio juvenil (HJ) interferiram claramente na expressão dos genes de hexamerinas. A potencial ação reguladora do HJ foi reforçada pelos resultados de análises por bioinformática da região 5' UTR de cada gene de hexamerina (Martins *et al.*, 2010) que revelaram potencial motivo de ligação à proteína *Ultraspiracle* (Usp), um membro do complexo receptor do HJ no DNA.

Procedimentos para expressar as hexamerinas *in vitro* em sistema de bactérias e purificá-las estão em progresso visando a caracterização da estrutura e de interações entre as subunidades.

Conclusão: Estes resultados ressaltam que as hexamerinas têm outras funções no ciclo de vida de *A. mellifera*, além da função já bem estabelecida de reserva de aminoácidos para a metamorfose.

Palavras-chave: Hexamerinas; *Apis mellifera*; Metamorfose; Hormônio juvenil; corpo gorduroso; testículo; ovário

Abstract

Martins JR. Hexamerin genes in *Apis mellifera*: alternative functions during development. 2012. 189p. PhD thesis – Genetics Department, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Background: Insect hexamerins are storage proteins synthesized by the larval fat body and secreted into the hemolymph, where they accumulate. The canonical function of hexamerins is to provide amino acids and energy for the reconstruction of tissues and organs during pupal-to-adult development. The aim of the current study was to search for evidence of alternative roles for the hexamerins in the life cycle of the honey bee, *A. mellifera*.

Results: The canonical role of insect hexamerins received support from our data on the temporal expression profiles of the four honey bee hexamerin subunits (HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c and HEX 110), as verified by SDS-PAGE and western blot using hemolymph and fat body samples. Consistent with the canonical function, the four hexamerins were localized in the cytoplasm of fat body cells, during metamorphosis, by using specific antibodies and confocal laser-scanning microscopy. However, additional functions could be inferred by the following findings: (1) The four hexamerins were also localized in the nuclei of some fat body cells, thus tentatively suggesting an anti-apoptotic role during metamorphosis; (2) Furthermore, HEX 70a and HEX 110 were localized in the cytoplasm and nucleus of ovarian and testicular cells, pointing to a role in gonad development and maturation. Co-labeling of the thymidine analog EdU and HEX 70a in the ovariole cell nuclei, strongly suggested a role in cell proliferation; HEX 70a depletion via injection of the specific antibody in queen pupae impaired ovariole growth, thus strengthening our hypothesis on a role in cell proliferation, (3) HEX 70a depletion also impaired cuticle sclerotization, indicating a function in exoskeleton formation, and (4) led to a precocious adult ecdysis, perhaps in response to the lack (or decrease) in hexamerin-derived amino acids. We also investigated aspects of the regulation of hexamerin genes. The experimental manipulation of diet consumption and juvenile hormone (JH) titer clearly interfered in the expression of hexamerin genes. Regulation by JH was also supported by a previous bioinformatics analysis of the 5' UTR region of each hexamerin gene (Martins *et al.*, 2010), which revealed a potential binding site for Ultraspiracle (Usp), a member of the JH receptor complex in the DNA. Experiments are in progress for *in vitro* expression and purification of the four hexamerins aiming to further characterize their structures and interactions.

Conclusion: Taken together, these results imply in novel roles for hexamerins in the life cycle of *A. mellifera* in addition to their well-established role as amino acids sources for metamorphosis.

Keywords: Hexamerins; *Apis mellifera*; Metamorphosis; Juvenile hormone; fat body; testicle; ovaries

Lista de Figuras

Figura 1.....	1
Figura 2.....	2
Figura 3.....	3
Figura 4.....	36
Figura 5.....	37
Figura 6.....	38
Figura 7.....	41
Figura 8.....	45
Figura 9.....	48
Figura 10.....	51
Figura 11.....	54
Figura 12.....	57
Figura 13.....	60
Figura 14.....	63
Figura 15.....	66
Figura 16.....	67
Figura 17.....	68
Figura 18.....	69
Figura 19.....	70
Figura 20.....	72
Figura 21.....	75
Figura 22.....	77
Figura 23.....	80
Figura 24.....	82
Figura 25.....	83
Figura 26.....	86
Figura 27.....	87
Figura 28.....	101
Figura 29.....	129
Figura 30.....	131
Figura 31.....	133
Figura 32.....	136

Lista de Tabelas

Tabela I	13
Tabela II.....	14
Tabela III	16
Tabela IV	19
Tabela V.....	20
Tabela VI	29
Tabela VII.....	31
Tabela VIII.....	85

Lista de abreviaturas e símbolos

kDa = kiloDalton

μL = microlitro

μg = micrograma

m = metro

Kg = kilograma

mL = mililitro

RPM = rotações por minuto

mM = milimolar

M = molar

pb = pares de bases

U = unidades

V = volt

Min = minuto

x g = rotação por força centrífuga

RT-PCR = *reverse transcription polymerase chain reaction*

RT-qPCR = *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*

DAPI = *4,6-diamidino-2-phenylindole*

DEPC = *diethylpyrocarbonate*

PBS = *phosphate buffered saline*

BSA = *bovine serum albumin*

SDS-PAGE = *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

mA = miliamper

FPLC = *fast protein liquid chromatography*

TFA = *trifluoroacetic acid*

v/v = volume/volume

s = segundo

DO = densidade ótica

UTR = *untranslated region*

HEX = subunidade proteica de hexamerina

hex = gene de hexamerina

Sumário

Introdução	1
1. Aspectos da biologia de <i>Apis mellifera</i>	1
2. Hexamerinas	4
3. Histórico do estudo de hexamerinas em <i>Apis mellifera</i>	6
Material e Métodos	12
1. Material Biológico	12
1.1. Operárias e rainhas em diferentes estágios e fases da ontogênese	12
1.2. Obtenção de zangões	14
2. Tratamento hormonal.....	14
3. Manipulação da dieta alimentar	15
3.1. Alternância da dieta de larvas de operárias e rainhas	15
3.2. Dieta larval enriquecida ou pobre em pólen.....	15
4. Inativação das hexamerinas	15
5. Extração de hemolinfa	16
6. Separação de membranas e núcleos de células do corpo gorduroso.....	16
6.1. Membranas	16
6.2. Núcleos	17
7. Análises de expressão gênica.....	17
7.1. Extração do RNA total e síntese do cDNA	17
7.2. PCR e análise por eletroforese	18
7.3. qRT-PCR.....	19
8. Imunolocalização das hexamerinas e busca de função	21
8.1. Microscopia de luz	21
8.2. Microscopia confocal	21
8.2.1. Marcação de F-actina com rodamina-faloidina.....	21
8.2.2. Imunolocalização da hexamerina HEX 70a nas gônadas.....	21
8.2.3. Co-localização de HEX 70a e EdU	22
8.2.4. Marcação dos núcleos com DAPI e medição da largura dos ovariolos	22
8.2.5. Imunolocalização da hexamerina HEX 110 nos ovários de operárias adultas (7 dias de idade) e rainhas ovipositoras.....	23
8.2.6. Imunolocalização das hexamerinas HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c e HEX 110 no corpo gorduroso de operárias	23

8.3. Microscopia eletrônica de transmissão para verificação da cutícula de operárias injetadas com anti-HEX 70a.....	23
8.4. SDS-PAGE.....	24
8.4.1. Proteínas da hemolinfa, do corpo gorduroso, dos extratos de núcleo e de membranas	24
8.4.2. Proteínas obtidas das cromatografias	25
8.5. PAGE (não desnaturante).....	26
8.6. <i>Western blot</i>	26
8.7. Cromatografia Líquida	27
8.7.1. Filtração em gel.....	27
8.7.2. Troca-iônica.....	27
8.8. Espectrometria de massa	27
8.9. Teste de ligação de hexamerinas a extratos enriquecidos de membranas de corpo gorduroso.....	28
8.10. Expressão <i>in vitro</i> das hexamerinas em células de <i>E. coli</i>	29
8.10.1. Produção do DNA linear	30
8.10.2. Digestão.....	30
8.10.3. Transformação.....	30
8.10.4. Preparo das células competentes <i>E. coli</i> de linhagens DH5 α e BL21	32
8.10.5. Sequenciamento.....	32
8.10.6. Preparo das linhagens de expressão	33
8.10.7. Produção das proteínas.....	33
8.10.8. Purificação das proteínas.....	33
Resultados	35
I – Aspectos da multifuncionalidade das hexamerinas.....	35
1. Dinâmica do acúmulo das subunidades de hexamerinas no corpo gorduroso e hemolinfa durante o desenvolvimento.....	35
2. Detecção das hexamerinas no núcleo das células do corpo gorduroso.....	36
3. Imunolocalização das hexamerinas no citoplasma e no núcleo das células do corpo gorduroso.....	37
4. Hexamerinas nas gônadas.....	43
4.1. Imunolocalização da HEX 70a no núcleo das células ovarianas de operárias adultas-faratas	43
4.2. Imunolocalização de HEX 70a nos ovaríolos de rainhas ovipositoras.....	47

4.3. Imunolocalização da hexamerina HEX 110 em ovários de operárias adultas e rainhas ovipositoras.....	50
4.4. Imunolocalização de HEX 70a nos testículos	56
5. Colocalização de EdU e HEX 70a no núcleo das células ovarianas de operárias adultas faratas	62
6. Efeito da injeção do anticorpo anti-HEX 70a na largura dos ovariolos e esclerotização cuticular	65
7. Injeção de anticorpos anti-hexamerinas em operárias adultas faratas: efeito sobre a sobrevivência e duração do período adulto farato	67
II. Regulação da expressão dos genes de hexamerinas.....	69
1. Efeito do HJ sobre a expressão dos genes de hexamerinas em larvas de 5° instar.....	69
2. Regulação da expressão dos genes de hexamerina pela dieta alimentar	70
2.1. Efeito da dieta oferecida à colmeia sobre o desenvolvimento larval e expressão dos genes de hexamerinas	70
2.2. Alternância da dieta de larvas de operárias e rainhas e efeitos sobre a expressão dos genes de hexamerinas	74
III. Características das subunidades HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c e HEX 110.....	76
1. Estudo da estrutura das subunidades de hexamerinas	76
2. Cromatografia para separação das hexamerinas.....	79
3. Produção das hexamerinas <i>in vitro</i>	83
4. Busca pelos receptores de hexamerinas.....	84
4.1. Análises <i>in silico</i> de sítios de fosforilação putativos nas hexamerinas preditas.....	84
4.2. Busca por hexamerinas em amostras de concentrados de membranas do corpo gorduroso.....	85
4.3. Teste de ligação de hexamerinas em extratos enriquecidos de membranas do corpo gorduroso.....	86
Discussão	89
1. Hexamerinas no corpo gorduroso	89
2. Hexamerinas nas gônadas.....	93
2.1. Ovários	93
2.1.1. HEX 70a	93
2.1.2. HEX 110.....	97
2.2. Testículos.....	98
3. Hexamerinas e o HJ	99
4. Hexamerinas e formação da cutícula.....	101

5. Hexamerinas e a dieta alimentar	102
6. Caracterização da hexamerinas.....	103
Conclusão	107
Referências Bibliográficas	109
Apêndice	128

Introdução

1. Aspectos da biologia de *Apis mellifera*

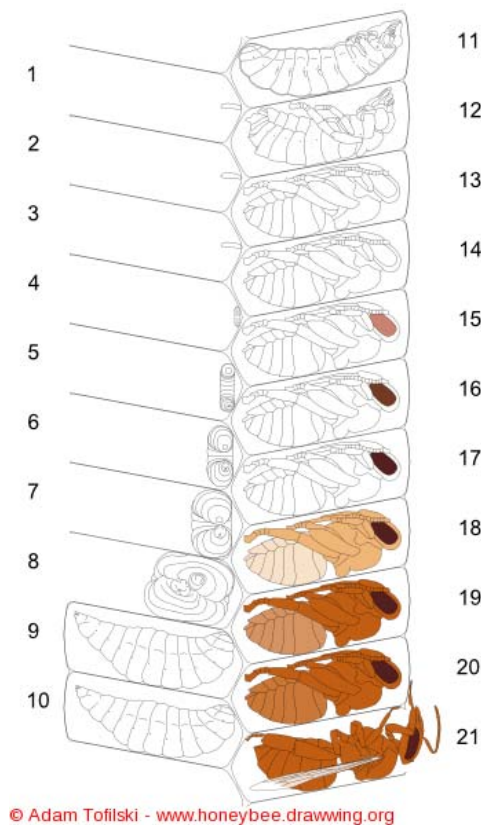


Figura 1: Ciclo de vida das abelhas operárias *A. mellifera*. 1-3: estágio embrionário. 4-8: do 1º ao 5º instar larval, fase de alimentação. 9: 5º instar larval, fase de tecelagem do casulo. 10-12: pupas faratas. 13 e 14: pupas. 15-20: adultos faratos. 21: recém emergida (ecdise). Modificado de Winston (1991).

As abelhas são insetos holometábolos e, portanto, apresentam metamorfose completa com quatro estágios distintos de desenvolvimento: embrionário, larval, pupal e adulto (**Fig. 1**).

Os ovos são depositados pela rainha nos alvéolos dos favos de cera e, após três dias, as larvas eclodem iniciando um período marcado por um intenso crescimento corporal, que envolve uma série de mudas ou substituições periódicas do exoesqueleto (Snodgrass, 1956; Winston, 1991).

Cada ciclo de muda tem início quando os títulos de hormônios ecdisteróides aumentam na hemolinfa (Gilbert *et al.*, 2002), fazendo com que o exoesqueleto existente se separe da epiderme em um evento definido como apólise. Na sequência, ocorre a síntese e secreção do novo exoesqueleto. Quando os títulos de ecdisteróides diminuem, o novo exoesqueleto é estabilizado por um processo denominado esclerotização, resultando em uma estrutura que varia regionalmente em sua espessura, elasticidade, cor e rigidez (Kayser, 1985; Hiruma e Riddiford, 1988; Hopkins e Kramer, 1992; Andersen, 2005). O velho exoesqueleto é em seguida

descartado, caracterizando assim a ecdise para o estágio adulto.

Diferente das mudas larvais que resultam em aumento do tamanho corporal, a muda metamórfica é marcada pela morte celular programada dos tecidos e órgãos larvais e pelo desenvolvimento das estruturas do adulto.

O tempo de duração da ontogênese difere entre os morfotipos que compõem a colmeia (Fig. 2). Rainhas, operárias e zangões completam o desenvolvimento em 16, 21 e 24 dias, respectivamente (Winston, 1991).

As fêmeas originam-se de ovos fecundados, diplóides, com potencial para originar tanto operárias quanto rainhas, dependendo da alimentação diferencial recebida durante o estágio larval. Larvas destinadas a se tornarem rainhas são alimentadas com grandes quantidades de geleia real, enquanto aquelas que se desenvolverão em operárias recebem geleia real suplementada com pólen e mel (Haydak, 1970). A dieta atua sobre o sistema neuroendócrino, gerando sinais casta-específicos responsáveis por alterações nos títulos do hormônio juvenil (HJ) e de ecdisteróides (Rachinsky *et al.*, 1990; Hartfelder e Engels, 1998), o que resulta em distintos perfis de expressão gênica (Cristino *et al.*, 2006; Barchuk *et al.*, 2007).

Um fator que regula o crescimento celular em resposta ao *status* nutritivo e que pode estar associado ao dimorfismo de castas (operárias e rainhas) é o gene *target of rapamycin* (*TOR*). Patel *et al.* (2007) mostraram que a dieta afeta a via de TOR e, conseqüentemente, aciona a via de insulina, regulando assim o crescimento corporal e o estoque de energia (Jia *et al.*, 2004). Assim, o desenvolvimento de castas envolve a interação entre o gene *TOR*, a via de sinalização *insulin/insulin-like signaling* (IIS) e os títulos de HJ (Tatar *et al.*, 2003).

Uma das diferenças mais marcantes entre a rainha e as operárias adultas reside no sistema reprodutivo. Uma rainha tem cerca de 200 ovariolos por ovário e é capaz de produzir centenas de ovos por dia, ao passo que as operárias têm entre dois e 12 ovariolos por ovário e não produzem ovos, a não ser em condições especiais (Velthuis, 1970). Tais diferenças têm origem durante o desenvolvimento larval, e são marcantes ao final do 5º instar, período no qual cerca de 95% dos primórdios de ovariolos sofrem morte celular programada nas larvas que se desenvolverão em operárias. Nas larvas destinadas a serem rainhas, os altos títulos de HJ previnem a degradação dos ovariolos (Schmidt-Capella e Hartfelder, 1998) sendo possível visualizar alguns folículos pré-vitelogênicos poucos dias antes da emergência (Adams *et al.*,

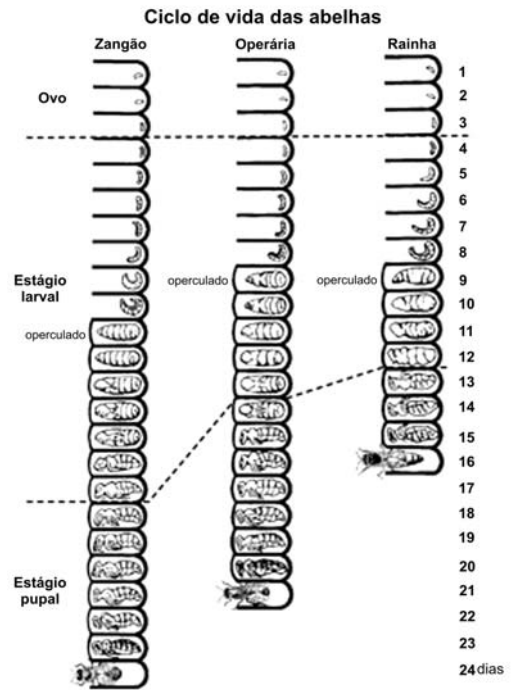


Figura 2: Ontogênese das abelhas *A. mellifera*: zangão, operária e rainha. Tempo em dias do desenvolvimento do ovo ao adulto recém-emergido. Modificado de Winston (1991).

1977; Estoup *et al.*, 1994). Depois do vôo de acasalamento, os folículos se tornam vitelogênicos e os ovos passam a ser produzidos.

Os ovários de *A. mellifera* são do tipo meroístico politrófico (**Fig. 3**), onde cada ovariolo é composto por filamento terminal (células indiferenciadas), germário (células germinativas e somáticas em diferenciação) e vitelário. O vitelário contém ovócitos em desenvolvimento e células nutridoras, ambos envoltos por uma bainha de células foliculares epiteliais (Ries, 1932; Patrício e Cruz-Landim, 2002).

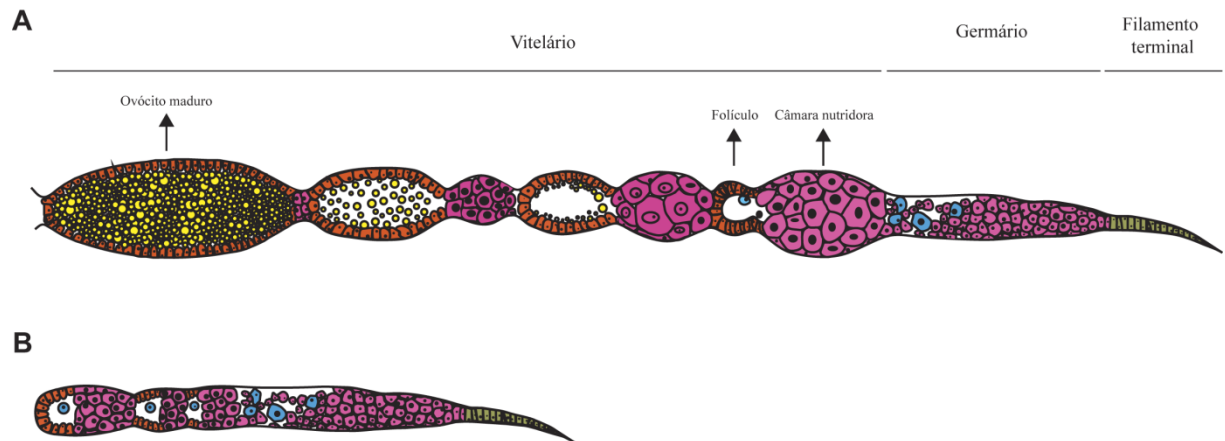


Figura 3: Esquema de ovariolos de abelhas *A. mellifera*. (A) Rainha ovipositora. (B) Operária adulta. Em azul: núcleos de ovócitos. Laranja: células foliculares cúbicas rodeiam cada ovócito em crescimento. Células foliculares achatadas rodeiam cada câmara nutridora. Amarelo: vitelo. Verde: células indiferenciadas do filamento terminal. Adaptado de Cruz-Landim (2009).

O papel dos zangões de *A. mellifera*, os quais se originam dos ovos não fertilizados postos por rainhas ou operárias poedeiras, está fundamentalmente relacionado ao acasalamento e fecundação da rainha (Winston, 1991). O sistema reprodutivo dos zangões é composto pelos testículos, vesículas seminais e glândulas acessórias ou de muco (Snodgrass, 1956). As unidades estruturais dos testículos, os testíolos, são bem evidentes no 3º instar larval e os agrupamentos de células germinativas em seu interior são observados no 4º instar larval (Tozetto, 1997).

Durante o estágio pupal, as células germinativas sofrem meiose e tem início a espermiogênese e migração dos espermatozoides para a porção pré-ventricular dos ductos deferentes e para as vesículas seminais, onde são temporariamente armazenados. O final do processo de espermiogênese ocorre antes da emergência do zangão adulto (Bishop, 1920; Silveira, 1972; Kerr e Silveira, 1974; Louveaux, 1977; Tozetto, 1997), assim como o início da degeneração dos testículos (Snodgrass, 1956).

2. Hexamerinas

Durante o estágio pupal o inseto holometábolo não se alimenta, mas utiliza proteínas abundantemente armazenadas na hemolinfa durante o estágio precedente, larval, como fonte de aminoácidos para o desenvolvimento (Burmester e Scheller, 1999). Estas proteínas são denominadas de proteínas de estocagem e as principais pertencem à classe das hexamerinas (Telfer e Kunkel, 1991), que integram uma família de proteínas composta por fenoloxidasas, hemocianinas, pseudo-hemocianinas e receptores de hexamerinas (Burmester e Scheller, 1996; Burmester, 2001 e 2002). Ao contrário da ancestral hemocianina, as hexamerinas perderam a função respiratória, pois nelas os resíduos de histidina ligadores de íons Cu^{2+} , necessários para o transporte de oxigênio, foram substituídos por outros aminoácidos (Beintema *et al.*, 1994; Burmester, 2001 e 2002).

As hexamerinas têm grande massa molecular e consistem de seis subunidades, sendo a maioria entre 75 e 90 kDa (Scheller *et al.*, 1990; Telfer e Kunkel, 1991). A reconstrução tridimensional de um complexo hexamérico de *Cerura vinula* (Lepidoptera), baseada em microscopia eletrônica de transmissão, revelou uma estrutura dupla-trimérica, ou seja, um dímero de trímeros (Kayser *et al.*, 2009).

Essas proteínas são sintetizadas em grandes quantidades pelo corpo gorduroso larval em resposta à intensa ingestão de alimento, sendo subsequente secretadas na hemolinfa, onde se acumulam em concentrações entre 60 e 90% do total de proteínas circulantes (Scheller *et al.*, 1990; Haunerland, 1996). Quando a larva pára de se alimentar, dá-se início ao sequestro das hexamerinas pelas mesmas células do corpo gorduroso que as sintetizaram, onde serão armazenadas em forma de grânulos citoplasmáticos, que serão utilizados em processos do metabolismo intermediário para atender ao desenvolvimento pós-larval (Locke e Collins, 1965, 1966, 1967 e 1968; Levenbook e Bauer, 1984).

A seletividade do processo de endocitose, ou sequestro, das hexamerinas foi sugerida pela identificação de receptores específicos putativos nas membranas das células do corpo gorduroso de alguns Lepidoptera (*Helicoverpa zea*, *Corcyra cephalonica*) e de vários Diptera (Burmester e Scheller, 1992; Wang e Haunerland, 1994a; Kirankumar *et al.*, 1997; Burmester e Scheller, 1999). Os receptores putativos de hexamerinas não pertencem a nenhuma classe conhecida de receptores de proteínas, mas são similares aos seus próprios ligantes, ou seja, às próprias hexamerinas, assim como a outros membros da família destas proteínas (Burmester e Scheller, 1996). Estudos recentes realizados em *Achea janata* (Lepidoptera) sugerem que os receptores de hexamerinas são proteínas ancoradas à face externa da membrana plasmática por meio de ligação covalente com o fosfolípido de membrana glicosil fosfatidil inositol

(GPI). Proteínas deste tipo têm funções variadas (ativação celular, transdução de sinal, hidrólise de proteínas da matriz extracelular, adesão celular) e podem mediar o sequestro de ligantes (por exemplo, as hexamerinas) por meio de fosforilação (Budatha *et al.*, 2011).

Diferentes hexamerinas coexistem em uma mesma espécie de inseto e suas origens têm sido atribuídas a eventos de duplicação gênica que resultaram em múltiplos parálogos (Burmester, 1999). Este fenômeno pode estar relacionado à aquisição de novas funções pelas diversas hexamerinas (Hagner-Holler *et al.*, 2007). Algumas destas moléculas contêm em sua composição uma porcentagem relativamente alta de aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano) e foram denominadas arilforinas. Outras são enriquecidas com metionina, ou glutamina (Telfer e Kunkel, 1991). É provável que estas particularidades sirvam para atender à necessidade de aminoácidos de diferentes tipos e quantidades durante o desenvolvimento pós-larval.

Neste contexto, há evidências circunstanciais de que certas hexamerinas participem do processo de esclerotização do exoesqueleto (Peter e Scheller, 1991). Outras teriam função no transporte de metabólitos ou hormônios (ecdisteróides e HJ), além de outros componentes orgânicos, como a riboflavina (Enderle *et al.*, 1983; Magee *et al.*, 1994; Braun e Wyatt, 1996; Nagamanju *et al.*, 2003). Zalewska *et al.* (2009) mostraram que proteínas da hemolinfa, entre elas as hexamerinas, formam um complexo com proteínas ligadoras de HJ, auxiliando seu transporte às células alvo. Deste modo indireto, as hexamerinas estariam relacionadas à regulação dos títulos e ação do HJ. Esta propriedade das hexamerinas sugere que podem participar do processo de diferenciação de castas em cupins (*Reticulitermes flavipes*) que é desencadeada por este hormônio (Zhou *et al.*, 2006a e b, 2007).

Além disto, a detecção de grânulos de hexamerinas no citoplasma das células do corpo gorduroso de alguns insetos adultos sugere que estas moléculas também constituem fontes de aminoácidos para a produção de proteínas do vitelo dos ovos e são, portanto, coadjuvantes no processo de reprodução (Wang e Haunerland, 1991; Roberts *et al.*, 1991; Faria *et al.*, 1994; Haunerland, 1996).

Experimentos com cultura de células intestinais de espécies de Lepidoptera (*Spodoptera littoralis*, *Trichoplusia ni* e *Leptinotarsa decemlineata*) mostraram que uma arilforina da hemolinfa induziu o aumento do número de células-tronco (Loeb, 2010). No entanto, o mecanismo pelo qual ocorre aumento da proliferação celular induzido por hexamerinas ainda não foi determinado.

3. Histórico do estudo de hexamerinas em *Apis mellifera*

Ryan *et al.* (1984) foram os primeiros a identificar, por meio de SDS-PAGE, uma subunidade de 74 kDa na hemolinfa de abelhas *A. mellifera*, à qual denominaram arilforina. Mais de uma década depois, Danty *et al.* (1998) demonstraram quatro subunidades de hexamerinas na hemolinfa desta abelha, as quais foram denominadas HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c e HEX 80/110, de acordo com as massas moleculares das subunidades obtidas por SDS-PAGE. Estes autores também verificaram que as subunidades de 70 kDa tinham N-terminais distintos, enquanto aquelas de massa molecular entre 80 e 110 kDa compartilhavam uma sequência N-terminal comum e possivelmente representavam isoformas secundárias de uma única sequência primária de aminoácidos. Assim, os dados de Danty *et al.* (1998) sugeriram a existência de, no mínimo, quatro diferentes genes de hexamerinas em *A. mellifera*.

Segue breve resumo dos estudos que se seguiram sobre a caracterização dos genes de hexamerinas e da expressão temporal de cada um deles nas operárias, rainhas e zangões, sob diferentes condições fisiológicas (naturais e manipuladas).

Cunha *et al.* (2005) tiveram como foco exclusivo o gene *hex 70b*. O cDNA foi completamente sequenciado e foi demonstrado que este gene está ativo em operárias durante o estágio larval. A redução da abundância de transcritos coincidia com a diminuição dos títulos de HJ e ecdisteróides que antecede a muda metamórfica, sugerindo regulação positiva, em nível de transcrição, por ambos os hormônios. Esta hipótese foi experimentalmente confirmada, uma vez que o tratamento de larvas de último estágio com estes hormônios impediu a redução dos níveis de transcritos, resultando em significativa extensão do período de expressão em comparação às larvas do grupo controle, não tratadas.

Bitondi *et al.* (2006) enfocaram o gene *hex 110*. Uma região de cDNA (correspondente a 180 nucleotídeos) foi sequenciada e foi verificado que em operárias, os níveis de transcritos são muito abundantes durante o estágio larval e início do estágio pupal, mas diminuem substancialmente em quantidade ao final deste estágio e durante a ecdise. Os níveis de transcritos aumentam novamente no estágio adulto, mas sem atingir a abundância verificada no estágio larval. Experimentos de manipulação da dieta alimentar e do *status* reprodutivo das operárias adultas mostraram que a expressão de *hex 110* correlaciona-se positivamente com o consumo de pólen, a principal fonte de proteínas da dieta das abelhas, e com a presença de ovários ativos em operárias órfãs (que foram separadas da rainha e, portanto, liberadas do efeito repressor do feromônio real que impede sua reprodução). Estes

resultados mostraram que o gene *hex 110* é nutricionalmente regulado nas operárias adultas e que a reprodução demanda aumento de expressão deste gene.

Os estudos de Martins (2008) e Martins *et al.* (2008) tiveram como alvo o gene *hex 70a*. A densidade de transcritos de *hex 70a* no corpo gorduroso, assim como a abundância das respectivas subunidades polipeptídicas na hemolinfa, foram comparadas entre operárias, rainhas e zangões durante os estágios larval, pupal e adulto. Assim como *hex 110*, foi demonstrado que o gene *hex 70a* é nutricionalmente regulado e sua expressão aumenta significativamente no corpo gorduroso de operárias com ovários ativos, sugerindo que seu produto pode ser requerido para uma função no contexto da reprodução. A presença de transcritos e de subunidades de HEX 70a nas gônadas em diferenciação de operárias, rainhas e zangões, conforme demonstrado por RT-PCR e *western blot* evidenciou um novo papel para esta hexamerina na biologia do desenvolvimento de *A. mellifera*.

Martins *et al.* (2010) aprofundaram e tornaram mais abrangente o enfoque sobre os genes de hexamerinas. O gene *hex 110* foi completamente sequenciado, assim como *hex 70c*. Foi verificado que cada um dos genes de hexamerinas está presente como uma única cópia no genoma de *A. mellifera*: *hex 70a*, *hex 70b* e *hex 70c* estão localizados *in tandem* no GroupUn.53, enquanto *hex 110* está posicionado separadamente no Group11.32. O diagrama esquemático comparando a estrutura dos genes de hexamerinas, assim como suas sequências nucleotídicas constam do **Apêndice 1 (Fig. 29)**. A contribuição de um dos co-autores do trabalho supra-citado (A. S. Cristino) levou à identificação de motivos conservados de resposta ao HJ nas respectivas regiões 5' UTR dos genes de hexamerinas, além da construção de uma árvore filogenética abrangendo 45 sequências conhecidas de hexamerinas de Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, Isoptera e Orthoptera. Foram mapeados seis motivos super-representados numa extensão de 1,5 kb a partir (*upstream*) dos códons de início dos respectivos genes. Um dos motivos mostrou significativa identidade com o sítio de ligação da proteína *Ultraspiracle* (USP), que compõe o complexo de ligação de ecdisteróides e HJ ao DNA (Yao *et al.*, 1992 e 1993; Jones *et al.*, 2006). Os outros cinco motivos não apresentaram similaridade com elementos de resposta conhecidos e parecem ser específicos de hexamerinas. A análise filogenética revelou um complexo padrão de evolução das hexamerinas, com radiação independente em cada uma das Ordens de insetos contemplada na análise. Revelou ainda que HEX 110, juntamente com as sequências HEX 109 e HEX 102 de outro Hymenoptera, a vespa parasita *Nasonia*, ocupa a posição mais basal entre as hexamerinas de insetos Holometabola conhecidas até então.

Estudos comparativos dos níveis de expressão de cada gene no corpo gorduroso, em etapas precisas da muda metamórfica, evidenciaram diferenças na modulação da expressão

entre operárias, rainhas e zangões, neste período crítico do desenvolvimento, e também durante os estágios pupal e adulto (**Apêndice 2 – Fig. 30**). Os estudos comparativos foram estendidos às gônadas das fêmeas e dos zangões em desenvolvimento e adultos (**Apêndice 3 – Fig. 31**). As análises por RT-PCR semi-quantitativa mostraram que além de expressar o gene *hex 70a*, conforme verificado anteriormente (Martins *et al.*, 2008), os ovários e testículos em desenvolvimento também expressam *hex 110* e *hex 70b*. Assim como *hex70a*, a expressão do gene *hex 110* também foi identificada em ovários de rainhas em oviposição. O único gene de hexamerina aparentemente inativo nos ovários e testículos é *hex 70c*, uma vez que não foram identificados transcritos nestes órgãos.

Estes resultados podem ser assim resumidos: (1) os genes codificadores de hexamerinas de *A. mellifera* apresentam características estruturais peculiares indicando diversidade de funções no ciclo de vida; (2) os 4 genes de hexamerinas compartilham motivos super-representados na região reguladora 5', incluindo um motivo com potencial de ligar o receptor de HJ, sugerindo que estes genes são regulados por HJ; (3) todos os genes de hexamerinas mostram expressão abundante no corpo gorduroso larval de operárias, rainhas e zangões, corroborando a função canônica de genes codificadores de proteínas de estocagem para a metamorfose; os genes *hex 110* e *hex 70a* são também transcritos no corpo gorduroso dos adultos, com padrões de expressão casta e sexo específicos, sugerindo funções alternativas neste órgão dos adultos; (4) a expressão de três dos genes de hexamerinas (*hex70a*, *hex 70b* e *hex 110*) nas gônadas de larvas e pupas de operárias, rainhas e zangões sugeriu função no desenvolvimento e diferenciação destes órgãos; (5) a expressão de *hex 70a* e *hex 110* nas gônadas de rainhas adultas sugeriu relação com o funcionamento dos ovários e reprodução.

Com o intuito de aprofundar este tema, procedemos à busca de evidências de funções alternativas das hexamerinas no contexto do desenvolvimento de *A. mellifera*, abrangendo diferentes fases do ciclo de vida. Também foram estudados aspectos da regulação dos genes de hexamerinas. Além disto, empreendemos esforços para isolar e purificar parcialmente estas proteínas, e paralelamente, iniciamos os procedimentos de transcrição/tradução *in vitro* das hexamerinas em bactérias visando obtê-las parcial ou totalmente purificadas para viabilizar a caracterização da estrutura dos hexâmeros e experimentos de ligação ao HJ.

Objetivos

Objetivo Geral:

Este trabalho teve como objetivo geral a busca de evidências de funções alternativas das hexamerinas de *A. mellifera*, e o estudo de aspectos da regulação destes genes, principalmente no contexto da metamorfose do corpo gorduroso e desenvolvimento/maturação das gônadas.

Objetivos Específicos:

No contexto da metamorfose: (1) verificar a dinâmica de acúmulo de hexamerinas no corpo gorduroso e hemolinfa; (2) obter evidência de regulação dos genes de hexamerinas por HJ e pela dieta alimentar; (3) verificar as consequências da diminuição dos níveis de hexamerinas sobre o desenvolvimento; (4) determinar a localização de HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c e HEX 110 nas células do corpo gorduroso de operárias durante a muda metamórfica;

No contexto do desenvolvimento/maturação das gônadas: (1) Determinar a localização das hexamerinas HEX 70a e HEX 110 nas células das gônadas de operárias, rainhas e zangões; (2) Investigar a relação entre HEX 70a, crescimento dos ovariolos e esclerotização cuticular.

Como objetivo adicional, propusemos iniciar procedimentos para obter as hexamerinas parcialmente ou totalmente puras visando caracterizar a estrutura do hexâmero e aspectos específicos da função

Material e Métodos

1. Material Biológico

Abelhas africanizadas *Apis mellifera* foram obtidas no apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

1.1. Operárias e rainhas em diferentes estágios e fases da ontogênese

Rainhas ovipositoras foram confinadas em uma área limpa de um quadro de cria, por meio de uma tela excludora de rainhas, durante 6 h. Finalizado o período determinado para a oviposição, a rainha foi retirada do confinamento, mas a tela excludora foi mantida para evitar que novos ovos fossem depositados nos mesmos alvéolos.

Passados três dias, larvas de 1º instar foram transferidas para cúpulas de rainhas contendo geleia real, sendo mantidas em colônias-recria até a emergência dos adultos. Algumas larvas foram mantidas no quadro de cria para a obtenção de operárias.

Larvas e pupas foram identificadas de acordo com os critérios de Rembold *et al.* (1980) e Michelette e Soares (1993), que apresentam um perfil detalhado do desenvolvimento pré-imaginal de *A. mellifera* baseado em características morfológicas e fisiológicas de rainhas e operárias, respectivamente (**Tabela I**). Assim, as larvas de rainhas e operárias foram agrupadas em cinco estágios distintos (L1, L2, L3, L4 e L5), definidos com base na ocorrência de ecdises. O 5º e último instar larval é o mais longo, sendo subdividido em três fases: de alimentação (L5F), de tecelagem do casulo (L5S) e de pupa farata (PP) que representa o estágio de transição entre o estágio larval e o pupal. A pupa (Pw) e os adultos faratos em fases sucessivas de desenvolvimento (Pp, Pdp, Pb, Pbl, Pbm e Pbd) foram classificados usando como parâmetros a cor do olho e a pigmentação da cutícula torácica.

Tabela I: Identificação dos estágios e fases de desenvolvimento de rainhas e operárias de *Apis mellifera* (Rembold *et al.*, 1980; Michelette e Soares, 1993).

Instares larvais	Intervalo de peso (mg) e características	
	Operárias	Rainhas
L1	0,11 – 0,30	0,10 – 0,45
L2	0,31 – 1,05	0,35 – 1,50
L3	1,50 – 4,45	1,30 – 7,0
L4	4,80 – 24,80	3,80 – 44,00
L5F1	27,12 – 42,62	35,00 – 90,00
L5F2	53,09 – 91,01	91,00 – 180,00
L5F3	106,78 – 115,86	181,00 – 260,00
L5S1	Intestino totalmente cheio	
L5S2	Intestino em processo de esvaziamento	
L5S3	Intestino totalmente vazio	
PP1	Pouco movimento, cabeça orientada em direção ao opérculo, o intestino pode ser visualizado como um tubo vazio.	
PP2	Imóvel, cabeça orientada em direção ao opérculo, o intestino não é mais visível, os apêndices da cabeça e do tórax são visíveis através da cutícula larval.	
PP3	Imóvel, cabeça orientada em direção ao opérculo, o líquido exuvial foi reabsorvido e a cutícula larval tornou-se opaca e enrugada. Apêndices torácicos não podem mais ser visualizados.	
Fases do estágio pupal	Cor do olho	Pigmentação da cutícula torácica
Pw	Branco	Ausente
Pp	Rosa claro	Ausente
Pdp	Rosa escuro	Ausente
Pb	Marrom	Ausente
Pbl	Marrom	Início
Pbm	Marrom	Intermediária
Pbd	Marrom	Intensa

Operárias adultas foram obtidas em colmeias de acordo com a atividade exercida durante a coleta: nidal (recém-emergida e alimentação da cria) ou extra-nidal (forrageamento). Rainhas ovipositoras foram obtidas de diferentes colmeias, não importando a idade cronológica.

1.2. Obtenção de zangões

Zangões foram coletados de colmeias em condições regulares (com rainha) e órfãs (sem rainha). As pupas foram identificadas de acordo com os critérios de Tozetto *et al.* (2007) (**Tabela II**), sendo classificadas em 13 estágios (P1, P2, P3, até P13), usando como parâmetros a cor do olho e a pigmentação da cutícula torácica.

Tabela II: Parâmetros para classificação de fases de desenvolvimento de zangões de *Apis mellifera* (Tozetto *et al.*, 2007).

	Fases de pupa e adulto farato	Cor dos olhos	Pigmentação da cutícula torácica
Pupas	P1	Perolado	Perolado
	P2	Bege	Perolado
Pupas faratas	P3	Rosa	Perolado
	P4	Violeta	Perolado
	P5	Violeta escuro	Perolado
	P6	Violeta escuro	Pigmentação mesocutânea
	P7	Violeta escuro	Marfim
	P8	Violeta claro	Marfim
	P9	Violeta claro	Bege
	P10	Violeta claro	Bege escuro
	P11	Violeta claro	Marrom claro
	P12	Marrom	Marrom
	P13	Marrom	Marrom escuro

2. Tratamento hormonal

Larvas L5F de operárias foram tratadas topicamente com 1 μ L de uma solução de 10 μ g/ μ L de hormônio juvenil III (Fluka) diluído em acetona. Larvas do grupo controle receberam 1 μ L do diluente. Após o tratamento, o quadro com as larvas tratadas foi devolvido à colmeia, onde permaneceu por 24 h, quando os grupos tratados e controles foram coletados para análise por RT-PCR.

3. Manipulação da dieta alimentar

3.1. Alternância da dieta de larvas de operárias e rainhas

Rainhas ovipositoras foram confinadas em uma área limpa de um quadro de cria, por meio de uma tela excludora de rainhas, durante 6 h. Metade das larvas de primeiro instar, 96 h após a postura, foram transferidas para realeiras, contendo geleia real, e a outra metade permaneceu no quadro de cria. Após 48 h, metade do grupo que estava nas realeiras foi transferido de volta para o quadro de cria, e metade do grupo que estava no quadro de cria foi transferido para novas realeiras. Passados mais dois dias, as larvas dos quatro grupos foram pesadas, o corpo gorduroso foi coletado para extração de RNA e análises por RT-PCR semi-quantitativa, e a hemolinfa para análise de proteínas por western blot. Resumidamente, os grupos analisados eram constituídos por: 1) abelhas que permaneceram 4 dias em células de operárias (4Op); 2) abelhas que ficaram 2 dias em células de operária e 2 dias em células de rainha (2Op2Ra); 3) abelhas que ficaram 2 dias em células de rainha e 2 dias em células de operária (2Ra2Op); e 4) abelhas que permaneceram 4 dias em células de rainha (4Ra).

3.2. Dieta larval enriquecida ou pobre em pólen

Duas colônias de abelhas *Apis mellifera* foram confinadas em gaiolas de 2 x 2 x 2 m, localizadas no apiário Experimental do Departamento de Genética da FMRP-USP. Nos três primeiros dias, estas colônias não receberam alimento para que o pólen estocado pelas operárias fosse totalmente consumido e, então, um quadro livre de alimento e cria foi utilizado para o confinamento da rainha para oviposição. A partir do quarto dia, as colônias receberam alimento composto por pólen comercial fermentado (1 kg de pólen + 10 mL de mel, estocado em estufa, durante 24 h, a 34°C e 80% de umidade relativa) em diferentes concentrações: 1) 5% de pólen em xarope (50% de açúcar em água); 2) 20% de pólen em xarope. Os quadros foram acompanhados dia-a-dia e após 8 dias, larvas da postura controlada foram coletadas e pesadas. A hemolinfa foi estocada para análise por *western blot* e o RNA total foi extraído do corpo gorduroso para análise por RT-PCR e qRT-PCR.

4. Inativação das hexamerinas

Pupas (Pw) de operárias e rainhas foram coletadas e mantidas em estufa a 34°C e 80% de umidade relativa por 24 h antes de receberem uma injeção de 1 µL (1 µg) do anticorpo anti-HEX 70a, anti-HEX 70b, anti-HEX 70c ou anti-HEX 110 (**Tabela III**), diluído em 0,9% NaCl. O anticorpo foi injetado na hemocele abdominal, com o auxílio de uma micro seringa Hamilton (1701LT) e agulha G30 (Becton Dickinson). Para este experimento foram utilizados

dois grupos controle que receberam 1 μ L de NaCl 0,9%, ou 1 μ L (1 μ g) de anticorpo anti-mouse diluído em 0,9% NaCl. Após 4 e 24 h da injeção, a hemolinfa e o corpo gorduroso de parte dos grupos tratados e controles foram coletados para análise por *western blot*. Parte dos grupos foram mantidos em estufa, nas mesmas condições acima mencionadas, até a emergência (ecdise), quando foram fotografados. Uma vez que a hexamerina HEX 70a é uma arilforina e, dessa forma, podem estar relacionada com a formação da cutícula, o progresso da pigmentação e esclerotização foram examinados diariamente até a ecdise. Rainhas injetadas com anti-HEX 70a tiveram seus ovários dissecados e marcados com DAPI para medidas da espessura dos ovariolos.

Tabela III: Sequências utilizadas para a produção dos anticorpos contra hexamerinas de *A. mellifera*

Nome	Sequência	Empresa produtora
anti-HEX 110	NLYTKYHGQYP	<i>Rheabiotech</i> , Campinas, Brasil
anti-HEX 70a	SYKMHQKPYNKD	<i>Affinity BioReagents</i> , CO, USA
anti-HEX 70b	TFNLVENLDNYNDKEAVNEF	<i>Rheabiotech</i> , Campinas, Brasil
anti-HEX 70c	RNYDMESNMDMYKDKNVVQK	<i>Rheabiotech</i> , Campinas, Brasil
anti-mouse	<i>Horseradish Peroxidase-linked whole antibody</i>	<i>Kit ECL Western Blotting Detection Reagents and Analysis System</i> (Amersham Biosciences)

5. Extração de hemolinfa

A coleta de hemolinfa de operárias foi realizada através de incisão na cutícula abdominal dorsal das larvas e pupas pela qual inseriu-se um microcapilar. Às alíquotas de hemolinfa obtidas por sucção foi adicionado inibidor de protease (*Protease Inhibitor Cocktail Tablets* – Roche Applied Science) (10% v/v). As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm (mini Spin Eppendorf) por 3 min. O sobrenadante foi coletado e estocado a -20°C.

6. Separação de membranas e núcleos de células do corpo gorduroso

6.1. Membranas

Larvas de 5° instar (operárias) foram dissecadas para a extração do corpo gorduroso em tampão HEPES₁ gelado (5 mM HEPES, pH 8,5; 130 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,1 M CaCl₂). O corpo gorduroso foi lavado (3 vezes) com tampão HEPES₂ (5 mM HEPES, pH 8,5; 0,1 mM CaCl₂), para retirar a hemolinfa contaminante. Então 1,5 mL de tampão HEPES₂ foi adicionado à amostra e, com o auxílio de uma seringa de insulina (1 mL/cc – INJEX indústrias cirúrgicas LTDA), o material foi homogeneizado. Após centrifugação a 2580 rpm

(Sorvall RC5C), por 10 min, a 4°C, o sobrenadante foi retirado e novamente centrifugado a 14000 rpm (Sorvall RC5C) por 30 min a 4°C. O *pellet* foi lavado com 1,5 mL de tampão HEPES₂ e submetido a nova centrifugação nas mesmas condições da anterior. O *pellet* (fração de membranas) foi ressuscitado em 0,5 mL de tampão HEPES₃ (10 mM HEPES, pH 7; 2 mM CaCl₂; 10% sacarose p/v), acrescido de 0,1% de Triton X-100.

6.2. Núcleos

Larvas de 5° instar (operárias) foram dissecadas para a extração do corpo gorduroso em PBS₁ (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄, pH 7.4). O corpo gorduroso foi lavado (3 vezes) com PBS₁ para retirar a hemolinfa contaminante. Então, 1,5 mL de PBS₁ e 25 µL de inibidor de proteases foram adicionados à amostra, que foi centrifugada a 200 – 250 x g, por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 10 µL de inibidor de proteases e 1 mL de tampão HEPES₂ foram adicionados ao *pellet*, o qual foi homogeneizado com o auxílio de uma seringa de 3 mL e agulha número 26 por cerca de 10 vezes, e centrifugado a 1000 x g por 5 min a 4°C. Ao *pellet* (fração nuclear) foram adicionados 2,5 µL de inibidor de protease e 150 µL de tampão uréia/CHAPS (uréia 8 M e 2% CHAPS). O *pellet* foi homogeneizado e levado ao ultrassom por 5 min, e depois ao gelo por 5 min e ao vórtex por 5 min (este ciclo foi repetido 3 vezes). A amostra foi centrifugada a 20000 x g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi estocado em freezer -80°C.

7. Análises de expressão gênica

7.1. Extração do RNA total e síntese do cDNA

A extração de RNA foi feita utilizando reagente TRIzol® (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento de RNA total, Invitrogen). O protocolo de extração foi aquele recomendado pelo fabricante. Para tecidos contendo excesso de gordura (no caso de larvas de 5° instar e amostras de corpo gorduroso) o passo de adição de clorofórmio foi repetido. O RNA obtido foi ressuscitado em água tratada com 0,1% dietilpirocarbonato (DEPC). A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro (*NanoDrop®ND-1000*, NanoDrop Technologies) a 260 nm. As amostras foram estocadas em freezer – 80°C.

O RNA foi tratado com DNase (Invitrogen) por 15 min em temperatura ambiente e em seguida a 65°C por 10 min, para a inativação da enzima com a adição de 1 µL de EDTA. A síntese de cDNA, a partir de 1-2,5 µg de RNA total, foi feita de acordo com o sistema de síntese Superscript II (Invitrogen) e Oligo (dT)12-18 (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. Por este método, apenas a primeira fita do cDNA é sintetizada através de

transcrição reversa. A segunda fita é gerada posteriormente por PCR com o uso de *primers* específicos.

7.2. PCR e análise por eletroforese

Para as ampliações por PCR foram utilizados os cDNAs e os *primers* específicos para cada gene (todos desenhados em exons diferentes, para controle de eventual contaminação por DNA genômico) e as condições de PCR específicas foram determinadas para cada par de *primers* (**Tabela IV**).

As reações foram realizadas com 0,8 µL de *primer forward* e *reverse* (1µM), 1 µL de cDNA, 10 µL de *Master Mix 2,5X* (Promega) {10X PCR *buffer* [200 mM Tris- HCl (pH 8,4), 500 mM KCl]; 50 mM MgCl₂; 25 mM dNTP mix [100 mM de solução de: dTTP; dATP; dGTP e dCTP]; *taq DNA polymerase* [5 U/µL]}, totalizando um volume de 20 µL com água bidestilada estéril. O controle da amplificação foi realizado utilizando-se *primers* específicos para o gene codificador da proteína ribossomal *rp49* de *Apis mellifera* (*GenBank accession number* AF441189; **Tabela IV**), de expressão constitutiva (Lourenço *et al.*, 2008).

Aos cDNAs amplificados por PCR foram adicionados 2,5 µL de tampão de amostra (50% glicerol; 0,42% azul de bromofenol; 0,42% xileno cianol) para análise em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio, em tampão TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8). A eletroforese foi realizada com uma corrente constante de 100 V. Após a eletroforese, o gel foi visualizado digitalmente com o uso de um fotodocumentador KODAK EDAS 290. O λDNA/*Hind* III *Fragments* de 100 pb (Invitrogen®, *Life Technologies*) ou *100 bp DNA Ladder* (Promega) foi usado como marcador do tamanho dos produtos de PCR (fragmentos de DNA).

Tabela IV: Sequências dos *primers* específicos e condições de PCR para análise semi-quantitativa

Versão do genoma	Número de acesso no <i>GenBank</i>	Tamanho do fragmento	Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'-3')	Condições da PCR
4.0	EU105212	152 nt	Hex 110 F Hex 110 R	GGCGGAGGAATTCAGCAAAA TGGCCTACAGGATTCTGGAT	94°C – 30 s; 18 ciclos de 94°C – 30 s, 58°C – 1 min, 72°C – 1 min; 72°C – 10 min
4.0	EF591128	109 nt	Hex 70a F Hex 70a R	AAAGCCAATCACGCTCTGAT AATCGTGATTACAGATACCAGC	94°C – 30 s; 21 ciclos de 94°C – 30 s, 54°C – 1 min, 72°C – 1 min; 72°C – 10 min
4.0	AY601637	132 nt	Hex 70b F Hex 70b R	ATACGACGAGTTCGGTCATG ACGAAGACAGATTCGTGGCT	94°C – 30 s; 21 ciclos de 94°C – 30 s, 54°C – 1 min, 72°C – 1 min; 72°C – 10 min
4.0	EF89162	130 nt	Hex 70c F Hex 70c R	TTACAAAACGCGCTTGGG GGGATAGATCTCGTAGATGG	94°C – 30 s; 23 ciclos de 94°C – 30 s, 54°C – 1 min, 72°C – 1 min; 72°C – 10 min
4.0	AF441189	150 nt	Rp49 F Rp49 R	CGTCATATGTTGCCAACTGGT TTGAGCACGTTCAACAATGG	94°C – 30 s; 25 ciclos de 94°C – 30 s, 58°C – 1 min, 72°C – 1 min; 72°C – 10 min

7.3. qRT-PCR

RT-PCR em tempo real foi realizada utilizando *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Diluições seriadas de cDNA foram utilizadas para calcular a eficiência (E) das reações ($E = 10^{(-1/\text{slope})}$) para cada gene. Os pares de *primers* escolhidos foram aqueles cuja eficiência ficou entre 1,9 e 2,05. A amplificação foi feita com 20 µL de volume final, contendo 10 µL de *SYBR® Green Master Mix 2X* (Applied Biosystems), 1 µL de cDNA (diluído 10X), 7,4 µL de água destilada e 0,8 µL (1 µM) de cada *primer* específico (**Tabela IV e V**). Os *primers* foram desenhados para amplificar uma região de cada gene flanqueando um íntron, servindo assim como controle da contaminação por DNA genômico. Para checar a

reprodutibilidade, o método foi realizado em triplicata técnica e triplicata biológica. As condições de PCR foram: 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. O gene *rp49* de *A. mellifera* codificador de uma proteína ribossomal de expressão constitutiva (Lourenço *et al.*, 2008) foi utilizado para normalização e controle interno da PCR (**Tabela IV**). Cada corrida foi seguida por análise da curva de *melting* para confirmar a especificidade da amplificação e ausência de dímeros de *primers*. A quantificação relativa dos transcritos foi calculada usando o método comparativo Ct (Applied Biosystems, *User bulletin # 2*).

Tabela V: Sequência dos *primers* específicos utilizados em análise por qRT-PCR

Versão do genoma	Número de acesso no <i>GenBank</i>	Tamanho do fragmento	Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'-3')
4.0	GB11059	149 nt	Lipoforina F Lipoforina R	AGCGAAGAGGATCGCAGATA AACCCCTTCGTTCTCCTTTC
4.0	GB10174	267 nt	ILP2 F ILP2 R	ATGCACCAATATTATGGTCGAAC TTAACGGGCACCGCAATAGG
4.0	GB11037	119 nt	Chico F Chico R	ACCAGCGAAAGTCATCCAAC GAGATTGGCGGTGAATAGGA
4.0	GB11213	128 nt	Tor F Tor R	CTTCAAAAAGCCTGGACTGC GCAAGAGCCCAACATGATCT
4.0	AB490017	106 nt	ecrA F ecrA R	CCAACAGCAACAACGGCTAC AAAGAGCCAGGCTGCGACAA
4.0	AB490050	86 nt	ecrB F ecrB R	ACAGTGTTGCCAACGGTCAC AAAGAGCCAGGCTGCGACAA
4.0	AY273778	145 nt	USP F USP R	CGATATTCGACCGTGTCTC AGCAGGGTCACTTCTGGAT
4.0	GB15634	145 nt	MFE2 F MFE2 R	GGAATCATTTCTTGCGGAGA GTTATGCGCGCTATGGAAAT
4.0	AY647436	121 nt	JHE F JHE R	AGATGCGCCCAGAGTAAAAA TTTCCCAACTGGAGGTAACG
4.0	XM394922	160 nt	JHEH F JHEH R	GCTTTTCAATTAGGTAGTGG GATGGGAAATAGGTACCGAC

8. Imunolocalização das hexamerinas e busca de função

8.1. Microscopia de luz

Gônadas de rainhas, operárias e zangões foram dissecadas em Ringer (NaCl 0,17 M; KCl 0,01 M; CaCl₂ 0,003 M) e fixadas em paraformaldeído 4% em PBS₁, por 24 h, a 4°C. Os tecidos foram, então, desidratados em uma série crescente de etanol (70, 80, 90 e 95%, 2 lavagens de 15 min cada) e infiltrados em resina de metacrilato por 24 h a 4°C, seguido de embebição na mesma resina acrescida de endurecedor (*Historesin*, Leica). Secções seriadas de 4 µm de espessura foram realizadas em micrótomo (Micron) e transferidas para lâminas histológicas para coloração com azul de metileno e fucsina básica (21,8% de azul de metileno 4 mM; 38% de tetraborato de sódio 26,2 mM; 27,2% de etanol absoluto; 13% de fucsina básica 3,8 mM) por 5 min, seguida de uma rápida lavagem com água destilada e estocagem em estufa a 37°C para secagem do material. Após a secagem das lâminas foram realizadas preparações permanentes com Entellan (Merck), e o material foi examinado e fotografado em microscópio de luz *Axioskop II photomicroscope* (Zeiss).

8.2. Microscopia confocal

8.2.1. Marcação de F-actina com rodamina-faloidina

Após dissecação em PBS₁, ovários e testículos foram imersos em meio de cultura específico para tecidos de abelhas (Rachinsky e Hartfelder, 1998), no qual foi realizada a individualização dos ovariolos e testíolos e remoção da túnica peritoneal que os reveste. Ovariolos e testíolos foram fixados por 30 min em solução contendo 240 µL de PBS₁, 200 µL de formaldeído 37% (Merck), 8 µL de Triton X-100 (Sigma) e 2 µL de rodamina-faloidina (Invitrogen). O material foi lavado 2 vezes em solução de PBS₁ com Triton X-100 0,2% (0,2% TPBS) e 0,1% de rodamina-faloidina por 20 min cada. Uma terceira lavagem foi realizada em 0,2% TPBS por 20 min. Ovariolos e testíolos foram incubados por 5 min em DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole - Sigma) 1:8000 em 0,2% TPBS e então lavados 5 vezes em 0,2% TPBS por 5 min cada. Glicerol 80% (Merck) em 0,2% TPBS foi utilizado como meio de montagem e o material foi examinado em microscópio confocal Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems, Bannockburn, IL).

8.2.2. Imunolocalização da hexamerina HEX 70a nas gônadas

Ovariolos e testíolos foram fixados por 20 min sob agitação constante em paraformaldeído 4% em PBS₁, permeabilizados com 0,1% TPBS por 15 min (5 lavagens), bloqueados com 0,1% TPBS e 1% BSA (TPBSA₁) por 30 min e incubados em TPBSA₁ e 5%

de soro de cabra, por 30 min à temperatura ambiente. Ovariolos e testíolos foram então incubados com anti-HEX 70a em uma concentração de 1:50 em TPBSA₁ e 5% de soro de cabra por 16 h a 4°C. Em sequência, o material foi lavado 5 vezes (20 min cada lavagem) em 0,1% TPBS, bloqueado com TPBSA₁ por 20 min (2 lavagens) e incubados em 5% soro de cabra por 30 min. *Cy3 goat anti-rabbit antibody* (Sigma, 1:200 diluição) foi adicionado às amostras e estas foram incubadas por 2 h em temperatura ambiente. Ovariolos e testíolos foram lavados com 0,1% TPBS (5 lavagens de 20 min cada) e incubados com DAPI (1:8000 diluição) em 0,1% TPBS por 5 min e então lavados 5 vezes com 0,1% TPBS. Ovariolos e testíolos foram montados em Glicerol 80% (Merck) e examinados em *Leica TCS-SP5 confocal microscope* (Leica Microsystems, Bannockburn, IL).

8.2.3. Co-localização de HEX 70a e EdU

Pupas de operárias Pw foram coletadas e mantidas em estufa por 24 h a 34°C com 80% de umidade relativa. Com o auxílio de uma micro seringa Hamilton (1701LT) e agulha G30 (Becton Dickinson), 40 µM de *5-ethynyl-2'-deoxyuridine* (EdU, *Click-it™ EdU Imaging Kits* - Invitrogen) diluído em Ringer foi injetado na hemocele da região abdominal. As pupas foram mantidas por mais 24 h em estufa a 34°C com 80% de umidade relativa, após as quais os ovários foram dissecados e fixados em 3,7% formaldeído em PBS₁ por 30 min, lavados em PBS₁ por 20 min e, subsequentemente, transferidos para a solução de reação do *Click-it EdU Imaging Kit* (43 µL de 10X *reaction buffer*; 38 µL de água destilada; 20 µL de sulfato de cobre; 1,2 µL de Alexa Fluor 594; 50 µL de *reaction buffer additive*) por 30 min. A permeabilização e a marcação com anticorpo para localização da hexamerina HEX 70a foram realizadas conforme descrito no item 8.2.2.

8.2.4. Marcação dos núcleos com DAPI e medição da largura dos ovariolos

Ovários de pupas de rainhas injetadas com anticorpo anti-HEX 70a e ovários do grupo controle injetado com NaCl 0,9% foram dissecados e fixados em paraformaldeído 4% em PBS₁ por 20 min. Os ovariolos foram lavados três vezes com 0,2% TPBS por 20 min e incubados com DAPI (1:8000 - Sigma) em 0,1% TPBS por 5 min, seguido de 5 lavagens (5 min cada) em 0,1% TPBS. Os ovariolos foram montados em Glicerol 80% e examinados em *Leica TCS-SP5 confocal microscope* (Leica Microsystems, Bannockburn, IL), utilizando o software do programa para a medição da largura dos ovariolos em pontos específicos ao longo de seu eixo proximal-distal.

8.2.5. Imunolocalização da hexamerina HEX 110 nos ovários de operárias adultas (7 dias de idade) e rainhas ovipositoras

Ovariolos foram fixados por 20 min em paraformaldeído 4% em PBS₁, permeabilizados com 0,1% TPBS por 5 min (3 lavagens), bloqueados com TPBSA₁ por 5 min (5 lavagens) e incubados em TPBSA₁ e 10% de soro de cabra, por 1 h. Os ovariolos foram então incubados com anti-HEX 110 a uma concentração de 1:50 em TPBSA₁ e 10% de soro de cabra por 16 h a 4°C. Em sequência, o material foi lavado 3 vezes (5 min cada lavagem) e 5 vezes (20 min cada lavagem) em TPBSA₁, e incubado com Alexa Fluor 488 conjugado com anticorpo anti-rabbit (Invitrogen, 1:200 diluição) em TPBSA₁ por 2 h em temperatura ambiente. Os ovariolos foram lavados com TPBSA₁ (3 lavagens de 5 min e 5 lavagens de 20 min) e incubados com iodeto de propídeo (Invitrogen, 2 µg por mL), para marcação dos núcleos, em TPBSA₁ por 15 min e então lavados 3 vezes com TPBSA₁ por 5 min. Em seguida foram montados em Glicerol 80% (Merck) e examinados em *Leica TCSSP5 confocal microscope* (Leica Microsystems, Bannockburn, IL).

8.2.6. Imunolocalização das hexamerinas HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c e HEX 110 no corpo gorduroso de operárias

Corpo gorduroso de operárias em fase de pupa farata (PP2, **Tabela I**) foi fixado por 20 min em paraformaldeído 4% em PBS₁, permeabilizado com 0,1% TPBS por 5 min (3 lavagens), bloqueado com 0,6% TPBS e 5% BSA (TPBSA₂) por 5 min (5 lavagens) e incubado em TPBSA₂ e 10% de soro de cabra, por 30 min. Seguiu-se incubação com anti-HEX 110, anti-HEX 70a, anti-HEX 70b ou anti-HEX 70c a uma concentração de 1:50 em TPBSA₂ e 10% de soro de cabra por 16 h a 4°C. Em sequência, o material foi lavado 3 vezes por 5 min e 5 vezes por 20 min em TPBSA₂, e incubado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen, diluição 1:200) em TPBSA₂ por 2 h em temperatura ambiente. Seguiram-se lavagens com TPBSA₂ (3 lavagens de 5 min e 5 lavagens de 20 min) e incubação com iodeto de propídeo (Invitrogen, 2 µg por mL) em TPBSA₂ por 15 min e 3 lavagens com TPBSA₂ por 5 min. O corpo gorduroso foi montado em Glicerol 80% (Merck) e examinado em *Leica TCSSP5 confocal microscope* (Leica Microsystems, Bannockburn, IL).

8.3. Microscopia eletrônica de transmissão para verificação da cutícula de operárias injetadas com anti-HEX 70a

As tíbias do 3° par de pernas de operárias recém emergidas tratadas com anticorpo anti-HEX 70a e com NaCl 0,9% na fase Pp (**Tabela I**) foram coletadas e fixadas em solução de glutaraldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, por 1 h em temperatura

ambiente e mais 24 h a 4°C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão cacodilato e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% em PBS₁ e desidratado em série crescente de álcool 30, 50, 70, 90 e 95%, (10 min cada), e 3 vezes em álcool 100% (15 min cada). As amostras foram lavadas por 2 vezes por 10 min cada em óxido de propileno e infiltradas em araldite e óxido de propileno (1:1) por 16 h e em araldite e óxido de propileno (3:1) por 2 h. Posteriormente, foram embebidas em araldite por 16 h, a 60°C, no vácuo. Secções com 0,5 µm de espessura (*Reichert OM-V ultramicrotome*) foram transferidas para lâminas histológicas e coradas com azul de toluidina 2% e examinadas em microscópio de luz para a identificação da área para realização dos cortes ultrafinos (60-70 nm de espessura). Os cortes ultrafinos foram transferidos para telas e contrastados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,3% por 15 min e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão (*Jeol – Jem – 100 cx II electron microscope*).

8.4. SDS-PAGE

8.4.1. Proteínas da hemolinfa, do corpo gorduroso, dos extratos de núcleo e de membranas

O teor de proteínas foi determinado por espectrofotometria (Beckman Coulter – *DTX 880 Multimode Detector*), pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina para construção de curvas padrão. Alíquotas de amostras contendo 1-30 µg de proteínas foram analisadas por SDS-PAGE e alíquotas contendo 5 µg de proteínas foram submetidas a *western blot*. As proteínas foram separadas de acordo com suas massas moleculares por eletroforese em gel de poli(acrilamida) e SDS (dodecil sulfato de sódio), contendo 7,5% da solução de acrilamida/bis-acrilamida. O procedimento baseou-se na descrição de Laemmli (1970), com algumas modificações. O gel de separação, medindo 12 x 10 x 0,09 cm, foi preparado com 2,5 mL de solução de acrilamida (30%)/bis-acrilamida (0,8%), 5 mL de tampão Tris-HCl 0,15 M pH 8,8, 2,3 mL de água destilada, 40 µL de TEMED e 190 µL de persulfato de amônia a 1%. O gel de empilhamento (4,26% de acrilamida/bis-acrilamida) foi preparado com 0,375 mL de acrilamida (30%)/bisacrilamida (0,8%), 1,38 mL de tampão Tris-HCl 0,024M pH 6,8, 0,825 mL de água destilada, 10 µL de TEMED e 51 µL de APS 5%. O tampão usado nas cubas dos eletrodos era composto por 1,515 g de Tris-Base, 7,2 g de glicina, 0,5 g de SDS e 250 mL de água. Diferentes volumes de tampão para amostras (1,51 g de Tris-base, 20 mL de glicerol, 4 g SDS, 10 mL 2-mercaptoetanol, 0,002 g de bromofenol *blue*, água destilada até um volume total de 100 mL, pH 6,75) foram adicionados às amostras, que foram desnaturadas a 100°C por 3 min e aplicadas em gel para migração durante 3 h a 4°C, sob corrente de 15-20 mA,

juntamente com marcadores de massa molecular: Miosina, β -Galactosidase, Fosforilase-B, Albumina sérica bovina, Ovoalbumina e Anidrase Carbônica, com massas moleculares de 205, 116, 97, 66, 45 e 29 KDa, respectivamente.

Terminada a eletroforese, os géis foram corados com: 1) *Coomassie Brilliant Blue R-250* 1%, dissolvido em uma solução contendo etanol, água e ácido acético (5:5:1 v/v); 2) *Coomassie Coloidal* [incubação prévia com fixador (10% ácido acético; 40% etanol absoluto, 50% água milli-Q) por 16 h, e em seguida com 80% de *Coomassie Brilliant Blue G-250* (5,87 mL ácido fosfórico; 50 g sulfato de amônio; 0,5 g *Coomassie Brilliant Blue G-250*; água milli-Q para completar 500 mL de solução) e 20% de metanol] (Neuhoff *et al.*, 1988) ; 3) Nitrato de Prata [incubação prévia com fixador (50% metanol, 10% ácido acético) por 30 min; lavagem com metanol 5% por 15 min; 3 lavagens (5 min cada) com água milli-Q; incubação com tiosulfato de sódio (0,2 g/L gelado) por 2 min; 3 lavagens (30 seg cada) com água milli-Q; incubação com nitrato de prata (0,2 g/100 mL gelado) por 25 min; 3 lavagens (1 min cada) com água milli-Q; revelação com carbonato de sódio (3 g/ 100 mL de carbonato de sódio; 50 μ L/ 100 mL de formaldeído 37%, 2 mL/ 100 mL de tiosulfato de sódio) por no máximo 10 min] (adaptado de Blum *et al.*, 1987).

8.4.2. Proteínas obtidas das cromatografias

Alíquotas de amostras obtidas das cromatografias foram analisadas por SDS-PAGE. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida), contendo gradiente de 6 – 12% da solução de acrilamida (30%)/bis-acrilamida (0,8%) [gel 6% (2 mL de acrilamida/bis-acrilamida, 2,5 mL de tampão Tris-HCl 0,15 M pH 8,8, 5,3 mL de água bidestilada, 0,1 mL de APS 10%, 0,1 mL SDS 10%; 6 μ L de TEMED) gel 12% (4 mL de acrilamida/bis-acrilamida, 2,5 mL de tampão Tris-HCl 0,15 M pH 8,8, 3,3 mL de água bidestilada, 0,1 mL de APS 10%, 0,5 g sacarose, 0,1 mL SDS 10%; 2 μ L de TEMED)].

O gel de empilhamento [5% de acrilamida(30%)/bis-acrilamida (0,8%)] foi preparado com 0,830 mL de acrilamida (30%)/bisacrilamida (0,8%), 0,630 mL de tampão Tris-HCl 1 M pH 6,8, 3,40 mL de água destilada, 5 μ L de TEMED e 50 μ L de persulfato de amônio 10%. O tampão usado nas cubas dos eletrodos era composto por 25 mM de Tris-Base, 192 mM de glicina e 0,1% SDS. Diferentes volumes de tampão para amostras (2 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,8; 2 mL de glicerol; 4 mL SDS 10%; 0,03 g de 100 mM DTT; água milli-Q para completar 10 mL de solução, 0,002g azul de bromofenol) foram adicionados às alíquotas de proteínas. As amostras foram aplicadas em gel para migração durante 3 h a 19°C, sob corrente de 20 mA, juntamente com marcadores de massa molecular: Miosina, β -Galactosidase,

Fosforilase-B, Albumina sérica bovina, Ovoalbumina e Anidrase Carbônica, com massas moleculares de 205, 116, 97, 66, 45 e 29 KDa, respectivamente.

Terminada a eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Coloidal como descrito no item 8.4.1.

8.5. PAGE (não desnaturante)

Alíquotas de frações obtidas das cromatografias foram analisadas em géis de poliacrilamida contendo 5 – 12% da solução de acrilamida/bis-acrilamida. As amostras foram aplicadas em gel para migração durante 3 h a 19°C, sob corrente de 20 mA, juntamente com marcadores de massa molecular: contendo as proteínas tireoglobulina de tireoide bovina, ferritina de baço de cavalo, catalase de fígado bovino, aldolase muscular de coelho e albumina sérica bovina, com massas moleculares de 669, 440, 232, 158 e 67 KDa, respectivamente). Terminada a eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Coloidal.

8.6. Western blot

Nos experimentos de *western Blot*, amostras de proteínas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de PVDF (Bio-Rad, *Immun-Blot® PVDF membrane*), utilizando-se como tampão de transferência: 20 mM Tris, 192 mM Glicina e 20% de etanol absoluto. A transferência ocorreu por 2 h à temperatura ambiente, a 30 V.

Após a transferência as membranas foram coradas com solução de Ponceau (1 g do corante Ponceau em 200 mL de ácido acético 1%), para verificar a eficiência da transferência, e lavadas em água destilada por cinco minutos. As membranas foram incubadas em solução bloqueadora (3,027 g Tris, 0,147 g CaCl₂ e 2,337 g NaCl, pH 8.5, em um volume final de 250 mL, 50 g de leite em pó desnatado e 500 µL de azida sódica 10%, em um volume final de 500 mL) por 16 h, a 4°C, seguida de incubação na mesma solução acrescida de anticorpo primário para a proteína de interesse, sob leve agitação, por 1 h, em temperatura ambiente. Para os diferentes experimentos foram utilizados os seguintes anticorpos primários nas seguintes diluições: 1) Anti-HEX 110 (1:1000); 2) Anti-HEX 70a (1:5000); 3) Anti-HEX 70b (1:1000); 4) Anti-HEX 70c (1:1000).

Posteriormente, as membranas foram lavadas da seguinte forma: 2 lavagens rápidas de 5 min cada e 1 lavagem de 15 min à temperatura ambiente, sob leve agitação, em PBS-Tween (500 µL de Tween em 1 L de PBS 0,2 M, pH 7.2). Após as lavagens, as membranas foram incubadas, por 1 h, com anticorpo secundário (1:12000) em PBS-Tween. O anticorpo secundário utilizado foi: anti-rabbit IgG, *Horseradish Peroxidase-linked whole antibody*, fornecido pelo fabricante do *Kit ECL Western Blotting Detection Reagents and Analysis*

System (Amersham Biosciences). As membranas foram lavadas novamente, sob as mesmas condições descritas acima e, para a detecção do sinal quimioluminescente, foram incubadas em uma mistura dos reagentes de detecção do *Kit ECL*, por 1 min, no escuro. Em seguida, as membranas foram envolvidas em uma folha plástica, colocadas em cassetes e expostas a filmes autorradiográficos (*Kodak® XR-Omat/ Hyperfilm™ MP*, Amersham Biosciences) durante 1-60 min. Os filmes foram revelados e fixados com as soluções GBX da Kodak®.

8.7. Cromatografia Líquida

8.7.1. Filtração em gel

As hexamerinas da hemolinfa de larvas de operárias L5F foram separadas por meio de Cromatografia Líquida por filtração em gel (FPLC), utilizando o cromatógrafo *Pharmacia FPLC System – Liquid Chromatography controller LCC-500*. A FPLC foi realizada em coluna Superdex™200 (10/300 GL; GE Healthcare). O tampão utilizado para a coluna foi Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). Amostras de hemolinfa foram centrifugadas a 12000 rpm (Eppendorf 5415) por 5 min e 100 µL do sobrenadante foi injetado na coluna, submetida a um fluxo de 0,5 mL/min. A presença de proteínas nas frações foi determinada a 280 nm.

8.7.2. Troca-iônica

Uma alíquota de 500 µL das frações 2 e 3 obtidas na cromatografia por filtração em gel foi injetada em coluna *Mono Q™ HR 5/5 anion-exchange column* (FPLC system, Pharmacia), conectada ao aparelho Pharmacia FPLC System – *Liquid Chromatography controller LCC-500 Plus*. Os tampões utilizados no sistema de vasos comunicantes foram: Tris-HCl 50 mM (pH7,5) e Tris-HCl 50 mM (pH7,5) acrescido de 1 M de NaCl. A taxa de fluxo foi de 0,5 mL/min. A presença de proteínas foi determinada a 280 nm.

8.8. Espectrometria de massa

Bandas do gel SDS-PAGE contendo as proteínas de massas moleculares similares às hexamerinas foram lavadas com água milli-Q e descoradas com 50 µL de acetonitrila 50% por aproximadamente 1 h. As bandas foram submetidas a 3 lavagens com 50 µL de NH₄HCO₃ 50 mM e 50 µL de acetonitrila 100%, por 10 min cada. Em seguida, as bandas foram desidratadas no Savant SC110 SpeedVac por 10 min. As amostras foram reduzidas em 50 µL de 10 mM DTT em 100 mM de NH₄HCO₃, por 1 h a 56°C e alquiladas em 50 µL de 55 mM de acrilamida em 100 mM de NH₄HCO₃, por 45 min em temperatura ambiente. Mais duas lavagens foram realizadas com 200 µL de 100 mM de NH₄HCO₃ e 200 µL de acetonitrila 100%, por 10 min cada. Na última lavagem com acetonitrila, as bandas foram maceradas com

pistilo de plástico e colocadas em SpeedVac por 20 min. Aos fragmentos desidratados foram adicionados 10 µL de solução de Tripsina gelada [50 µL de 100 mM de NH₄HCO₃, 2,5 µL de 200 mM de CaCl₂, 1 µL de Tripsina 0,2 µg/µL (Promega), 46,5 µL de água milli-Q]. Após incubação em gelo durante 40 min, o excesso de Tripsina foi retirado e aos fragmentos foi adicionado 10 µL de tampão de digestão (50 µL de 100 mM de NH₄HCO₃, 2,5 µL de 200 mM de CaCl₂, 47,5 µL de água milli-Q) para incubação a 37°C por 16 h.

Em cada amostra digerida, foi adicionado 1 µL de TFA 0,1% para acidificação. Assim, 1 µL de cada amostra foi aplicado no Bruker Anchorchip™ e incubado em temperatura ambiente até secagem completa. Um volume de 0,5 µL de matriz DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid matrix substance for MALDI-MS – Fluka) foi adicionado às amostras que foram incubadas em temperatura ambiente até secagem completa. O chip foi colocado no espectrômetro de massa *Bruker Daltonics AutoflexII Maldi TOF/TOF*. Os picos de tripsina e queratina foram removidos com o uso de *Peptide MIX* (Bruker Daltonics). Os espectros obtidos foram analisados em *Mascot software*, assumindo P<0,05 (Perkins *et al.*, 1999) para busca das proteínas no Banco de Dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

8.9. Teste de ligação de hexamerinas a extratos enriquecidos de membranas de corpo gorduroso

Proteínas extraídas da membrana do corpo gorduroso (item 6.1) foram utilizadas para a identificação dos possíveis receptores de hexamerinas. Para isso, 10 µg do extrato de proteínas de membrana foram submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE 7,5% e as bandas foram transferidas para membrana PVDF. As membranas foram lavadas (3 vezes de 10 min cada) com 50 mL de 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) e 150 mM NaCl e incubadas por 16 h, a 4°C, com 50 mL de tampão de bloqueio [50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2% BSA, 0,2% de *Blocking reagent* (ECL)]. Posteriormente, as membranas foram lavadas (3 vezes de 10 min cada) com tampão de ligação [5 mM MES (pH 6,5), 100 mM NaCl, 8 mM CaCl₂, 24 mM MgCl₂, 0,5% Tween-20 (v/v), 5 mg/mL de BSA] e incubadas a 22°C, por 4 h, com 50 mL do tampão de ligação e 1 mL de hemolinfa. Após esse período, as membranas foram lavadas (3 vezes de 10 min cada) com tampão de bloqueio e incubadas com anticorpo primário das hexamerinas (HEX 110, HEX 70a e HEX 70b) por 1 h. As membranas foram novamente submetidas a 3 lavagens de 10 min com tampão de bloqueio e foram incubadas com anticorpo secundário (1:12000 – anti-rabbit IgG, *Horseradish Peroxidase-linked whole antibody*, fornecido pelo fabricante do *Kit ECL Western Blotting Detection Reagents and Analysis System* - Amersham Biosciences), por 1 h. As membranas foram lavadas novamente (3 vezes de 10 min cada) com tampão de bloqueio e reveladas conforme descrito no item 8.6.

Posteriormente, 10 µg do extrato de proteínas de membrana foram submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE 7,5% e corados com Coomassie Coloidal (ver item 8.4.1). As bandas correspondentes àquelas obtidas por *western blot* foram recortadas, secas em *speed vac* e enviadas para análise por espectrometria de massa (Instituto Pasteur de Montevideú).

8.10. Expressão *in vitro* das hexamerinas em células de *E. coli*

As sequências completas dos genes *hex 110*, *hex 70a*, *hex 70c* e *hex 70c*, foram submetidas a análise no programa *NEBcutter V2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>) para a escolha do melhor vetor de expressão para inserção de cada uma destas sequências. O vetor escolhido foi o pET-28a, que apresenta sítios de restrição para as enzimas *EagI*, *NcoI* e *XbaI*, e ainda carrega uma cauda de histidina tanto na região N-terminal quanto na C-terminal, flanqueadas por sítios para ligação da T7 RNA polimerase. *Primers* específicos foram desenhados nas extremidades 5' e 3' dos genes (**Tabela VI**). Na extremidade 5', o fragmento que contém o peptídeo sinal foi excluído das análises, uma vez que ele é clivado, e um ATG foi adicionado. Na extremidade 3', o stop códon de cada gene foi substituído pelo stop códon da bactéria a ser utilizada para a produção das proteínas.

Tabela VI: Sequência dos *primers* desenhados para expressão *in vitro* das hexamerinas e escolha das enzimas de restrição. Sítios de restrição estão sublinhados.

Nome	Sequência (5'-3')	Enzima de restrição
Hex 70b FWD	ATCTAGAAAATGGTGCCCAACAAGGTCGC	<i>XbaI</i>
Hex 70b REV	ATCCGGCCGTAGCAGAGCAACGTTCAACTCCTC	<i>EagI</i>
Hex 110 FWD	AGCCCATGGTCATGCTGTGCCCCCAACGTCAAAC	<i>NcoI</i>
Hex 110 REV	ATCCGGCCGTAGCTGAGTGATGTCATTGGTGGGT	<i>EagI</i>
Hex 70a FWD	AGCCCATGGTCATGCGGTGCAGAATATTACGACACGAA	<i>NcoI</i>
Hex 70a REV	ATCCGGCCGTAGTAATAAGTGATATTCATATCAAATTCATCC	<i>EagI</i>
Hex 70c FWD	AGCCCATGGTCATGGCCTCCTACGCAGGAAGGC	<i>NcoI</i>
Hex 70c REV	ATCCGGCCGTAGAGTAATTCATACTCTCCTCGTTTG	<i>EagI</i>

8.10.1. Produção do DNA linear

Os *primers* específicos para os genes de interesse foram utilizados em reações de PCR com a enzima *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante (5 μ L PCR *buffer*, 1 μ L dNTP 10 mM, 2 μ L MgSO₄, 36,8 μ L de água destilada, 2 μ L de *primer forward*, 2 μ L de *primer reverse*, 0,3 μ L de *taq High Fidelity*, 1 μ L de cDNA). Para tanto foi utilizado cDNA de larva de operária L4 (**Tabela I**). As reações ocorreram sob as seguintes condições: 94°C por 2 min, seguidos de 30 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s e 68°C por 3 min, e uma extensão final de 4°C. Uma alíquota do produto de PCR foi submetida a eletroforese em gel de agarose 0,8% (em tampão TAE 1X – 0,04 M Tris base, 1 M ácido acético, 50 mM EDTA, pH 8,0) para a confirmação da amplificação e tamanho dos fragmentos. O restante do produto de PCR foi purificado usando o *Kit Illustra™ GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification kit* (GE) e a quantidade de DNA obtida foi quantificada por espectrofotometria (*Nanodrop® ND-1000*, NanoDrop Technologies).

8.10.2. Digestão

A digestão foi realizada tanto para os produtos de PCR purificados quanto para o plasmídeo pET-28a, usando 1,5 μ g de DNA. Para clonagem do gene da HEX 70b, o produto de PCR e o vetor foram digeridos com as enzimas EagI e XbaI. Para as outras hexamerinas foram utilizadas as enzimas EagI e NcoI. Esse processo ocorreu a 37°C por 1 h e em seguida a 65°C por 20 min para inativação das enzimas. O produto obtido foi aplicado em gel de agarose 0,8% (em tampão TAE). As bandas foram recortadas e purificadas (*Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* – Promega). O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (*Nanodrop® ND-1000*, NanoDrop Technologies) e utilizado para a ligação dos genes de hexamerinas aos plasmídeos. A ligação foi feita a 4°C por um período de 16 h.

8.10.3. Transformação

O produto da ligação foi dialisado em água destilada, com o auxílio de um filtro de 0,025 μ m (Millipore), por um período de 20 a 30 min. O produto livre de sais foi coletado e 5 μ L foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* DH5 α por choque térmico e ou por eletroporação. As bactérias crescidas do produto dialisado foram incubadas a 42°C por 2 min e em gelo por 5 min. As bactérias transformadas por eletroporação foram colocadas em cubetas (*Gene Pulser Curvette*, Bio-Rad) e submetidas a um pulso de 2,5 V (*Gene Pulser II e Pulser Controller Plus*, Bio-Rad). Para recuperar as bactérias, 0,5 mL de meio LB líquido, sem antibiótico, foi utilizado para ressuspender as bactérias, que foram deixadas sob leve agitação a 37°C, 190 rpm, por 1 h. As bactérias foram submetidas à centrifugação (13000 rpm por 2

min – Eppendorf 5415 R), 80% do sobrenadante foi descartado e o restante foi utilizado para o plaqueamento em meio LB sólido contendo canamicina (15 µg/µL). As placas de cultivo foram incubadas a 37°C por 16 h. Neste procedimento, só são capazes de crescer bactérias que contenham o vetor recombinado, uma vez que este apresenta o gene de resistência à canamicina como seletor. Os clones foram selecionados, cultivados em meio líquido LB e utilizados para a extração dos plasmídeos. Os plasmídeos recombinantes foram utilizados como molde em PCR para a verificação da presença do inserto, utilizando-se *primers* T7 (*forward* e *reverse*), para amplificação das extremidades dos genes e *primers* específicos dos genes de interesse, para amplificação da região interna dos genes (**Tabelas VI e VII**). Os plasmídeos foram sequenciados para confirmação das sequências e verificar se os genes de interesse estavam na pauta correta de leitura.

Tabela VII: Sequência de *primers* utilizados na PCR de sequenciamento

Nome	Sequência (5'-3')
T7 FWD	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 REV	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
Hex 110 0R	CTCGTGAATCCAAGTGATGT
Hex 110 1F	GTTGCTGCTGTATTAACG
Hex 110 1R	CAGTTCCTCAATCAGATCAC
Hex 110 2F	GTCCTCAGAATCTTCAACTTC
Hex 110 2R	ATGGTCGTGTTGGGTCCAA
Hex 110 3F	TACTGGTCACCAATCCCAAC
Hex 110 3R	TGGCCTACAGGATTCTGGAT
Hex 110 4F	GGCGGAGGAATTCAGCAAAA
Hex 110 4R	CATAGGGGACGTTTCATTCCT
Hex 110 5F	TCCGTAAGGATTAGG
Hex 70a 1R	ATCAGAGCGTGATTGGCTTT
Hex 70a 2F	CTCTCTGGGCGAAGAACAAC
Hex 70a 2R	ACCAGAATCGATTGCTGCCG
Hex 70a 3F	GAGAATATCGGCAGCAATCG
Hex 70a 3R	CAGTTTGTGATGCGAATCGT
Hex 70a 4F	TGAAGAGCAAAGAAACGATGA
Hex 70c 1R	GGGATAGATCTCGTAGATGG
Hex 70c 2F	TTACAAAACGCGCTTGGG
Hex 70c 2R	ATCCAGAATTGATGGGCTTG
Hex 70c 3F	GCCCAAAGAAATACGTGGAC
Hex 70b F	ATCCGCTCTTCAAATGTGGTCTAC
Hex 70b R	GTGTTGCTCCGCTTTTCAGG

8.10.4. Preparo das células competentes *E. coli* de linhagens DH5 α e BL21

As linhagens DH5 α e BL21 de *E. coli* estocadas a -70°C foram inoculadas em 5 mL de meio LB a 37°C e 180 rpm por cerca de 16 h. Uma fração de 200 μ L deste cultivo líquido foi utilizado para inocular 50 mL de meio LB a 37°C sob agitação a 230 rpm até atingir densidade óptica (D.O.) de 0,5 - 0,6 em comprimento de onda de 600 nm. As células foram mantidas em gelo por 30 min e centrifugadas a 5000 rpm (Eppendorf 5415 R) por 5 min a 4°C.

Para as células utilizadas para transformação por choque térmico, o precipitado foi ressuspendido cuidadosamente em 5 mL de CaCl₂ 0,1 M e submetido a uma nova centrifugação de 5000 rpm (Eppendorf 5415 R) por 5 min a 4°C. O precipitado foi ressuspendido cuidadosamente em 5 mL de CaCl₂ 0,1M acrescido de glicerol (15%), aliquotado (250 μ L por tubo) e estocado à -70°C. Já para as bactérias utilizadas para transformação por eletroporação, o precipitado foi ressuspendido cuidadosamente em 5 mL de água milli-Q e submetido a uma nova centrifugação de 5000 rpm (Eppendorf 5415 R) por 5 min a 4°C. O precipitado foi ressuspendido cuidadosamente em glicerol (80%), aliquotado (250 μ L por tubo) e estocado à -70°C.

8.10.5. Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger utilizando reação com *big dye* (Perkin Elmer). Nestas reações foram usados 2 μ L de *big dye*, 2 μ L de tampão de sequenciamento, 2 μ L de plasmídeo com os insertos, 3 μ L de água estéril e 1 μ L de *primer forward* ou 1 μ L de *primer reverse* (Tabelas VI e VII), resultando em um volume final de 10 μ L de reação. As amplificações ocorreram em 25 ciclos de 96°C - 10 s, 50°C - 5 s e 60°C - 4 min. Os produtos das reações para *hex 70b* foram precipitados por isopropanol 75%, ressuspendidos em *Hi-dye Formamide* (Applied Biosystems), desnaturados a 94°C por 2 min e submetidos a eletroforese capilar em aparelho *ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Os produtos das reações para *hex 110*, *hex 70a* e *hex 70c* foram purificados em *Sephadex (Illustra™ Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade, GE Healthcare)* com colunas *Multiscreen HV* (Millipore) e centrifugação a 2300 rpm (Eppendorf 5810 R) por 5 min. Os produtos purificados foram aquecidos a 95°C por aproximadamente 15 min até secagem total. Os produtos das reações foram ressuspendidos em *Hi-dye Formamide*, desnaturados a 94°C por 2 min e submetidos à eletroforese capilar em aparelho *ABI 3730 DNA Analyser* (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas por meio do programa *Sequencher™ version 4.7 for Windows* (Gene Codes Corporation) que avalia as sequências pela qualidade

dos eletroferogramas gerados pelo seqüenciador, com posterior anotação destas sequências no genoma, com o auxílio da plataforma Artemis 7.0 (Rutherford *et al.* 2000).

8.10.6. Preparo das linhagens de expressão

Os plasmídeos de expressão contendo os genes de interesse foram utilizados para transformar células competentes de *E.coli* da linhagem de expressão BL21, do mesmo modo descrito no item 8.11.3 para as bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α .

8.10.7. Produção das proteínas

Os clones foram pré-inoculados em LB líquido contendo 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de canamicina e incubados *overnight* a 37°C e 170 rpm de agitação. Os pré-inóculos foram quantificados a 600 nm e utilizados para inocular 100 mL de meio LB contendo canamicina, de forma a se obter uma DO inicial de 0,2. Os meios foram incubados a 37°C e 170 rpm até atingir uma DO entre 0,6 e 0,8. Neste momento, 1 mM de IPTG foi adicionado aos meios de cultivo que foram deixados a 37°C, 170 rpm, por 3 h. Os meios foram centrifugados a 5000 rpm (Eppendorf 5415 R) por 10 min. Os *pellets* obtidos foram lavados em água milli-Q e centrifugados novamente a 5000 rpm (Eppendorf 5415 R) por 10 min. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram estocados a -20°C até o momento de uso.

8.10.8. Purificação das proteínas

Os *pellets* foram ressuspensos em 15 mL de *start buffer* [10 mL de tampão fosfato 200 mM (19 mL de fosfato de sódio monobásico 0,2 M; 81 mL de fosfato de sódio dibásico 0,2 M; água milli-Q para um volume final de 200 mL, pH 7,4), 12,5 mL de NaCl 4M, 1 mL de imidazol 2M, água milli-Q até completar o volume para 100 mL] e 300 μL de inibidor de protease 50 mM. A solução obtida foi sonicada, a 4°C, com 30% de amplitude em 4 ciclos de 30 s de homogeneização com a macroponta e 30 s de repouso, seguidos de 16 ciclos com a microponta. O homogeneizado foi incubado com estreptomicina 10 %, sob agitação, a 4°C, por 20 min, e centrifugado a 15000 rpm (Eppendorf 5415 R), por 45 min. O sobrenadante obtido foi filtrado em Millex®GP de 0,22 μm (Millipore). O *pellet* foi ressuspensado em 1 mL de água milli-Q. Com o auxílio de uma coluna *HiTrap™chelating HP* (GE Healthcare) de 1 mL, as proteínas presentes no filtrado foram purificadas e submetidas a gel SDS-PAGE 9%, juntamente com uma alíquota do *pellet* que foi ressuspensado, para confirmação da expressão das proteínas e sua solubilidade. Os géis foram corados com Coomassie R-250.

Resultados

I – Aspectos da multifuncionalidade das hexamerinas

1. Dinâmica do acúmulo das subunidades de hexamerinas no corpo gorduroso e hemolinfa durante o desenvolvimento

A expressão das 4 hexamerinas na hemolinfa e no corpo gorduroso foi analisada por *western blots* em pontos críticos do desenvolvimento (**Fig. 4**). Ficou evidente a existência de grandes quantidades de todas as hexamerinas na hemolinfa de larvas L5F quando comparada ao corpo gorduroso na mesma fase do desenvolvimento, sugerindo fortemente intensa secreção destas proteínas para a hemolinfa. Nas fases seguintes, L5S e PP, a abundância de todas as hexamerinas aumenta no corpo gorduroso. De tudo o que se sabe sobre o intercâmbio das hexamerinas entre o corpo gorduroso e a hemolinfa, este aumento denota que elas estão retornando para o corpo gorduroso via sequestro da hemolinfa. Da fase L5S para as fases de adultos faratos (Pb, Pbm), as hexamerinas permanecem relativamente abundantes no corpo gorduroso (sendo a HEX 110 a menos abundante). Exceto para a HEX 70a, a abundância de todas as hexamerinas no corpo gorduroso diminui para níveis indetectáveis antes da ecdise adulta. HEX 70a é a única que está presente na hemolinfa das operárias adultas, inclusive nas forrageiras. O padrão de diminuição de HEX 70b, HEX 70c e HEX 110 na hemolinfa é consistente com a função de reserva de aminoácidos para o desenvolvimento pupal e adulto farato.

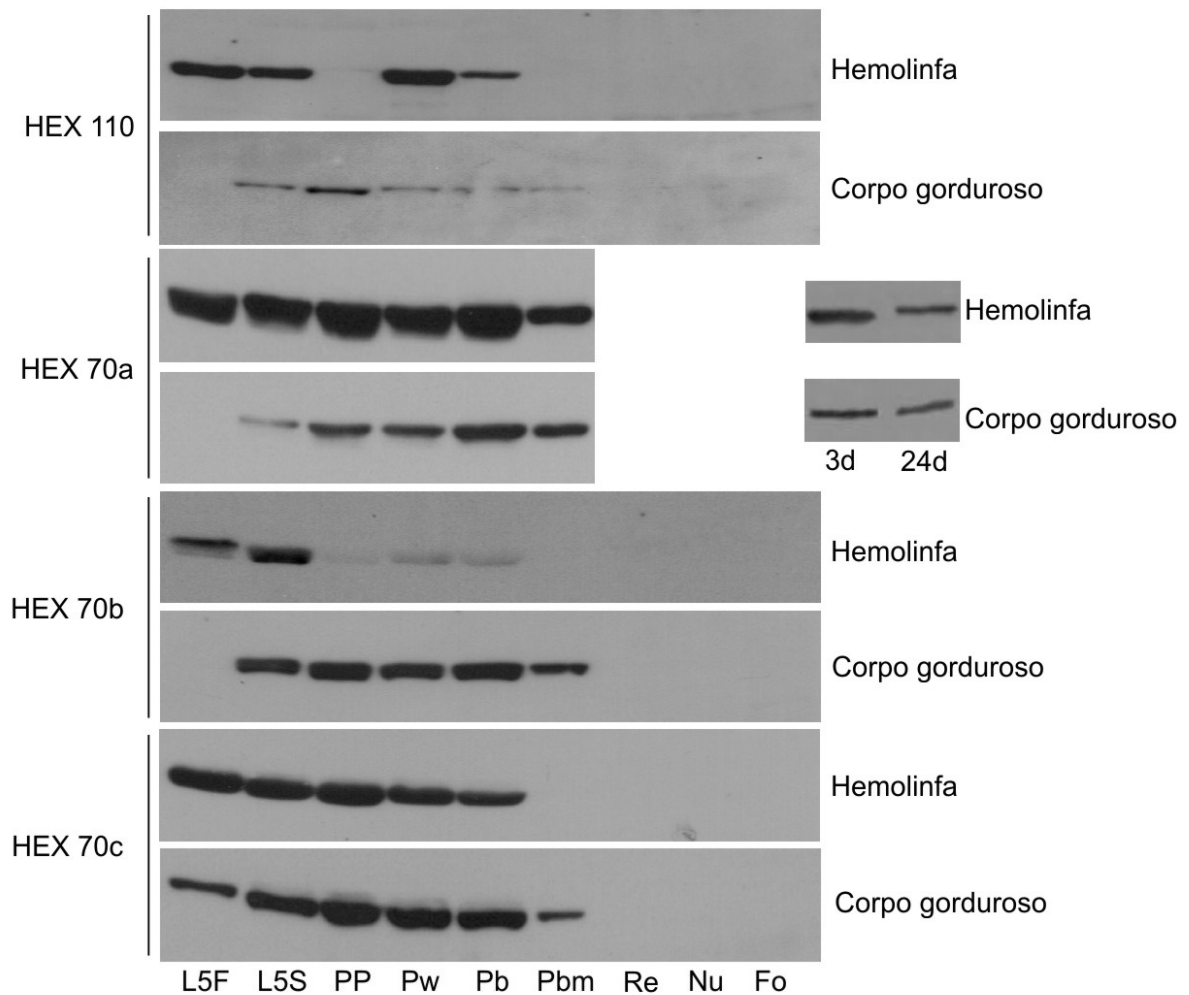


Figura 4: Análise por *western blot* das hexamerinas da hemolinfa e corpo gorduroso durante o desenvolvimento de operárias. L5F e L5S: fases de alimentação e de tecelagem do casulo de larvas do 5º instar. PP: pupas faratas. Pw: pupas. Pb, Pbm: fases sucessivas de adultas faratas. Re: adulta recém-emergida. Nu: nutridoras. Fo: forrageiras. O *western blot* relativo à hexamerina HEX 70a de operárias adultas com 3 e 24 dias de idade foi extraído de Martins *et al.* (2008).

2. Detecção das hexamerinas no núcleo das células do corpo gorduroso

É de conhecimento geral que as hexamerinas se acumulam em grânulos no citoplasma das células do corpo gorduroso. Aqui investigamos se estas proteínas estariam também presentes em extratos de núcleos. Todas as hexamerinas foram detectadas na fração nuclear obtida do corpo gorduroso, como demonstrado por SDS-PAGE e *western blot* usando anticorpos específicos (**Fig. 5**).

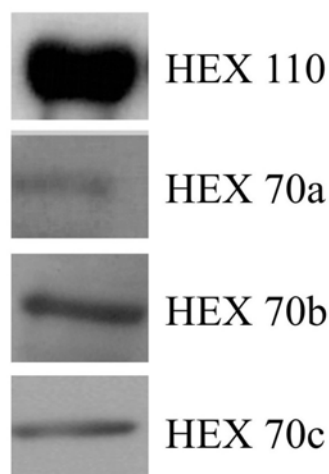


Figura 5: Hexamerinas detectadas por *western blot* em extratos enriquecidos de núcleos de células do corpo gorduroso

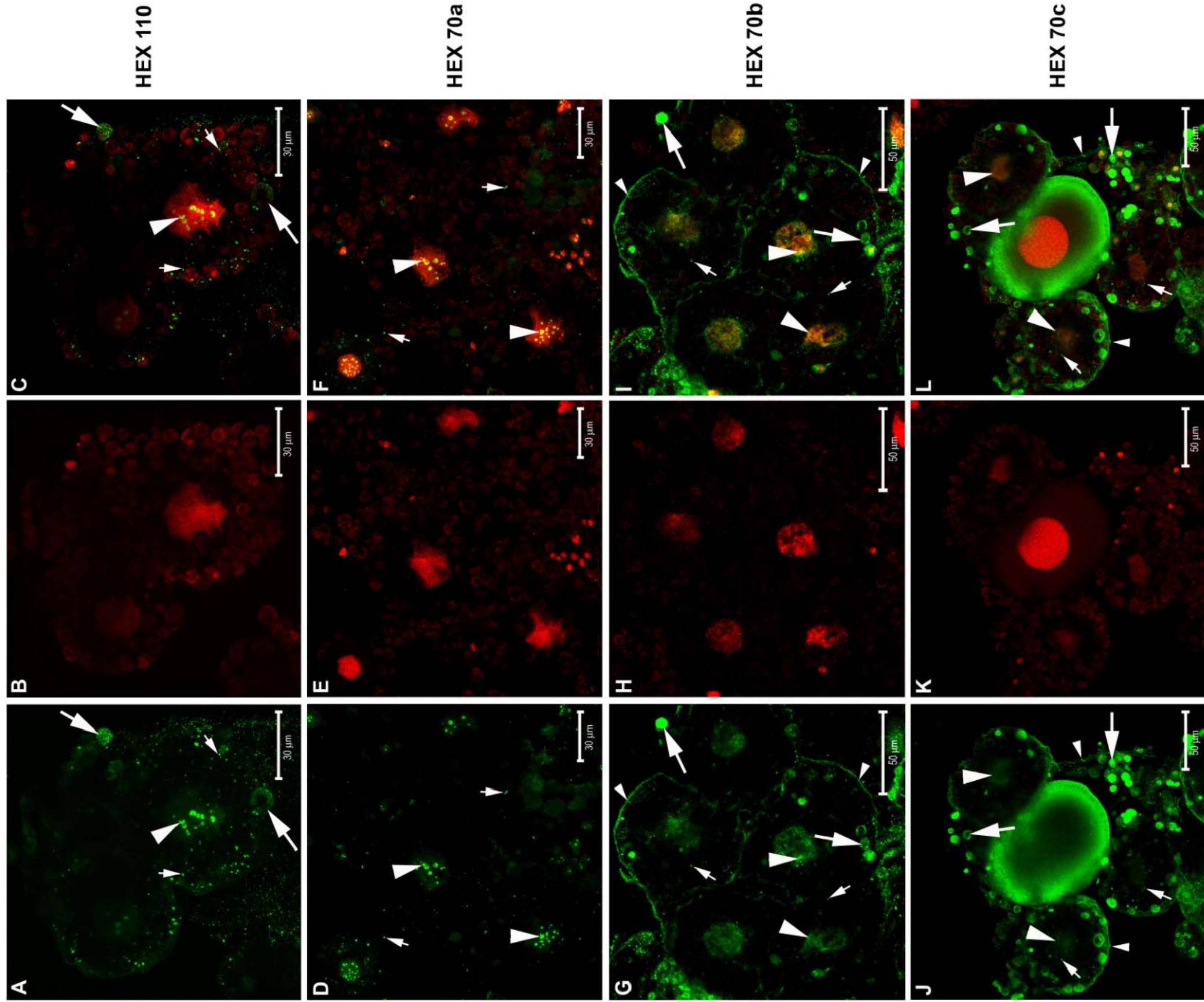
3. Imunolocalização das hexamerinas no citoplasma e no núcleo das células do corpo gorduroso

A utilização de anticorpos específicos e microscopia confocal permitiu localizar as hexamerinas nos trofócitos e enócitos do corpo gorduroso.

Nos trofócitos, HEX 110 (**Fig. 6A-C**), HEX 70a (**Fig. 6D-F**), HEX 70b (**Fig. 6G-I**) e HEX 70c (**Fig. 6J-L**) localizam-se no núcleo e citoplasma. A localização nuclear de HEX 110 (**Fig. 6A, C**) e HEX 70a (**Fig. 6D, F**) foi mais evidente do que a localização nuclear de HEX 70b (**Fig. 6J, L**). As quatro hexamerinas localizam-se como densos grânulos de diferentes tamanhos, ou como grandes inclusões citoplasmáticas. Nos trofócitos mostrados na **Fig. 6G**, HEX 70b localiza-se na superfície celular. De forma peculiar, os trofócitos incubados com anti-HEX 70b (**Fig. 6G**) e anti-HEX 70c (**Fig. 6J**) mostram grandes grânulos de diferentes densidades próximos à superfície celular, sugerindo que são derivados da endocitose das hexamerinas.

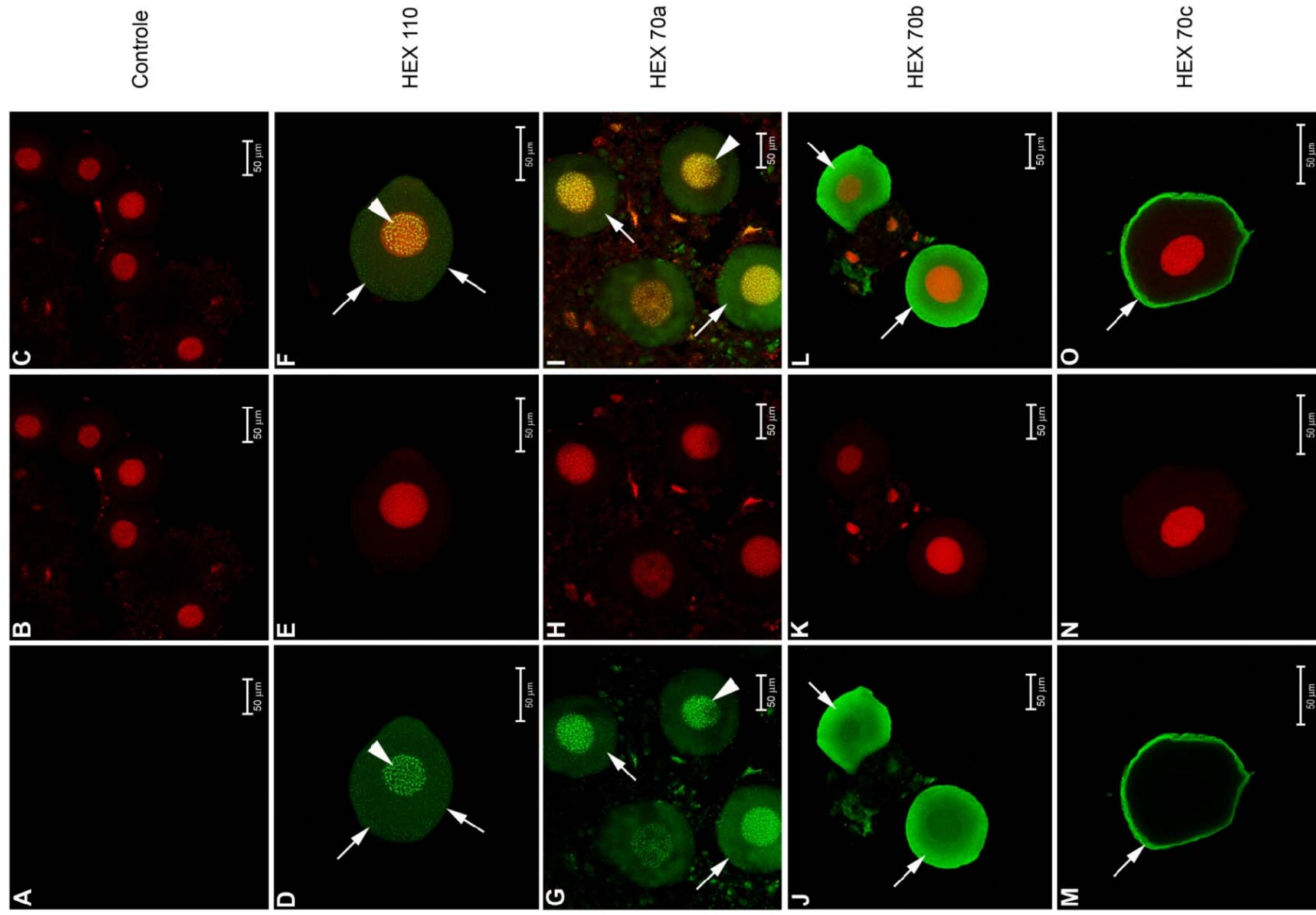
Uma profusão de inclusões (em vermelho) foi observada no citoplasma dos trofócitos corados com iodeto de propídeo (**Fig. 6B, E, H, K** e suas respectivas sobreposições **6C, F, I, L**). Iodeto de propídeo é um corante comumente utilizado para marcação do DNA nuclear, mas também se liga ao RNA. As inclusões no citoplasma dos trofócitos, marcada em vermelho por iodeto de propídeo, aparentemente são vacúolos autofágicos contendo DNA e RNA ribossomal, produtos remanentes de mitocôndrias e da reciclagem de retículo endoplasmático rugoso (RER). As inclusões em vermelho no citoplasma dos trofócitos (**Fig. 6B, E, H e K**) também são caracterizadas pela presença de uma região central sem marcação.

Figura 6: Microscopia confocal para localização das hexamerinas nos trofócitos de pupas faratas (PP). Trofócitos marcados com Alexa Fluor 488: preparações utilizando-se (A) anti-HEX 110, (D) anti-HEX 70a, (G) anti-HEX 70b e (J) anti-HEX 70c para detecção das respectivas hexamerinas (marcação em verde). (B, E, H, K) Núcleos corados com iodeto de propídeo (vermelho). Na coluna da direita as imagens sobrepostas mostram: (C) HEX 110, (F) HEX 70a, (I) HEX 70b e (L) HEX 70c nos núcleos (amarelo) e no citoplasma (verde). As pontas de setas maiores mostram a localização nuclear das hexamerinas. As pontas de setas menores mostram hexamerinas em pequenos grânulos próximos da superfície celular. As setas maiores mostram hexamerinas em grandes grânulos citoplasmáticos. As setas menores mostram hexamerinas em pequenos grânulos citoplasmáticos. A célula no centro das Figuras J, K e L é um enócito.



Hexamerinas também foram localizadas nos enócitos (**Fig. 7A-O**). A **Fig. 7A-C** mostra preparações de enócitos sem o anticorpo específico (primário), as quais constituem os controles do procedimento de imunolocalização, que também servem de controles para as preparações da **Fig. 6**. Os padrões de imunolocalização de HEX 110 (**Fig. 7D-F**) e HEX 70a (**Fig. 7G-I**) são similares: estão presentes no núcleo e também dispersas no citoplasma. Marcação para as outras duas hexamerinas, HEX 70b (**Fig. 7J-L**) e HEX 70c (**Fig. 7M-O**) foi observada exclusivamente no citoplasma dos enócitos, e a localização de HEX 70c está limitada ao citoplasma periférico.

Figura 7: Microscopia confocal para a localização das hexamerinas nos enócitos de pupas faratas (PP). Enócitos marcados com Alexa Fluor 488: preparações (A) sem o anticorpo primário específico (controle) ou com (D) anti-HEX 110, (G) anti-HEX 70a, (J) anti-HEX 70b ou (M) anti-HEX 70c para a localização das respectivas hexamerinas (marcação em verde). (B, E, H, K, N) Núcleos corados com iodeto de propídeo (vermelho). Na coluna da direita as imagens sobrepostas mostram: (C) controle sem o anticorpo, (F) HEX 110 e (I) HEX 70a nos núcleos (amarelo) e no citoplasma (verde), (L) HEX 70b no citoplasma (verde), (O) HEX 70c na periferia do citoplasma (verde). As pontas de setas mostram a localização nuclear e as setas mostram a localização citoplasmática das hexamerinas.



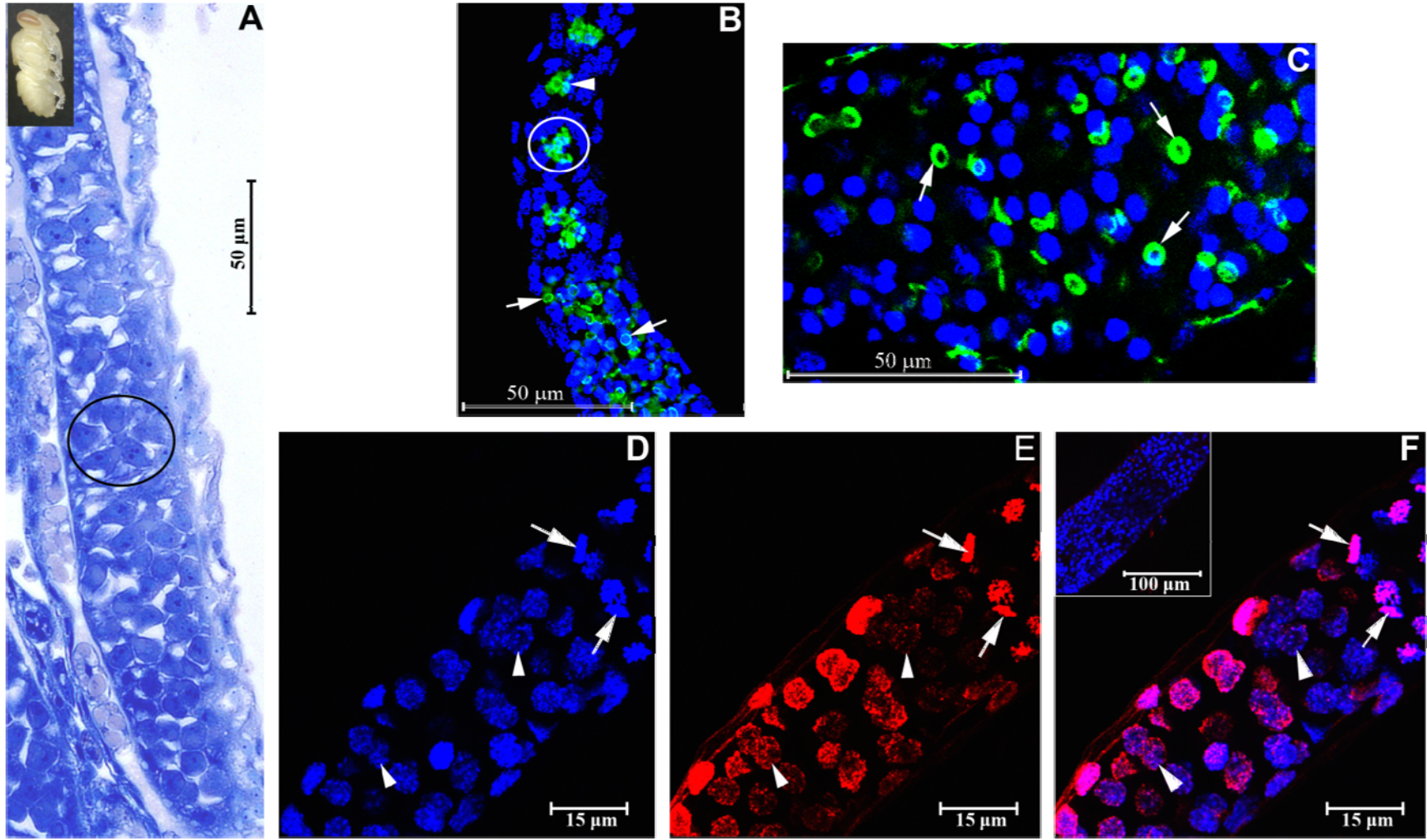
4. Hexamerinas nas gônadas

4.1. Imunolocalização da HEX 70a no núcleo das células ovarianas de operárias adultas-faratas

O estudo dos ovários de operárias adultas faratas foi realizado a partir de cortes histológicos corados com azul de metileno e fucsina básica (**Fig. 8A**), e visualização de ovariolos inteiros, por microscopia confocal, através da marcação de F-actina com rodamina/faloidina (**Fig. 8B, C**). A hexamerina HEX 70a foi localizada por imunodeteção com anti-HEX70a/Cy3 (**Fig. 8E, F**). DAPI foi utilizado para marcar os núcleos das células ovarianas e facilitar a visualização dos ovariolos (**Fig. 8B, C, D, F**). No estágio inicial do desenvolvimento do adulto farato (1 dia após a ecdise pupal), cada ovariolo consiste de um filamento terminal (não mostrado) e um germário proximal. No germário, as células da linhagem germinativa, ou cystócitos, estão começando a ser arranjadas em estruturas denominadas rosetas (uma delas marcada com uma circunferência na **Fig. 8A**). Cada roseta é um clone formado por vários cystócitos derivados de um único cystoblasto (ovogônia) e dará origem a um único ovócito e aos trofócitos que o acompanham, ou células nutridoras. Para melhor visualizar a estrutura do ovariolo neste estágio do desenvolvimento, foi utilizada rodamina/faloidina para detectar a F-actina, e DAPI para marcar os núcleos das células ovarianas. Na região proximal do germário (parte superior da **Fig. 8B**) pode-se visualizar um denso complexo de actina, típico da região do polifusoma no centro de cada roseta de cystócitos (pontas de seta na **Fig. 8B**). Na região mais distal do germário (parte inferior da **Fig. 8B, C**) os polifusomas foram convertidos em canais em anel (setas nas **Fig. 8B, C**) que permitem a comunicação entre as células da linhagem germinativa, i.e., entre as células destinadas a serem ovócitos e as células nutridoras associadas. Ovariolos com estas características estruturais, como detalhado nas **Fig. 8A–C**, foram preparados para a detecção da hexamerina HEX 70a com anti-HEX 70a/Cy3. A **Fig. 8D** mostra uma região proximal do germário de um ovariolo marcado com DAPI. A **Fig. 8E** ilustra a mesma região do ovariolo onde a marcação da HEX 70a pode ser visualizada (uma sobreposição das imagens é mostrada na **Fig. 8F**). O inserto na **Fig. 8F** representa um ovariolo controle incubado com soro pré-imune e corado com DAPI e Cy3. Comparações entre as **Fig. 8D–F** revelam que a HEX 70a está localizada no núcleo das células germinativas (cystócitos), aparentemente em associação com a cromatina (pontas de seta nas **Fig. 8D–F**). As células foliculares (células somáticas) presuntivas não estão muito evidentes neste estágio, mas foram indicadas por setas

nas **Fig. 8D–F**. Assim como os núcleos das células germinativas, os núcleos das células somáticas mostram marcação para a HEX 70a.

Figura 8: Detecção da HEX 70a nos ovários de operárias no início do desenvolvimento adulto farato (1 dia após a ecdise pupal, o estágio de desenvolvimento está ilustrado na região superior esquerda da figura). **(A)** Microscopia de luz dos ovários (cobertos por suas respectivas bainhas peritoneais) corados com azul de metileno e fucsina básica. Somente o germário está representado na figura (a região mais anterior do ovário, ou filamento terminal, não é mostrada). Uma roseta formada por células da linhagem germinativa (precursoras dos ovócitos e células nutridoras) é ressaltada por uma circunferência no germário. **(B, C)** Imagens de microscopia confocal com marcação da F-actina por rodamina/faloidina (verde) e núcleos das células marcados com DAPI (azul) mostram aspectos estruturais dos ovários (a bainha peritoneal foi removida). Os polifusomas ricos em actina (pontas de seta em **B**) são visualizados no centro das rosetas de células na região proximal do germário. Canais em anel derivados dos polifusomas (setas em **B** e **C**) estão aparentes na região distal do germário mostrado em **B** e em um maior aumento em **C**. **(D)** Microscopia confocal de um ovário (porção proximal do germário) marcado com DAPI. **(E)** HEX 70a detectada com anti-HEX 70a/Cy3 (vermelho). **(F)** Sobreposição das imagens **D** e **E**. O inserto em **F** mostra um ovário “controle” (porção proximal do germário) incubado com soro pré-imune e subsequentemente marcado com Cy3/DAPI. Pontas de seta em **D-F** mostram os núcleos das células de linhagem germinativa. Setas em **D-F** apontam para os núcleos dos precursores das células foliculares. Em todas as figuras, a porção proximal do germário está orientada para cima.

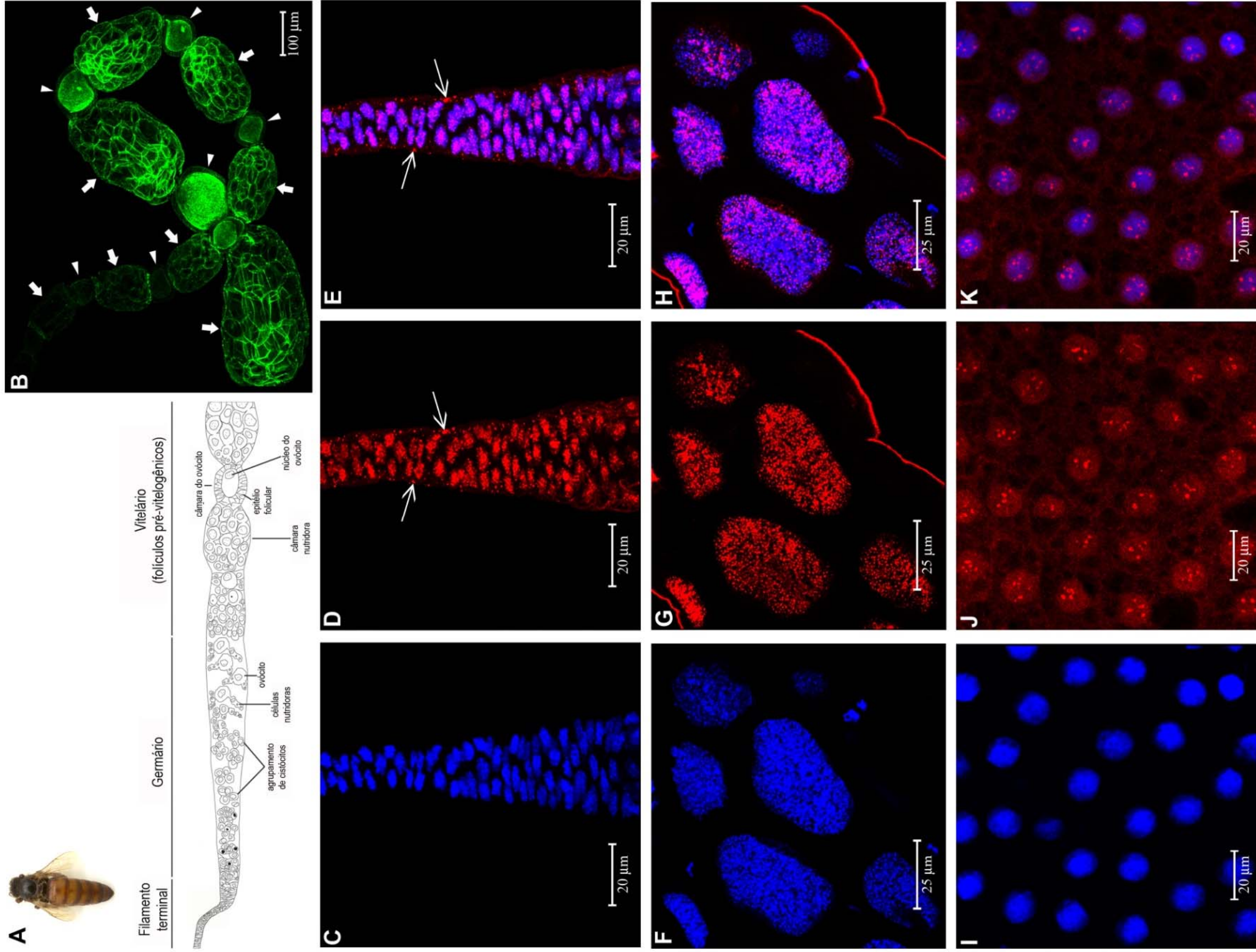


4.2. Imunolocalização de HEX 70a nos ovários de rainhas ovipositoras

HEX 70a também foi localizada nos ovários de rainhas adultas. A **Fig. 9A** mostra uma representação esquemática de um ovário de rainha ovipositora. O ovário consiste de uma estreita região distal, o filamento terminal, uma região intermediária, ou germário, e uma região proximal, o vitelário. O filamento terminal contém células somáticas e putativas células-tronco de linhagem germinativa (Tanaka e Hartfelder, 2004). Os aglomerados de células são observados na região proximal do germário, e na região distal é possível visualizar os ovócitos em crescimento associados com as células nutridoras poliplóides. Na região proximal do vitelário (**Fig. 9A**), são visíveis as câmaras de células nutridoras e do ovócito formando os folículos pré-vitelogênicos. A região basal do vitelário é a maior região do ovário (**Fig. 9B**) e consiste de uma sequência de ovócitos em crescimento envolvidos por uma camada de células foliculares (pontas de seta), e intercalados com câmaras de células nutridoras (setas). Nesta região, os ovócitos atingem o máximo de seu tamanho, as células nutridoras entram em colapso, o córion é formado e o ovo é finalmente liberado no oviduto.

As **Fig. 9C-K** mostram a localização de HEX 70a nos ovários. Na região distal do filamento terminal (**Fig. 9C-E**), HEX 70a está fortemente associada aos núcleos das células, mas também se localiza no citoplasma das células do filamento (**Fig. 9D, E**, setas). HEX 70a também foi localizada nos núcleos das células nutridoras (**Fig. 9F-H**) e das células foliculares (**Fig. 9I-K**), que recobrem o ovócito. Em ambos os tipos celulares, HEX 70a é exclusivamente intranuclear. Os *foci* de HEX 70a assemelham-se a pontos pequenos e são distribuídos por todo o núcleo das células nutridoras poliplóides e são maiores e concentrados em áreas nucleares bem definidas nas células foliculares em proliferação.

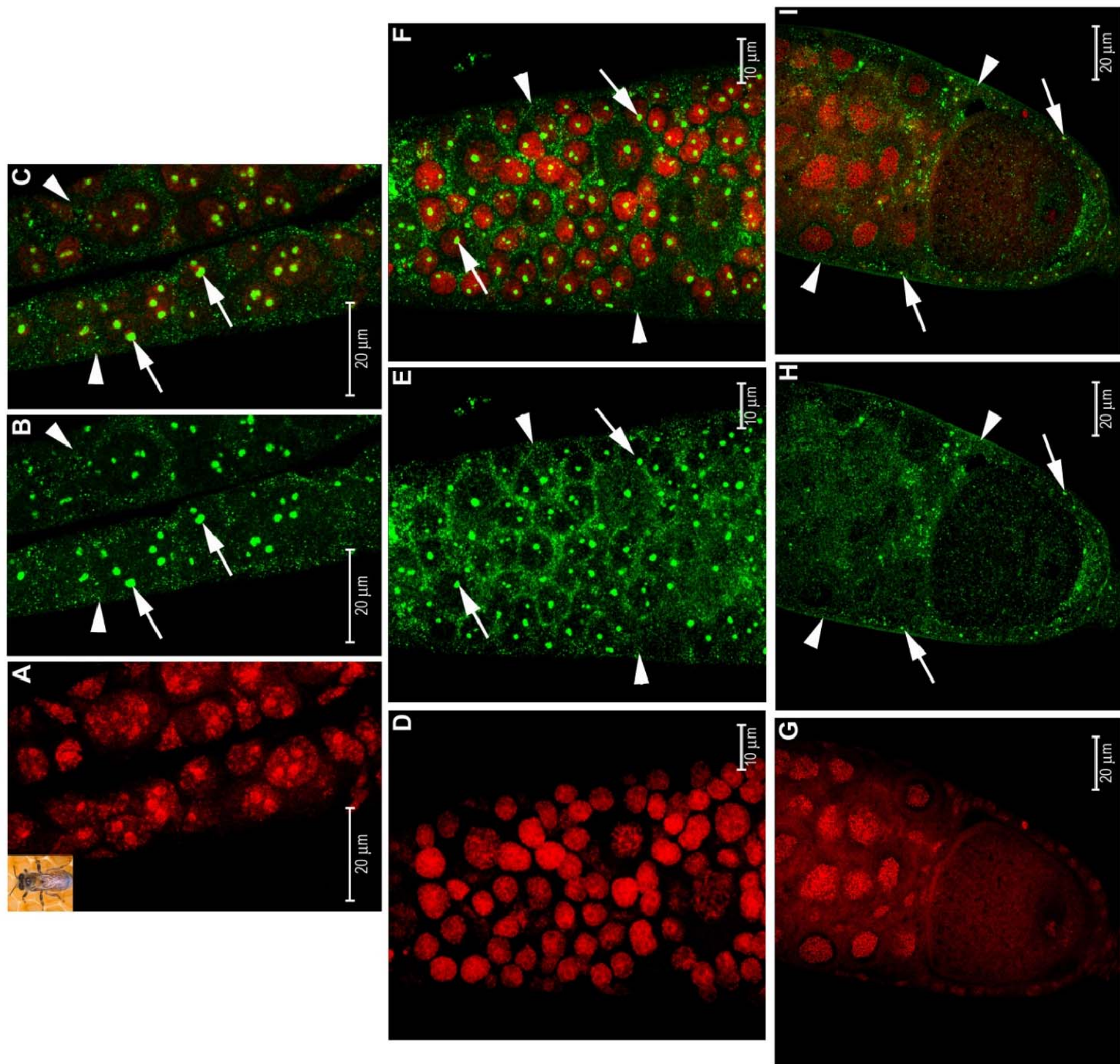
Figura 9: Imunolocalização de HEX 70a nos ovários de rainhas ovipositoras. **(A)** Representação esquemática de um ovário de rainha ovipositora (mostrada na margem esquerda superior): somente o filamento terminal, o germário e os folículos pré-vitelogênicos na região proximal do vitelário são mostrados em **A**. Imagens de microscopia confocal: **(B)** Parte de um ovário mostrando as regiões intermediária e distal do vitelário marcado com rodamina/faloidina (verde) para visualização da F-actina. As setas e pontas de seta mostram o desenvolvimento das câmaras de células nutritoras e de ovócitos, respectivamente. **(C–E)** O filamento terminal (a região distal está orientada para baixo) contém HEX 70a nos núcleos de suas células **(D, E)** e no citoplasma (setas em **D, E**). **(F–H)** Núcleos das células nutritoras (região distal do vitelário como indicado pelas setas em **B**). **(I–K)** Núcleos das células foliculares que recobrem um ovócito na região distal do vitelário (como indicado pelas pontas de seta em **B**). **(C, F, I)** Núcleos das células marcados com DAPI (azul); **(D, G, J)** Marcação com anti-HEX 70a/Cy3 para detecção de HEX 70a (vermelho) e **(E, H, K)** sobreposição das imagens.



4.3. Imunolocalização da hexamerina HEX 110 em ovários de operárias adultas e rainhas ovipositoras

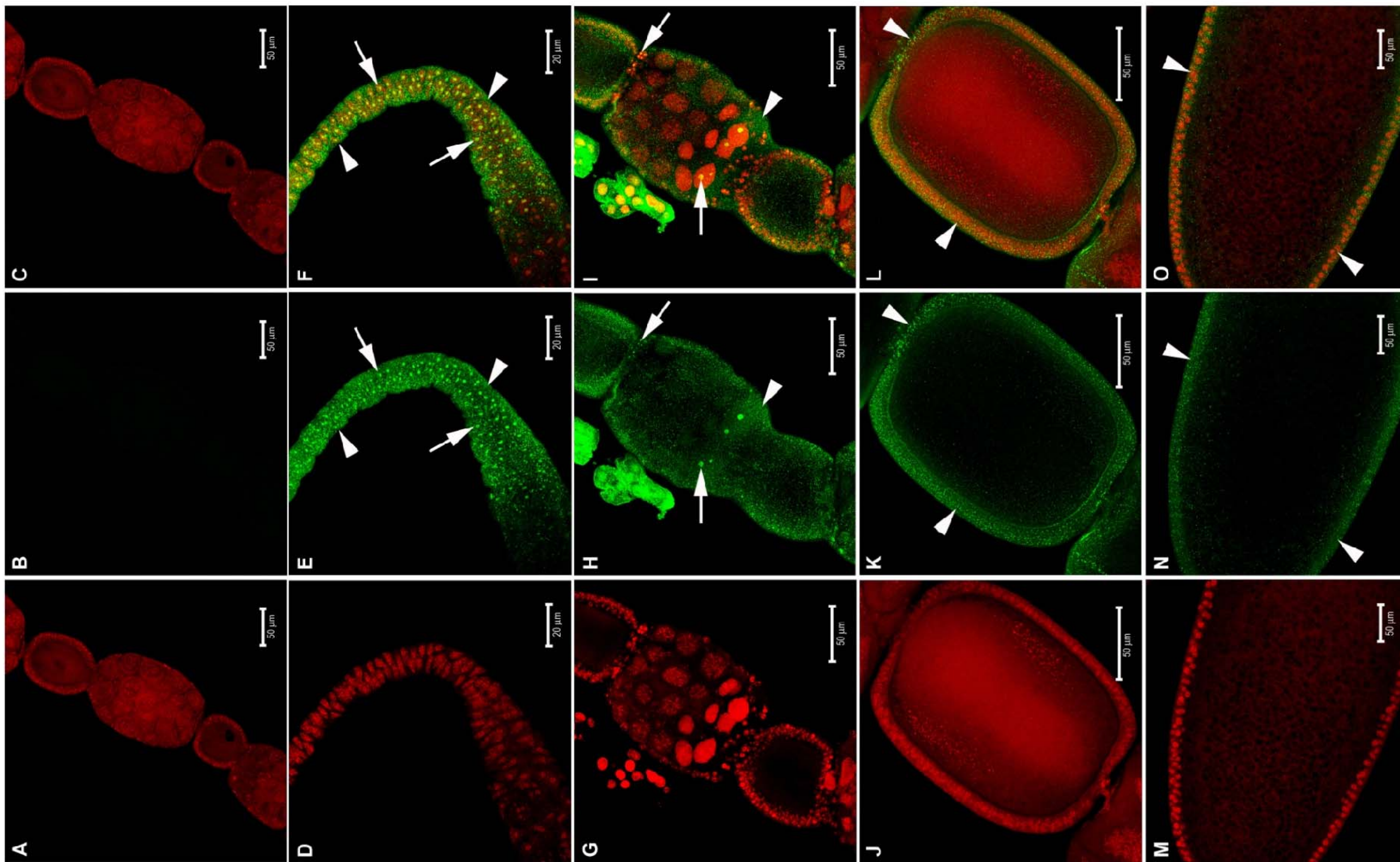
Em ovários de operárias adultas (**Fig. 10**), com aproximadamente 7 dias de idade, marcados com anti-HEX 110/Alexa Fluor 488 (verde) foi possível detectar HEX 110 nos núcleos (setas) da região proximal do filamento terminal (**Fig. 10A, B e C**) e da região distal do germário (**Fig. 10D, E e F**). Em ambas regiões, os *foci* nucleares de HEX 110 foram visualizados tanto nas células germinativas quanto nas células somáticas. HEX 110 também se localiza no citoplasma das células do filamento terminal e do germário (pontas de seta) (**Fig. 10A-F**). Na região pré-vitelogênica (**Fig. 10G, H, I**), a hexamerina HEX 110 está presente no núcleo das células foliculares e no citoplasma tanto das células somáticas quanto das germinativas.

Figura 10: Detecção de HEX 110 nos ovários de operárias adultas com 7 dias de idade (estágio do desenvolvimento mostrado na margem esquerda superior). (**A, B, C**) Filamento terminal (a região distal está orientada para baixo). (**D–F**) Porção proximal do germário. (**G–I**) Porção distal do germário. (**A, D, G**) Núcleos das células marcados com iodeto de propídeo (vermelho); (**B, E, H**) Marcação com anti-HEX 110/Alexa Fluor 488 para detecção de HEX 110 (verde) e (**C, F, I**) sobreposição ds imagens. Setas indicam a marcação nuclear. Pontas de seta indicam marcação citoplasmática.



Em rainhas ovipositoras, a localização da hexamerina HEX 110 é peculiar às regiões do ovariolo (**Fig. 11**). As preparações dos controles (**Fig. 11A, B e C**), não incubados com o anticorpo primário, demonstram a especificidade da marcação, uma vez que nenhum sinal de fluorescência foi observado. Nas regiões proximal do filamento terminal e do germário, a hexamerina HEX 110 tem localização intranuclear e citoplasmática (**Fig. 11D, E e F**). Isto não foi observado na região do vitelário, uma vez que nas câmaras nutridoras, apenas os núcleos proximais apresentam marcação para HEX 110 (**Fig. 11G, H e I**). No folículo em desenvolvimento (**Fig. 11J, K e L**) e no folículo maduro (**Fig. 11M, N e O**), a HEX 110 se localiza no citoplasma das células foliculares.

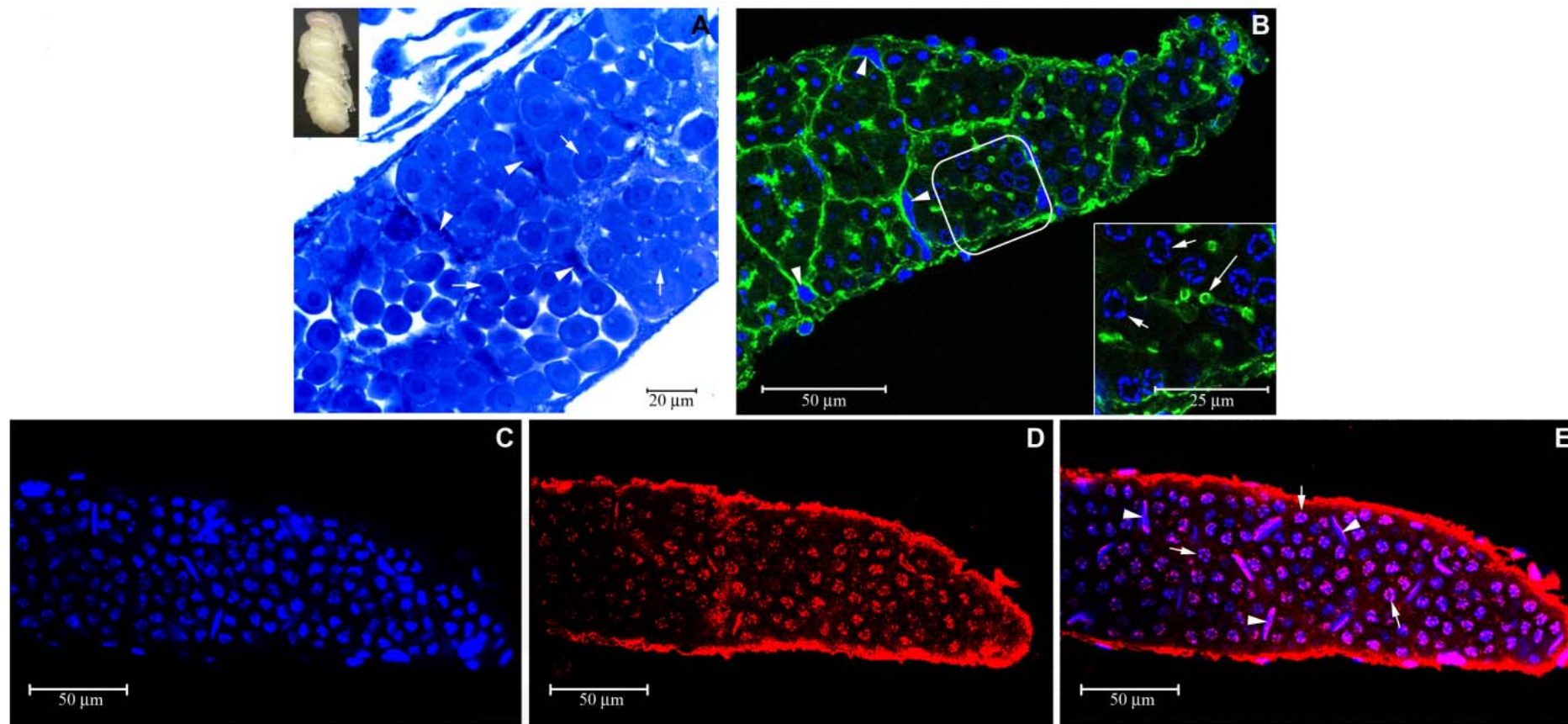
Figura 11: Imunolocalização de HEX 110 nos ovários de rainhas ovipositoras. (A, B, C) Preparações controles. Parte do vitelário de um ovaríolo preparado sem o anticorpo anti-HEX 110. (D–F) Filamento terminal (a região distal está orientada para baixo). (G–I) Câmara nutridora (no meio da figura) e foliculo ovariano (embaixo) (região distal do vitelário). (J–L) Folículo ovariano formado pelo grande ovócito envolvido por células foliculares. Região intermediária do vitelário. (M–O) Parte de um folículo maduro. (A, D, G, J, M) Núcleos das células marcados com iodeto de propídeo (vermelho); (B, E, H, K, N) Marcação com anti-HEX 110/Alexa Fluor 488 para detecção de HEX 110 (verde) e (C, F, I, L, O) sobreposição das imagens. Setas indicam marcação nuclear. Pontas de seta indicam marcação citoplasmática.



4.4. Imunolocalização de HEX 70a nos testículos

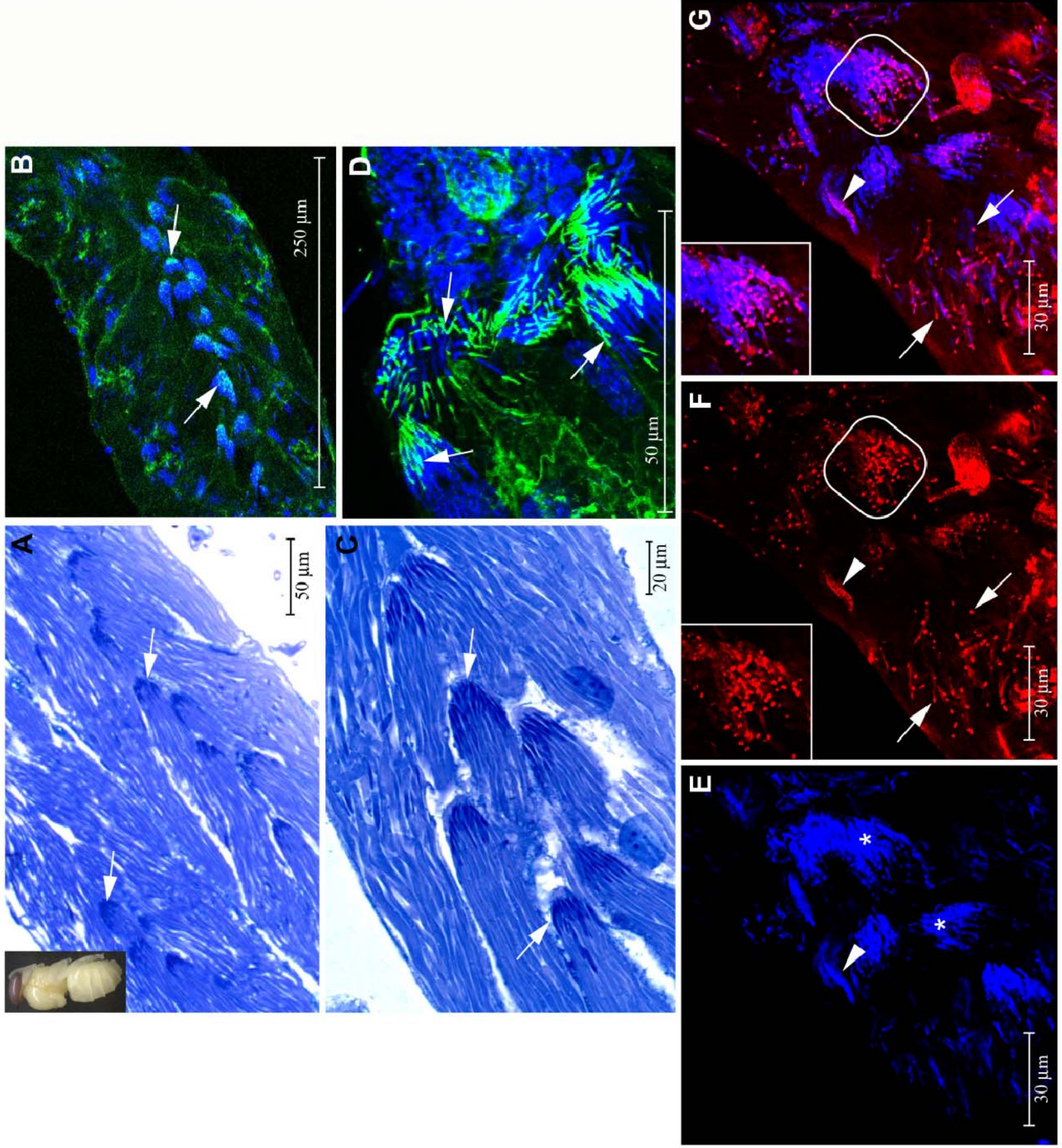
HEX 70a também foi detectada nas células somáticas e germinativas dos testículos em desenvolvimento. A **Fig. 12A** mostra uma secção da porção proximal de um testíolo dissecado de uma pupa de zangão (1 dia após a ecdise pupal). Nesta região pode-se observar os cistos, i.e., grupos de células germinativas (cistócitos ou espermatogônia: setas na **Fig. 12A**) alojados no interior de um envelope de células somáticas (os núcleos das células somáticas estão apontados por pontas de seta na **Fig. 12A**). A marcação de F-actina com rodamina/faloidina (verde) e dos núcleos das células com DAPI (azul), seguida de análise por microscopia confocal, (**Fig. 12B**) destaca a estrutura desta região do testíolo. F-actina é um componente abundante no citoplasma das células somáticas e também está presente nos canais em anel (asteriscos na **Fig. 12B**) que permitem a comunicação entre as células germinativas. A comparação das **Fig. 12C–E** revelou que HEX 70a localiza-se predominantemente nos núcleos das células germinativas (setas largas na **Fig. 12E**) e das células somáticas (pontas de seta na **Fig. 12E**), mas também se encontra dispersa no citoplasma das células germinativas (setas finas na **Fig. 12E**). O pequeno volume do citoplasma das células somáticas prejudica a acurácia na identificação de marcação citoplasmática de HEX 70a.

Figura 12: Imunolocalização da HEX 70a nos testículos de pupas de zangões (1 dia após a ecdise pupal; estágio do desenvolvimento mostrado na margem esquerda superior). **(A)** Microscopia de luz de um testículo corado com azul de metileno e fucsina básica mostrando uma região que contém grupos de cystócitos (espermatogônias) (setas) envolvidos por células somáticas (núcleos das células somáticas indicados por pontas de seta). **(B)** Imagem de microscopia confocal mostrando a marcação de F-actina com rodamina/faloidina (verde) e os núcleos das células marcados com DAPI (azul); pontas de seta mostram núcleos de células somáticas; o inserto mostra um aumento da imagem de um cisto contendo cystócitos (núcleos dos cystócitos apontados por setas) e canais em anel (asteriscos). **(C–E)** Imagens de microscopia confocal de um testículo de zangão na mesma fase do desenvolvimento, mostrando **(C)** marcação dos núcleos das células com DAPI, **(D)** marcação da HEX 70a com anti-HEX 70a/Cy3 (vermelho), e **(E)** sobreposição das imagens **C** e **D**. Na **Fig. 12E** as setas largas mostram os núcleos das células germinativas, as setas finas mostram a marcação da HEX 70a no citoplasma; as pontas de seta mostram os núcleos das células somáticas.



Secções das regiões distais dos testíolos de zangões em uma fase intermediária do desenvolvimento adulto farato (6 dias após a ecdise pupal) mostraram um agrupamento sincicial de espermátides alongadas (**Fig. 13A, C**, setas). Cones de actina são observados sobre a porção anterior dos núcleos das espermátides (**Fig. 13B, D**, setas). A **Fig. 13E** mostra os núcleos das espermátides marcados com DAPI nos agrupamentos sinciciais (setas) e os núcleos das células somáticas (pontas de seta). Na **Fig. 13F**, que é uma preparação marcada com anti-HEX 70a/Cy3, e na imagem sobreposta (**Fig. 13G**), verifica-se que HEX 70a se localiza na extremidade posterior dos núcleos das espermátides (**Fig. 13F, G** insertos), assim como nos núcleos dos espermatozoides individualizados (setas nas **Fig. 13F, G**) e das células somáticas (pontas de seta nas **Fig. 13F, G**).

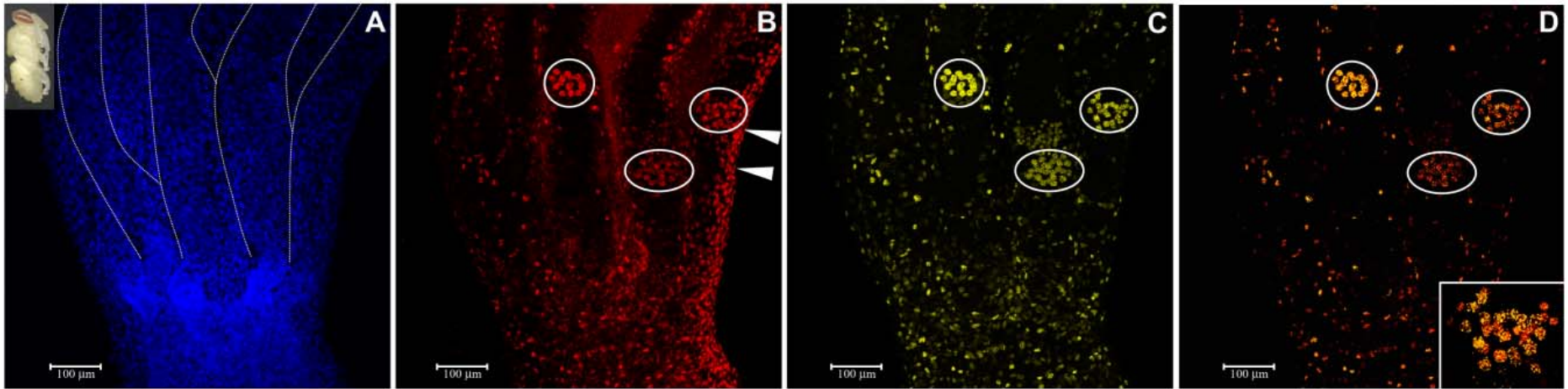
Figura 13: Imunolocalização de HEX 70a nos testículos de zangões adultos faratos (6 dias após a ecdise pupal; estágio do desenvolvimento mostrado na margem esquerda superior). (**A, C**) Microscopia de luz dos testículos corados com azul de metileno e fucsina básica. Agrupamento sincicial de espermátides está indicado por setas. (**B, D**) Imagens de microscopia confocal mostrando a marcação de F-actina com rodamina/faloidina (verde) e a marcação dos núcleos das células com DAPI (azul). A associação da actina com as cabeças de espermátides nos agrupamentos sinciciais está evidente em **B** (setas) e em uma imagem similar e amplificada em **D** (setas). (**E–G**) Microscopia confocal mostrando (**E**) núcleos marcados com DAPI nos agrupamentos sinciciais de espermátides (asteriscos) e nos núcleos das células somáticas do cisto (pontas de seta); (**F**) HEX 70a foi localizada com anti-HEX 70a/Cy3 (vermelho) na extremidade posterior dos núcleos das espermátides no agrupamento sincicial (mostrado em maior aumento na lateral esquerda superior): setas apontam para os espermatozoides individualizados e a ponta de seta indica um núcleo de célula somática. (**G**) A sobreposição das imagens **E–F** mostra o aglomerado sincicial de espermátides (inserto), espermatozoides individualizados (setas) e núcleos das células somáticas do cisto (ponta de seta).



5. Colocalização de EdU e HEX 70a no núcleo das células ovarianas de operárias adultas faratas

EdU é um nucleosídeo análogo da timidina que é incorporado ao DNA durante a fase S do ciclo celular, o que permite a detecção da replicação do DNA e divisão celular quando acoplado a um fluoróforo (Alexa Fluor 594). EdU foi injetado em pupas de operárias (1 dia após a ecdise pupal). Os ovários foram dissecados depois de 24 h, quando as operárias iniciavam o desenvolvimento adulto farato, e preparados para microscopia confocal. As **Fig. 14A–D** mostram as imagens de um desses ovários. Na **Fig. 14A** a marcação com DAPI permite a visualização dos núcleos das células na base dos ovários e nos ovariolos individualizados. Somente a região do germário é mostrada em cada ovariolo. A **Fig. 14B** revela a localização intranuclear da HEX 70a por toda a extensão do ovário. Por comparação entre as **Fig. 14A** e **14B**, pode-se identificar regiões nucleares marcadas com DAPI nos ovariolos (germário), mas não marcadas com HEX 70a/Cy3. Sendo assim, HEX 70a não está presente em todos os núcleos ovarianos. A **Fig. 14C** mostra a incorporação de EdU em núcleos que estão na fase S. Em análise comparativa, as **Fig. 14B, C** e as imagens sobrepostas visualizadas na **Fig. 14D** revelam que os núcleos marcados com EdU/Alexa Fluor também mostram marcação por HEX 70a/Cy3, sugerindo que HEX 70a pode estar de alguma forma envolvida nos eventos da fase S e na proliferação celular dos ovariolos. Entretanto, HEX 70a também localiza-se nos núcleos de células que não estão em fase S: por exemplo, os núcleos que mostram imunofluorescência da HEX 70a na margem direita do ovário na **Fig. 14B** não mostram a fluorescência de EdU (**Fig. 14C, D**).

Figura 14: Colocalização de anti-HEX 70a/Cy3 e EdU/Alexa Fluor nos ovários de uma operária adulta farata (2 dias após a ecdise pupal: mostrada na região superior esquerda da figura). **(A)** Núcleo das células ovarianas marcado com DAPI (azul). Para maior clareza, os ovaríolos estão delimitados por linhas tracejadas acima da porção basal dos ovários. Somente a região do germário é apresentada em cada ovaríolo. **(B)** HEX 70a foi detectada com anti-HEX 70a/Cy3 (vermelho). **(C)** Localização de EdU/Alexa Fluor no núcleo dos ovários em fase S (amarelo). **(D)** Sobreposição das imagens **B** e **C**. As circunferências em **B-D** enfatizam os grupos de cistócitos (na região do germário) mostrando dupla marcação (anti-HEX 70a/Cy3 e EdU/Alexa Fluor). O grupo de cistócitos em destaque na posição mais a direita em **D** está em maior aumento no inserto. Núcleos das células da margem direita do ovário em **B** (pontas de seta) mostram marcação de HEX 70a/Cy3 mas não de EdU/Alexa Fluor.



6. Efeito da injeção do anticorpo anti-HEX 70a na largura dos ovaríolos e esclerotização cuticular

Para reforçar a hipótese de que a hexamerina HEX 70a está envolvida na proliferação das células dos ovaríolos, nós injetamos anticorpo anti-HEX 70a (diluído em 0,9% NaCl) em pupas de rainha, 24 h após a ecdise pupal, e a largura dos ovaríolos foi determinada logo após a ecdise adulta. A **Fig. 15A** mostra que a injeção do anticorpo inibiu significativamente o crescimento dos ovaríolos ($p = 0,002$) em comparação aos ovaríolos das rainhas controles, injetadas somente com 0,9% NaCl sugerindo participação da HEX 70a na proliferação das células dos ovaríolos.

Em paralelo, pupas de operárias, 24 h após a ecdise pupal, foram injetadas com anti-HEX 70a e o efeito deste anticorpo sobre os níveis de HEX 70a foi examinado. *western blots* revelaram redução de 54% (estimada por densitometria das bandas de HEX 70a normalizadas com uma banda de lipoforina de expressão constitutiva) nos níveis de HEX 70a, 4 h após a injeção do anticorpo, seguida de recuperação para níveis normais após 72 h (**Fig. 15B**).

Visto que a HEX 70a é uma arilforina (ver item III 1 – Resultados), e como tal pode representar uma fonte de aminoácidos aromáticos necessários para a formação da cutícula, também checamos o progresso da pigmentação e esclerotização cuticular das operárias injetadas com anti-HEX 70a, comparadas aos dois grupos controle, injetados com IgG de camundongo ou somente com o diluente de anti-HEX e IgG. A injeção de anti-HEX 70a causou um efeito drástico na formação da cutícula. Este efeito foi mais evidente na cutícula das pernas traseiras das operárias que mostraram-se incompletamente pigmentadas e esclerotizadas. Nas abelhas tratadas com anti-HEX 70a, a cutícula das pernas traseiras revelou-se mais clara e mais flexível que as dos grupos controles (**Fig. 15C**).

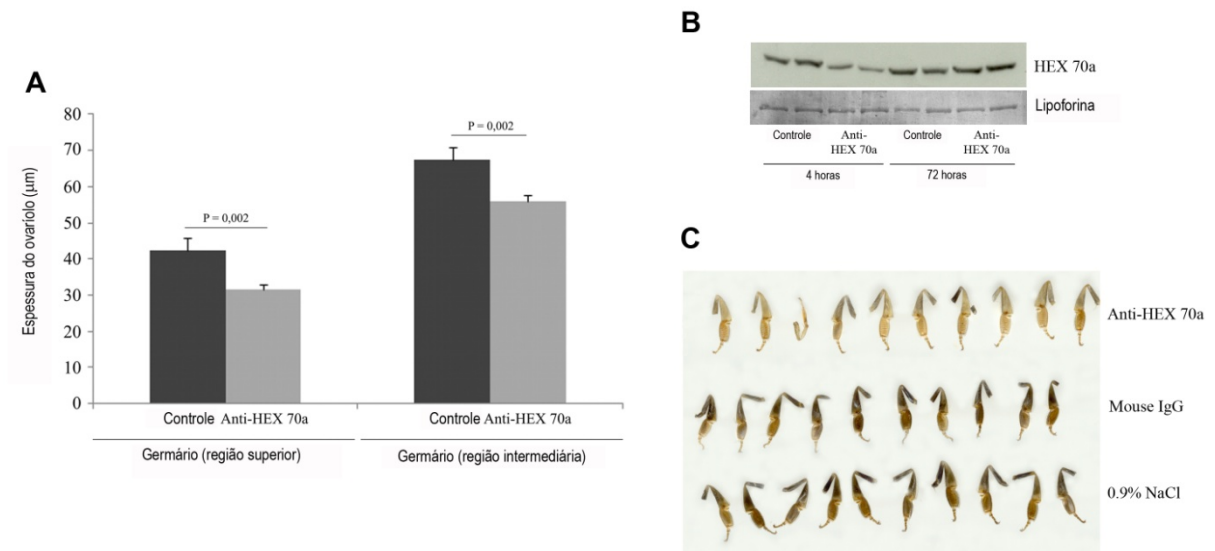


Figura 15: Efeito de anti-HEX 70a nos ovários de rainhas e na diferenciação da cutícula de operárias. **(A)** Espessura dos ovariolos de rainhas injetadas com anti-HEX 70a (diluído em 0,9% NaCl) e respectivos controles injetados somente com 0,9% NaCl. As medidas foram feitas em duas regiões do germário de 120 ovariolos, 60 deles foram dissecados de 3 rainhas injetadas com anti-HEX 70a (20 ovariolos por rainha), e os outros 60 foram dissecados das 3 rainhas do grupo controle. As medidas obtidas das abelhas injetadas com anticorpo, ou somente com o diluente do anticorpo, foram comparados usando teste T (Jandel SigmaStat 3.1 software, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). **(B)** *Western blot* dos níveis de HEX 70a nas amostras de hemolinfa de operárias, 4 e 72 h após a injeção com anti-HEX 70a ou NaCl 0,9% (controle). Os níveis de lipoforina, proteína da hemolinfa de expressão constitutiva, serviram como normalizador. **(C)** Pernas traseiras de operárias injetadas com anti-HEX 70a diluído em 0,9% NaCl, em comparação às operárias injetadas com IgG de camundongo em 0,9% NaCl, ou injetadas somente com 0,9% NaCl.

Análises por microscopia eletrônica de transmissão (**Fig. 16**) das tíbias do 3° par de pernas das operárias tratadas com 0,9% NaCl (controles) (**Fig. 16A e B**) ou com anti-HEX 70a diluído em NaCl 0,9% (**Fig. 16C e D**) mostraram significativa alteração na espessura da cutícula (setas). A camada cuticular é mais espessa nas operárias controles. Nas operárias que tiveram os níveis de HEX 70a diminuídos, a cutícula estava mais fina, o que reforça a hipótese de que esta hexamerina seja uma importante fonte de aminoácidos para a deposição cuticular.

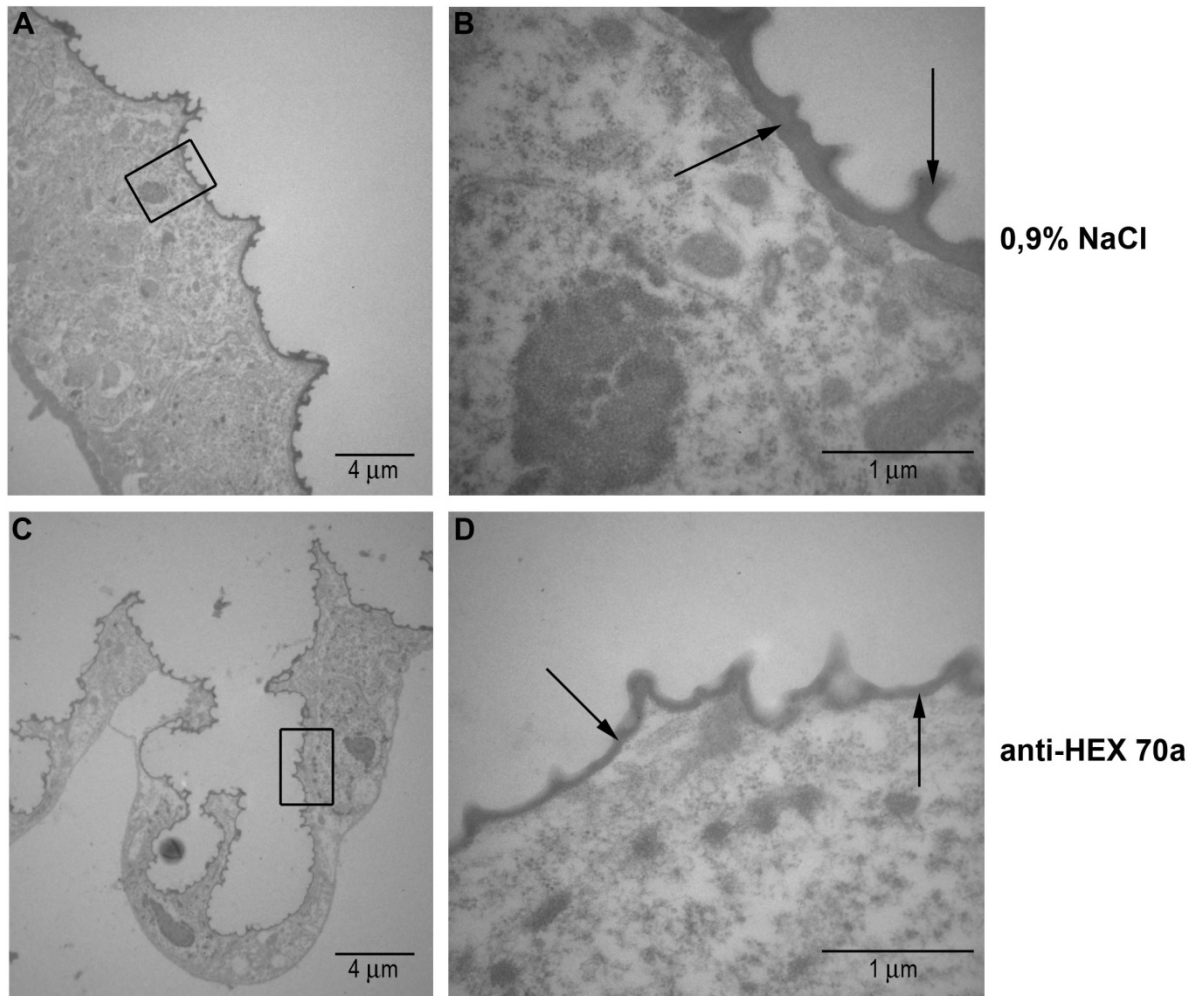


Figura 16: Microscopia eletrônica de transmissão das tíbias do 3º par de pernas de operárias injetadas com (A, B) NaCl 0,9% (controle) ou com (C, D) anti-HEX 70a. As regiões delimitadas em A e C estão representadas em B e D..

7. Injeção de anticorpos anti-hexamerinas em operárias adultas faratas: efeito sobre a sobrevivência e duração do período adulto farato

A injeção de cada anticorpo contra as hexamerinas em operárias em início do período adulto farato (fase Pp) resultou em uma diminuição dos níveis destas proteínas na hemolinfa e no corpo gorduroso 4h e/ou 24h após a injeção (**Fig. 17A**). No período do experimento, a abundância de HEX 110 está diminuindo na hemolinfa; os níveis de HEX 70c devem cair um pouco mais tarde (antes da fase Pbm), e os de HEX 70a permanecem altos (ver **Fig. 4**). De fato, 4h após a injeção de anti-HEX 110 ou anti-HEX 70a, os níveis das respectivas proteínas diminuíram na hemolinfa. Entretanto, níveis normais de HEX 70a foram recuperados 24h após a injeção. A diminuição dos níveis de HEX 70c foi constatada 24h após a injeção (**Fig. 17A**). Como os níveis de HEX 70b diminuem na hemolinfa durante a fase de desenvolvimento correspondente a 24 h após a injeção (fase Pb) (ver **Fig. 4**), as análises do

efeito do anticorpo anti-HEX 70b foram realizadas com o corpo gorduroso, onde os níveis desta hexamerina permanecem altos (Fig. 4). A Fig. 17A mostra diminuição dos níveis de HEX 70b em consequência da injeção do anticorpo.

As injeções não afetaram significativamente ($p = 0,524$) a sobrevivência até a ecdise adulta (Fig. 17B). No entanto, as abelhas injetadas com os anticorpos contra as hexamerinas mostraram aceleração do desenvolvimento e passaram pela ecdise adulta significativamente mais cedo que os controles injetados com 0,9% NaCl ou IgG de camundongo ($p = 0,019$) (Fig. 17C).

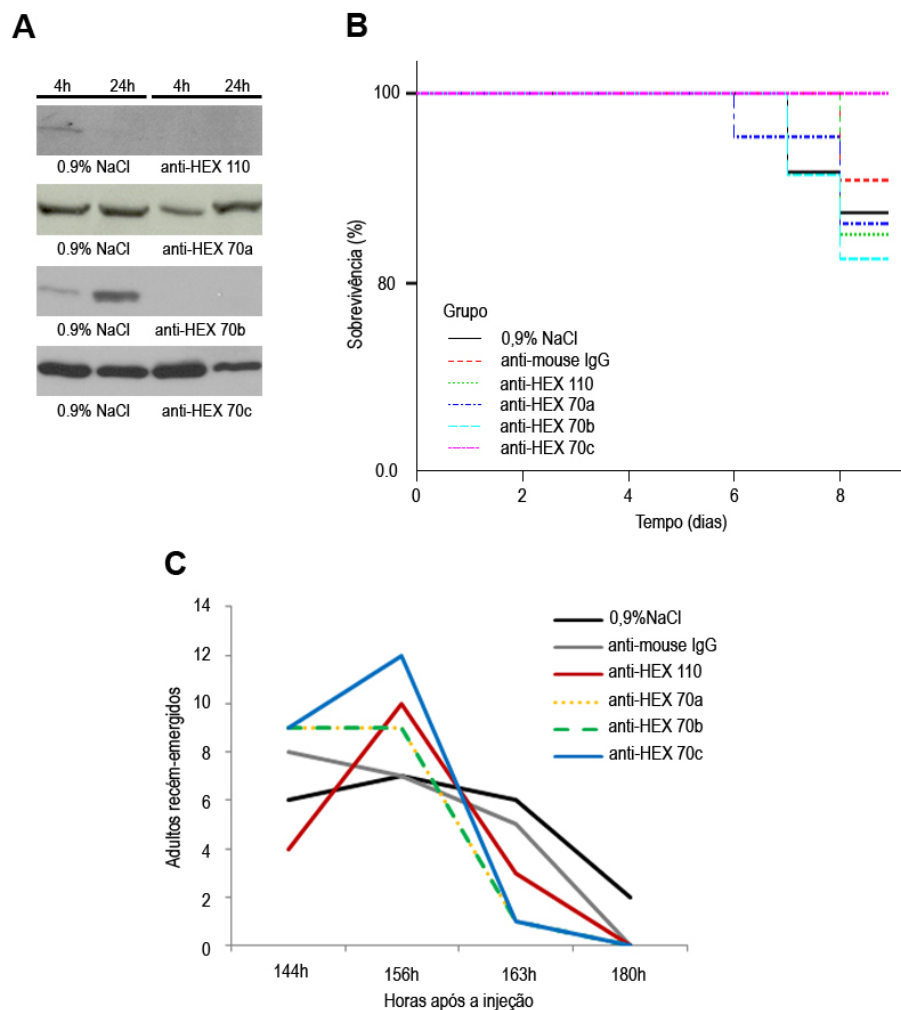


Figura 17: Efeito da injeção de anti-hexamersinas em operárias adultas faratas (fase Pp). (A) *Western blots* mostram a diminuição de HEX 110, HEX 70a e HEX 70c na hemolinfa, e a diminuição de HEX 70b no corpo gorduroso de adultas faratas (Pb) 4 e/ou 24h após a injeção de 1 μ g dos respectivos anticorpos diluídos em 0,9% NaCl. Grupos controles foram injetados com 0,9% NaCl ou com 1 μ g de IgG de camundongo em 0,9% NaCl. (B) Todos os grupos de abelhas (cada um contendo 22 abelhas) mostraram taxas de sobrevivência similares, independente da injeção de anti-hexamersinas ($p = 0,524$). (C) Os grupos injetados e controles diferiram significativamente no tempo de desenvolvimento até atingir a ecdise adulta ($p = 0,019$). Os dados foram

analisados usando Kaplan-Meier: Log-Rank seguido por teste de múltiplas comparações (χ^2 teste) (*software* de estatística R, versão 2.15.0).

II. Regulação da expressão dos genes de hexamerinas

1. Efeito do HJ sobre a expressão dos genes de hexamerinas em larvas de 5° instar

O tratamento com HJ foi realizado em larvas de 5° instar (L5F) com o objetivo de manter os títulos deste hormônio em altos níveis por um prolongado período de tempo, contornando a diminuição natural que normalmente ocorre na transição das fases de alimentação (L5F) para a de construção do casulo (L5S) (Rachinsky *et al.* 1990).

A **Fig. 18** mostra que a expressão dos genes *hex 70b* e *hex 70c* é nitidamente maior nas larvas tratadas com HJ com relação aos controles, embora o efeito do HJ sobre a expressão dos genes *hex 70a* e *hex 110* seja mais discreto. Juntos, estes resultados suportam uma função do HJ na indução da expressão dos genes de hexamerinas.

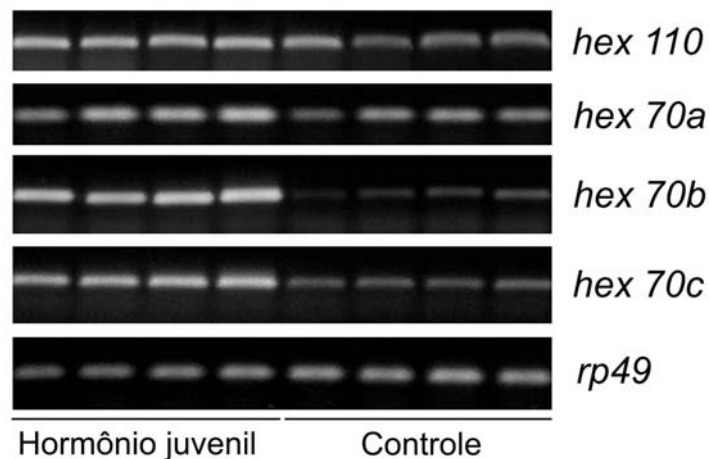


Figura 18: Efeito do hormônio juvenil sobre a expressão dos 4 genes de hexamerinas. O hormônio (diluído em acetona) foi topicamente aplicado sobre o dorso de larvas do 5° instar (fase de alimentação, L5F). Controles foram tratados somente com a acetona. A expressão do gene foi analisada 24 h após o tratamento. A abundância dos transcritos de hexamerinas foi analisada por RT-PCR seguida por eletroforese do cDNA amplificado em géis de agarose corados com brometo de etídeo. O gene *rp49* de *A. mellifera* foi utilizado como normalizador.

2. Regulação da expressão dos genes de hexamerina pela dieta alimentar

2.1. Efeito da dieta oferecida à colmeia sobre o desenvolvimento larval e expressão dos genes de hexamerinas

Por meio da manipulação da quantidade de pólen disponibilizado para a colmeia foi possível, indiretamente, influenciar o *status* nutricional das larvas e verificar se os níveis de transcritos dos gene *hex 70c* e dos outros três genes de hexamerinas, são nutricionalmente regulados nas larvas.

Duas colmeias foram confinadas em gaiolas revestidas por uma tela que impede o acesso das abelhas forrageiras a qualquer fonte de alimento externo. Dois tipos de dietas contendo 5 ou 20% de pólen foram oferecidas, separadamente, a duas colmeias, cada uma abrigada em uma gaiola. Larvas originárias da colmeia que recebeu a dieta com 5% de pólen apresentaram peso 4 vezes menor que larvas da colmeia alimentada com a dieta contendo 20% de pólen ($p = 0,009$) (**Fig. 19A**). Quantificação das proteínas da hemolinfa (**Fig. 19B**) e do corpo gorduroso (**Fig. 19C**) destas larvas, assim como do RNA total extraído do corpo gorduroso (**Fig. 19D**) mostrou níveis significativamente mais baixos ($p = 0,001$; $p = 0,005$; $p = 0,004$, respectivamente) nas larvas que se desenvolveram na colmeia alimentada com 5% de pólen.

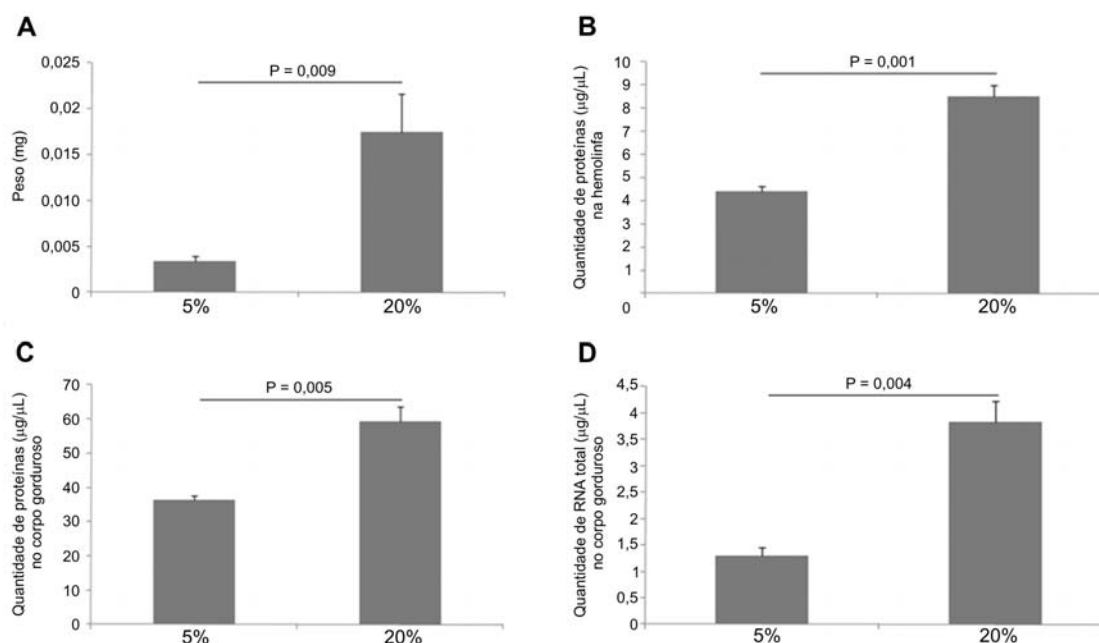


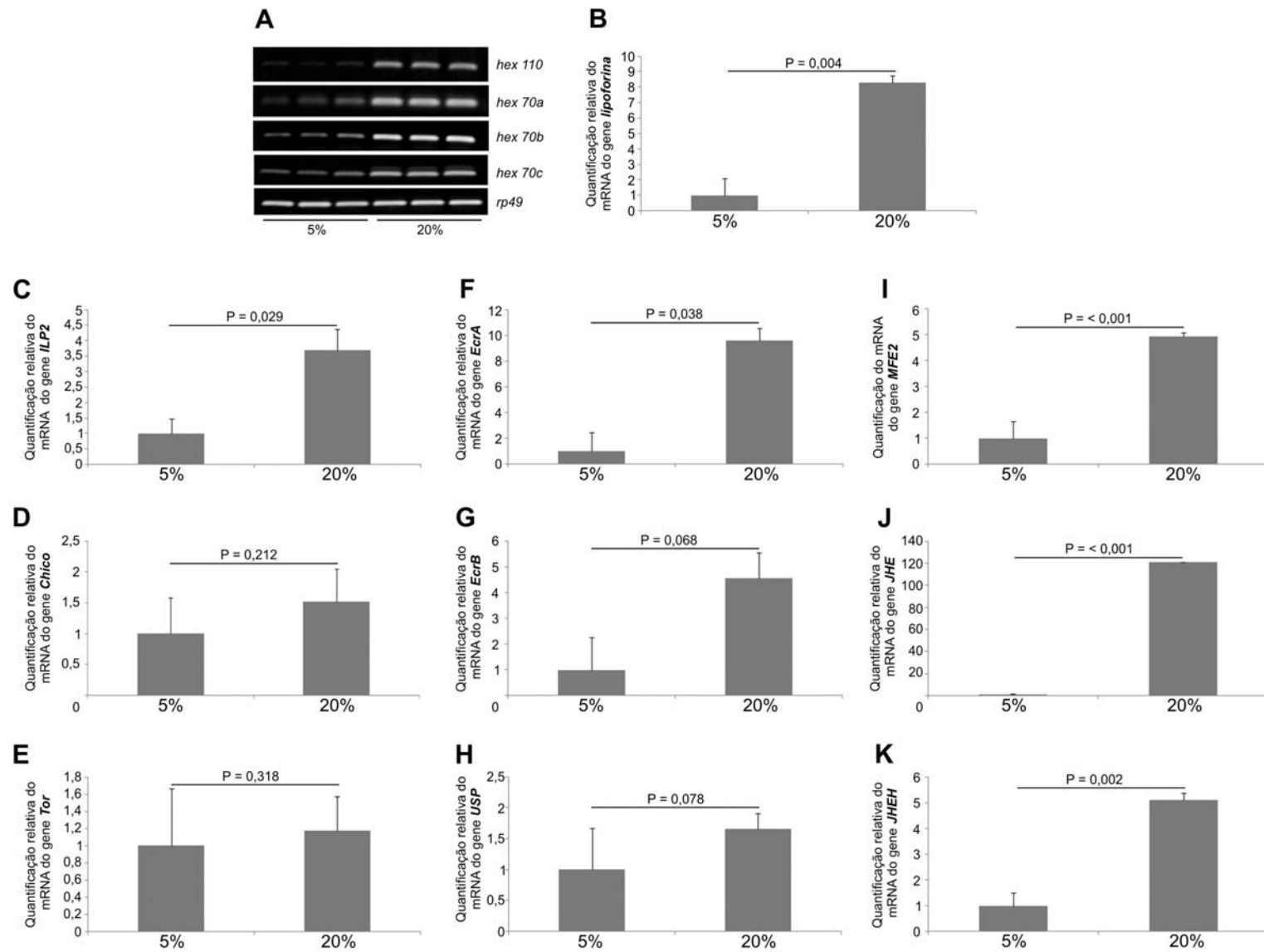
Figura 19: Efeito da concentração de pólen na dieta oferecida à colmeia sobre o desenvolvimento larval. (A) Peso das larvas (mg). (B) Quantidade de proteínas na hemolinfa ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). (C) Quantidade de proteínas no corpo gorduroso ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). (D) Quantidade de RNA total no corpo gorduroso ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

A concentração de pólen na dieta de uma colmeia foi capaz de inibir ou estimular a produção de transcritos de hexamerinas (**Fig. 20A**). As larvas coletadas da colmeia alimentada com dieta contendo 5% de pólen mostraram níveis menores de transcritos de hexamerinas. Este efeito foi mais evidente para os genes *hex110*, *hex 70a* e *hex 70b*. Um efeito mais discreto foi observado para o gene *hex 70c*. A expressão do gene que codifica a lipoforina I/II, proteína de estocagem de alta massa molecular, também foi prejudicada em consequência da alimentação pobre em pólen (**Fig. 20B**).

Análise da expressão de um gene da via da insulina, ILP2 (*Insulin-like peptide 2*), mostrou que também é reprimido pela baixa quantidade de pólen no alimento (**Fig. 20C**). No entanto, a expressão de outros genes como *chico* (**Fig. 20D**) e *TOR* (*target-of-rapamycin*) (**Fig. 20E**) não foi significativamente modificada.

O gene codificador de uma isoforma do receptor de ecdisona, *EcRa* (**Fig. 20F**), também mostrou menor expressão em consequência da baixa quantidade de pólen na dieta. No entanto, o gene que codifica a outra isoforma do receptor de ecdisona, *EcRb* (**Fig. 20G**), assim como *ultraspiracle*, que codifica a proteína Usp que junto com EcR forma o complexo heterodimérico de ligação a ecdisona, não mostraram alteração significativa de expressão (**Fig. 20H**). O gene *mfe2* (metil farnesoato epoxidase 2) (**Fig. 20I**), da via de síntese do HJ, assim como os genes codificadores de enzimas que degradam este hormônio, *jhe* (esterase) (**Fig. 20J**) e *jheh* (epóxido hidrolase do HJ) (**Fig. 20K**) também mostraram baixa expressão em larvas criadas em colmeias que receberam pouca quantidade de pólen.

Figura 20: Efeito da concentração de pólen na dieta oferecida à colméia sobre a expressão dos (A) genes de hexamerinas e de outros genes: (C-E) com função na via de insulina, (F-G) genes receptores de ecdisona, (I) genes da via de síntese e (J-K) de degradação do HJ. (A) Produto de RT-PCR semi-quantitativa analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. (B-K) Quantificação de transcritos por qRT-PCR. Os níveis de mRNA foram comparados utilizando-se o teste T (Jandel SigmaStat 3.1 software, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). O gene *rp49* foi utilizado como normalizador na amplificação por PCR.



2.2. Alternância da dieta de larvas de operárias e rainhas e efeitos sobre a expressão dos genes de hexamerinas

A transferência de larvas L1 dos alvéolos de operárias, onde permaneceram por 2 dias, para cúpulas de rainhas para permanência por mais 2 dias (grupo 2Op2Ra), provocou alteração da dieta nutricional e as larvas antes destinadas a se tornarem operárias alcançaram tamanho corporal semelhante às larvas mantidas por 4 dias nas cúpulas de rainhas, as quais receberam, exclusivamente, alimento de rainha (grupo 4Ra) (**Fig. 21A**). As larvas mantidas por 2 dias em cúpulas de rainha e, subsequentemente, transferidas para os alvéolos de operárias, onde permaneceram por mais 2 dias (grupo 2Ra2Op), mostraram tamanho semelhante àquelas que passaram os 4 dias nos alvéolos de operárias, consumindo exclusivamente alimento de operária (grupo 4Op) (**Fig. 21A**). Este resultado foi confirmado pela pesagem das larvas. As larvas do grupo 2Op2Ra apresentaram um aumento significativo do peso corporal ($p \leq 0,001$), equivalente ao observado em larvas do grupo 4Ra. As larvas 2Ra2Op mostraram um valor de massa corpórea similar às larvas do grupo 4Op. Os grupos 2Ra2Op e 2Op2Ra não diferiram significativamente quanto ao peso corporal (**Fig. 21B**). Análises da expressão dos genes de hexamerinas em todos os grupos mostraram alteração na densidade de transcritos de apenas um deles, *hex 70a* (**Fig. 21D**). Larvas do grupo 4Op apresentaram cerca de 25 vezes mais transcritos deste gene em relação às larvas do grupo 4Ra. Larvas 2Op2Ra mostraram níveis significativamente mais baixos de transcritos de *hex 70a* ($p = 0,001$; One-way ANOVA – Holm Sidak) quando comparados aos níveis de transcritos de larvas do grupo 4Op. As larvas do grupo 2Ra2Op não diferiram significativamente quanto aos níveis de transcritos em relação às dos grupos 4Ra e 4Op. Perfil de expressão similar foi observado para a proteína HEX 70a da hemolinfa destas larvas (**Fig. 21G**). Os outros genes de hexamerinas, *hex 110* (**Fig. 21C**), *hex 70b* (**Fig. 21E**) e *hex 70c* (**Fig. 21F**), não apresentaram modificação significativa na densidade de transcritos e da proteína em consequência da variação da dieta, no período de tempo de duração do experimento.

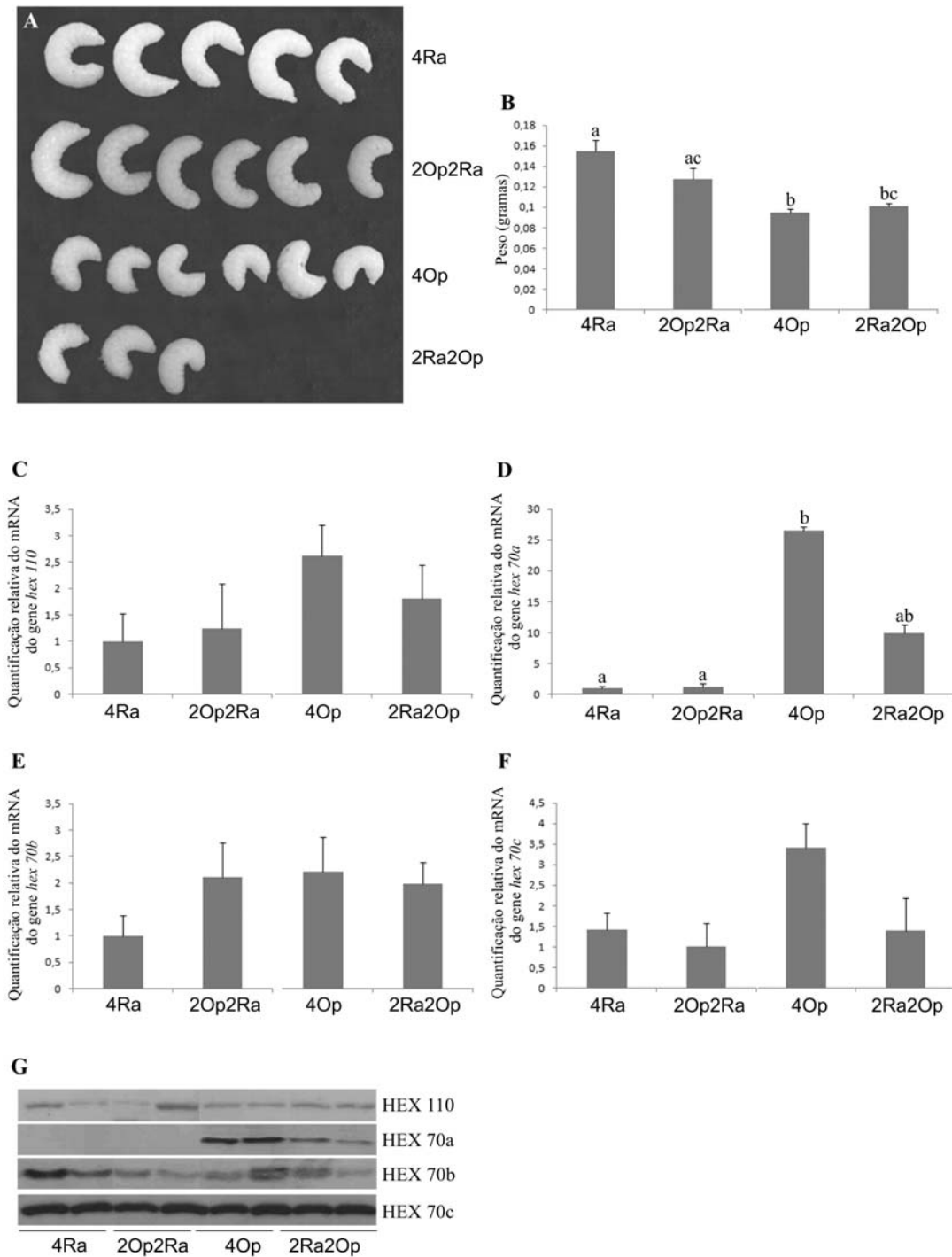


Figura 21: Manipulação experimental da dieta larval. (A) Larvas L1 alimentadas exclusivamente, durante 4 dias, com alimento de rainhas (grupo 4Ra) ou com alimento de operárias (grupo 4Op). Larvas L1 alimentadas durante 2 dias com alimento de operárias e em seguida por mais 2 dias com alimento de rainhas (grupo 2Op2Ra). Larvas L1 alimentadas durante 2 dias com alimento de rainhas e em seguida por mais 2 dias com alimento de operárias (grupo 2Ra2Op). (B) Peso em gramas. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (One-way ANOVA; Holm Sidak; SigmaStat 3.5 software, Jandel Corporation, USA). (C-F) qRT-PCR para quantificação de transcritos dos genes de hexamerinas (*hex 110*, *hex 70a*, *hex 70b* e *hex 70c*). O gene *rp49* foi utilizado como normalizador. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,001$ One-way ANOVA; $p \leq 0,05$ Holm Sidak; SigmaStat 3.5 software, Jandel Corporation, USA). (G) *Western blot* de amostras de hemolinfa utilizando-se anticorpos contra cada subunidade de hexamerina.

III. Características das subunidades HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c e HEX 110

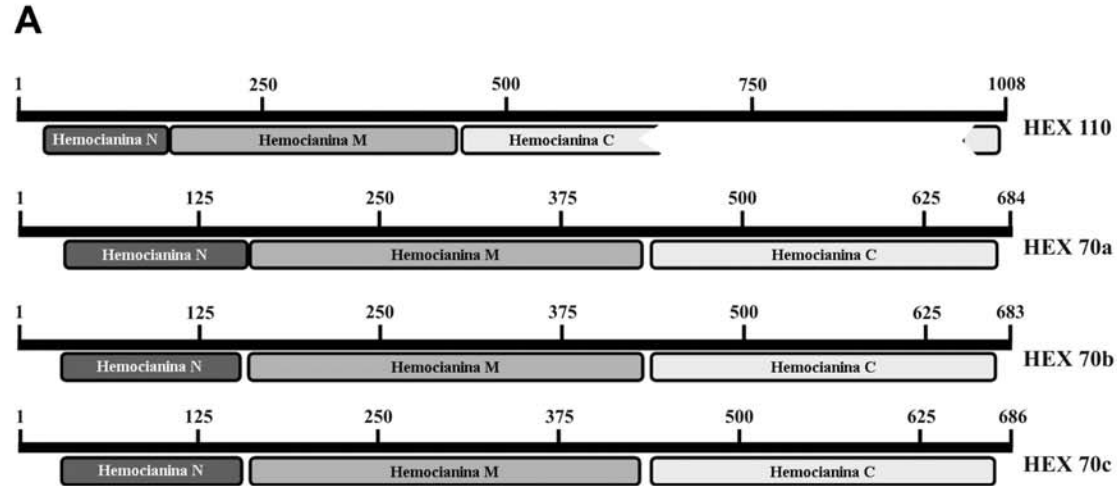
1. Estudo da estrutura das subunidades de hexamerinas

A sequência N-terminal de cada subunidade de hexamerinas (HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c e HEX 110) foi determinada por Danty *et al.* (1998). Todas elas contêm os domínios de hemocianina conservados N, M e C (N: PF03722.5, M: PF00372.10 e C: PF03723.5 – base de dados Pfam, Bateman *et al.*, 2004) (**Fig. 22A**). Também foi previamente demonstrado (Bitondi *et al.*, 2006) que o domínio de hemocianina C da HEX 110 é interrompido por uma inserção de 291 aminoácidos. Esta inserção é muito rica em glutamina e ácido glutâmico (Glx) e contribui significativamente para o total de Glx (20,9%) da HEX 110.

O sequenciamento completo dos 4 genes de hexamerinas [Cunha *et al.*, 2005 (*hex 70b*); Martins, 2008; Martins *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2010 (*hex 70a*, *hex 70c* e *hex 110*)] seguido da análise das sequências de aminoácidos preditas possibilitou identificar a presença de sítios de glicosilação, uma histidina conservada e motivos tipicamente encontrados em outras hexamerinas de insetos (**Fig. 22B**). O *software* <http://phobius.sbc.su.se> foi utilizado para a predição de peptídeos sinal e topologia transmembrana das sequências de aminoácidos de cada subunidade de hexamerina. As quatro subunidades contêm peptídeo sinal que dirige o transporte das proteínas. Como esperado, nenhuma das subunidades contêm domínio transmembrana. Com respeito à composição de aminoácidos, HEX 70a e HEX 70c contêm uma quantidade relativamente elevada de fenilalanina, triptofano e tirosina (18,2% e 16,9%, respectivamente), e pertencem à classe das hexamerinas ricas em aminoácidos aromáticos (ou arilforinas). Com seu conteúdo relativamente alto de metionina, HEX 70b (4,4%) e HEX 70c (6,4%) puderam ser incluídas na classe das hexamerinas ricas em metionina.

A identidade de aminoácidos entre as hexamerinas de *A. mellifera* varia de 30% a 42%. Múltiplos alinhamentos utilizando ClustalW 1.83 revelaram que HEX 70a, HEX 70b e HEX 70c são mais similares entre si (39 a 42%) do que com a HEX 110 (30 a 32% identidade) (**Apêndice 4 – Fig. 32**).

Figura 22: (A) Diagramas das seqüências de hexamerinas mostrando os domínios de hemocianina conservados N, M e C. O domínio C está interrompido na seqüência de HEX 110. (B) Sequências de aminoácidos deduzidas do sequenciamento completo dos genes das hexamerinas. O peptídeo sinal está indicado por linhas pontilhadas e as linhas tracejadas mostram os motivos identificados por Danty *et al.* (1998). Asteriscos indicam os sítios de glicosilação. A histidina conservada está duplamente sublinhada. O motivo *LSP signature-1* está indicado (+++). O motivo *LSP signature 2* está em negrito. O sítio de clivagem por protease está sublinhado. A glicina 14 conservada em exopterigotos e endopterigotos está indicada (#).

**B****>Hexamerina110 (HEX 110)**

MRYFIILLALVALGVCAPNVKQRAADQDLLNKQDQVQLLQKISQPIPNQELQNLGASYDIESNSHQYKN
 PIIVMYAGAVKAGLVQPQGTTFNSISQLRKEVSLYRIRLLGAKDYQTFKTAAWARVHVNEGQFLKAF
 VAAVLTQRDQGVIFPPVYIEILPQHHLDSRVIQEAQNIATQNTQGGKNNQNILIPVNYALLSHDEQQLS
 YFTQDIGLAAYYAQVNLAGYIQEQNQQQQQQPLTQQQQYQQQIVGKYLQQQAGQDQQA^{***}NI^{***}GRGAQYLYL
 HQQLLARYELNRLSNGLGP^{***}IKDIDYENVQSLYQPHLRGLNGLEFAGRPNLQLQSQRNQLIQYVATLEKR
 LRDAIDSGNVI^{***}TPQGVFLSLYQPGMNILGDLIEGTGRSVNPRYVGS^{***}LQAARKLLGN^{***}APEVENIWDYTP
 SSLELGEVAVHDPVFYQLYKKVMNLYQQYQQSLPVYQYNDLILPGVTIQNV^{***}DVSVQLVTLFTDFYV^{***}DLDAV
 TGHQSQQQQEEQTQSRVRAHLKRLDHQPYQYKIAVHSEQNVPGAVRVVFLGPKHDHQGRPI^{***}SISKNQH^{***}LF
 VELDQFIQNLHAGENTIIRNSQQAPGQSPDW^{***}PSTSQIQRGVNAARSQEPFYITEPHQIFSPARLSLPK
 GQPQGFPLQFLVVISSSNPLNVPYGPVIEQ^{***}SLTYQDQQYQVVSVDQYQQLKEQQGISQVGGGIQQNVEV
 LPENLVNAQQQVAVRNYANLYTKYHGQY^{***}PNTQIQNPVGGQDMDTYSVQGVGVVNAAGGWLQGGQNSWSQ
 QQVQAQQVQQQMAAAMA^{***}VQSQQRHQHAAQMIYGHQQSHHGLHINS^{***}SPSSVQSQGQQQSVLQGLGVQV
 VQGVQGVQVTAQGVQGVQGVQGVQGVQGVQGV^{***}PGLLQGVQVFGQVQGMNVPYGMQRGQSGQGTWSNSQ
 VQGVAVPGSGIVASGQHAGGWQSIYAQPQTVDQIVSEYYQNKPISEVIGGAISLDGKPLGFPLDRPLS
 LGALSVPNIFVKDVLVVFHQGQPTNDITQ

>Hexamerina70b (HEX 70b)

MIVIMKAGFLFASLCLLVQAVPNKVADKTYVTRQKNIYELFWHDQPTVYHPELYQKARTFNLENLDN
 YNDKEAVNEFMQLLKHGMLPRGQVFTMMN^{***}KEMRHQAVVLFRLLYSAKTFDVFYNTAVWARFNVNEQMYLY
 ALSVAVIHRPDTKLMKLPMPYEVMPHLYFNDEVMQKAYNIAMGDTADMKKT^{***}YNNIDYLLAANYTGWYLT
 KHNVP^{***}EQRLNYFTEDVGLNHFYFMLNHNYPPFMLSNSLNF^{***}PQIRGEFYFLL^{***}HKQLVNLRYL^{***}LE^{***}RLSNDMGE
 VSYVSLDHPITPTGYYP^{***}TRFRNGLA^{***}FPQRETGATVPLHM^{***}KQYVQMIHDLHTRISTAIDLGYV^{***}DSYGNHV
 KLYTKQGLNVLGNIVQGGDSVNVQLYGLDLLV^{***}RVKVLGFGYESNVKYQVVP^{***}SALQMWS^{***}TSLR^{***}DPVFFSI
 YKTLIDY^{***}YHKYK^{***}ENL^{***}PKYTTEELNFP^{***}GVSI^{***}ESVTVDK^{***}LITYFDH^{***}FESMLNNGVSI^{***}QSHAKANTMI^{***}KARQ
 YRLNHKPF^{***}TYHIVVNSDKNVKGMVRI^{***}FLGPKYDEF^{***}GH^{***}EV^{***}DLV^{***}HN^{***}YMN^{***}FMQ^{***}DE^{***}FV^{***}NL^{***}KSG^{***}SNTI^{***}ERN^{***}SH
 ES^{***}V^{***}FV^{***}DP^{***}EV^{***}SD^{***}VL^{***}YN^{***}RL^{***}V^{***}SD^{***}GS^{***}ET^{***}FK^{***}YS^{***}SQ^{***}PY^{***}GF^{***}PER^{***}LLL^{***}PK^{***}GK^{***}EG^{***}MP^{***}YN^{***}LV^{***}V^{***}VS^{***}PF^{***}DD^{***}SN^{***}VVQ
 IDS^{***}PV^{***}WGR^{***}HI^{***}YD^{***}GRAM^{***}GF^{***}PL^{***}DK^{***}PV^{***}DP^{***}LL^{***}LV^{***}LS^{***}NI^{***}HV^{***}KE^{***}VL^{***}VH^{***}HRE^{***}MEEL^{***}NVAL

>Hexamerina70a (HEX 70a)

MFIPSHQVWLVLGLAFSLVGAEYD^{***}TKTADKDFLLKQKKVYNLLYRVAQPALANITWYNEGQAWNIEANI
 DSYTNA^{***}AAVKEFLSIYKHGMLPRGELFSLYYPQLREMSALFKLFYHAKDFDI^{***}FFK^{***}TALWAKNNINEAQY
 IYSLYTAVITRPDTKFIQLPPLYEMCPYFFFNSEVLQKANHALIFGKLDTKTSGKYKEYIIPANYS^{***}GGWYL
 NHDYNLENKLIYFIEDIGLNTYFFFLRQAF^{***}FPFWLPSKEYDLPDYRGE^{***}EYLYSHKLLLNRYL^{***}ERLSNDLP
 HLEEFDWQKPFYPGYPTMTYSNGLPFPQRP^{***}IWSNFP^{***}IYKYK^{***}IREIMNKESRI^{***}SAAIDSGYILNNDGKW
 HNIYSEKGLNILGNIIEGNADSYNTEFYGSIDTLARKILGYNLEAASKYQIVPSALEIF^{***}TSMKDPAFYR
 IYKRIIDY^{***}YHSYKMHQK^{***}PKYNKDEI^{***}IYPNLKIESFTVDKLITYFEQFDTTINNGLLLEEQRNDDKFLIKI
 RQYRLNHKPFNFHITINADKPKMAAIRIFIGPKYD^{***}SHHK^{***}LIEI^{***}PEDLKYFYEIDNWM^{***}LDLNSGLNKITRN
 SLDCFF^{***}TMDNLEPSEIFYEKIE^{***}TSLNSDKPFTYNERIFGFPGRLLLPRGKKEGMPFQLFLYVSPVSSSEYN
 QYNSRIWGGYK^{***}FKRSFGFPLDKPLYDFNYEGPNMLFKDILYHKDEFDMNITY^{***}

>Hexamerina70c (HEX 70c)

MLSKVVLVLAALAAICGAQGAS^{***}YAGRHTADMDFLHKQKKIFD^{***}LLYVRQADLSDAEWYDVGRNYDMESNDM
 MYKDKNVVQKFLWYKQGMFLSRNAIF^{***}TPLNSEQKYEV^{***}RMLFELLYNAKDFQTFYKTA^{***}AWARLRMNSGMF
 TFAFSIAVLYR^{***}PD^{***}TKYMKFPAIYEI^{***}YPNYFFDSSVIEEAQNLKMSRGS^{***}SVV^{***}TGMN^{***}NIETYIVNTNYSSKN
 MREYNDPEYKLDYFME^{***}DELNA^{***}AYYYMREMLPYWMSSSQYHMPKEIRG^{***}LYYFL^{***}HKQLMTRYFL^{***}ERMSND
 LGKTAEP^{***}DWNK^{***}PINS^{***}GFYSTIMYSNGVTFPQRNRFSSLPYKYK^{***}LVNINALEMRLMDAIDSGYLIDEYG
 KKIDIY^{***}TPEGLNMLGNVIEGSSDSINTKFYGM^{***}YDILARDILGYNFDFQNKNNLIP^{***}SALQ^{***}YSY^{***}TSMRDPAF
 YMLYQNLISYFLRYK^{***}KLQ^{***}PQYSQSELQMPGVKFESVNI^{***}DKLYTFDKCDTLINNAVAVENFKGGMYLRLK
 ARRACMN^{***}YERFTYKININS^{***}DKETKGMRI^{***}FLGPAFDEIKHDMVYLQKYFLFMEMDRFAVTLRPGSNSIE
 RQSS^{***}ES^{***}PFTTSTIMPSDI^{***}FDKLNKAIGGSE^{***}PFTYSEKMLG^{***}PPERLILPRGKPEGMRYK^{***}MFFLLSSMDES
 NTKSYEIPLYGKMTLDDKVF^{***}GFPLDRPMAWANNFTIPNMYK^{***}DFVIYNRNPEESMNY

2. Cromatografia para separação das hexamerinas

A cromatografia por filtração em gel de amostras de hemolinfa de larvas de operárias L5S gerou 10 picos (**Fig. 23A**). As frações correspondentes foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE (**Fig. 23B**), PAGE não desnaturante (**Fig. 23C**) e espectrometria de massa. Hexamerinas foram localizadas nas frações 2 e 3, e em gel nativo de poliacrilamida apresentaram massa molecular de aproximadamente 660 kDa. Análises por *western blot* (**Fig. 23D**) confirmaram a presença das hexamerinas nestes picos. Optou-se pela utilização dos anticorpos em *western blots* para identificação das hexamerinas nas frações, uma vez que por espectrometria de massa, apenas a HEX 70b foi identificada. A hexamerina HEX 110 não foi detectada nas frações.

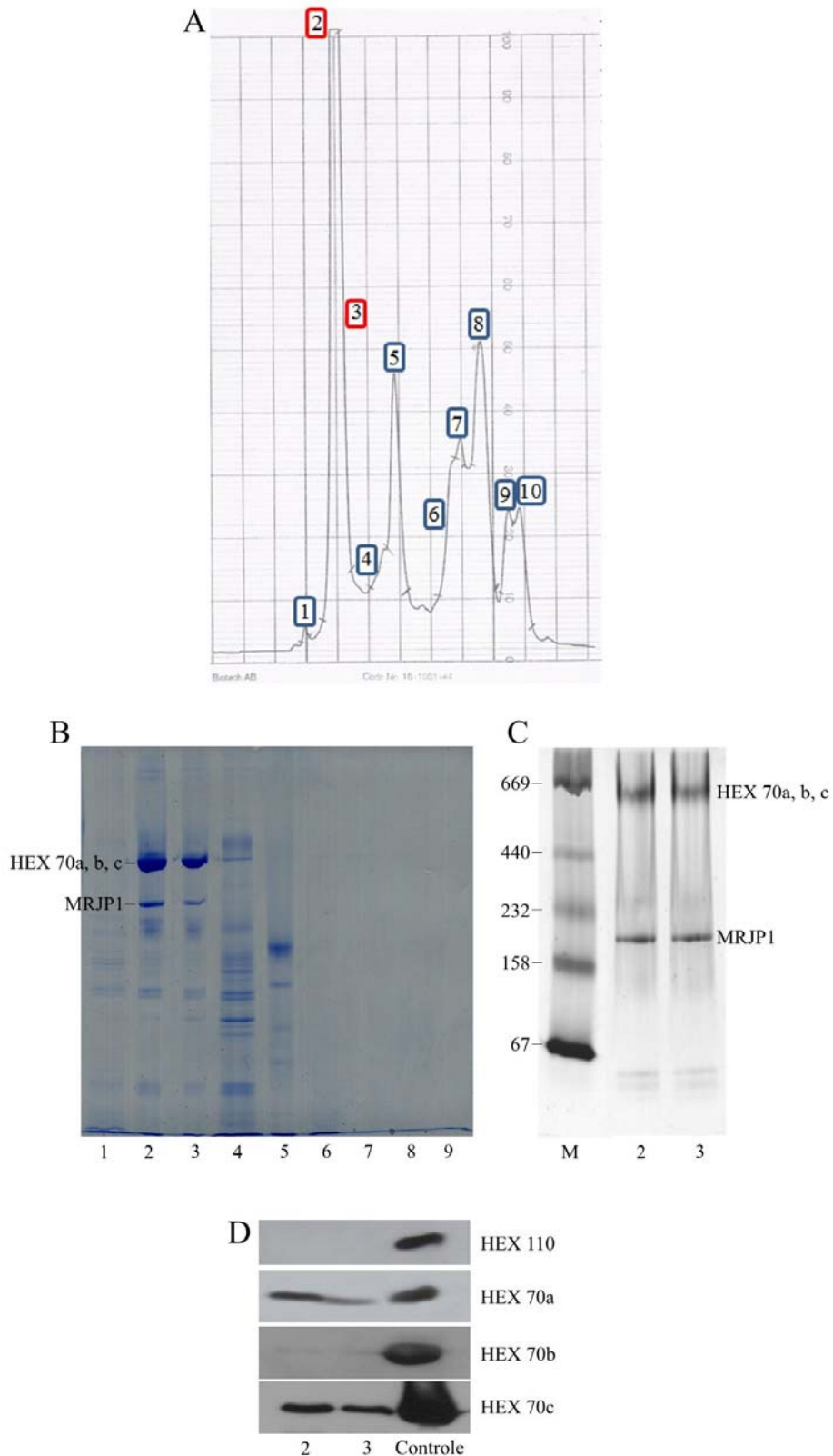


Figura 23: Cromatografia por filtração em gel. (A) Cromatograma. Os números indicam as frações coletadas. (B) SDS-PAGE de amostras das frações 1 a 9 obtidas da cromatografia. As subunidades HEX 70a, HEX 70b e HEX 70c estão indicadas, assim como a banda de aproximadamente 200 kDa identificada como *Major Royal Jelly Protein 1* (MRJP1). (C) PAGE em condições não-desnaturantes de amostras das frações 2 e 3 obtidas da cromatografia. (D) SDS-PAGE e *Western blot* de amostras das frações 2 e 3 utilizando-se anticorpos contra cada uma das quatro hexamerinas.

Para melhor purificação dos oligômeros de hexamerinas obtidos nas frações 2 e 3 da cromatografia por filtração em gel, estas foram submetidas a cromatografia de alta-eficiência por troca-iônica. O procedimento gerou 5 picos (**Fig. 24A**). Análises por SDS-PAGE (**Fig. 24B**), PAGE não desnaturante (**Fig. 24C**) e espectrometria de massa revelaram que o 1° pico gerado, ou fração, relativo a proteínas que não aderiram à coluna, continha 3 hexamerinas, HEX 70a, HEX 70b e HEX 70c, e que HEX 70b e HEX 70c estavam também presentes no 2° pico. *Western blots* de amostras das frações 1 e 2 confirmaram a presença de HEX 70a e HEX70c na fração 1, e de HEX 70c na fração 2 (**Fig. 24D**). A presença de HEX 70b e HEX 70c no 2° pico sugere a formação de um provável heterooligômero, ou seja, um hexâmero composto por estas duas subunidades. A proteína MRJP1 foi identificada nos picos 3, 4 e 5.

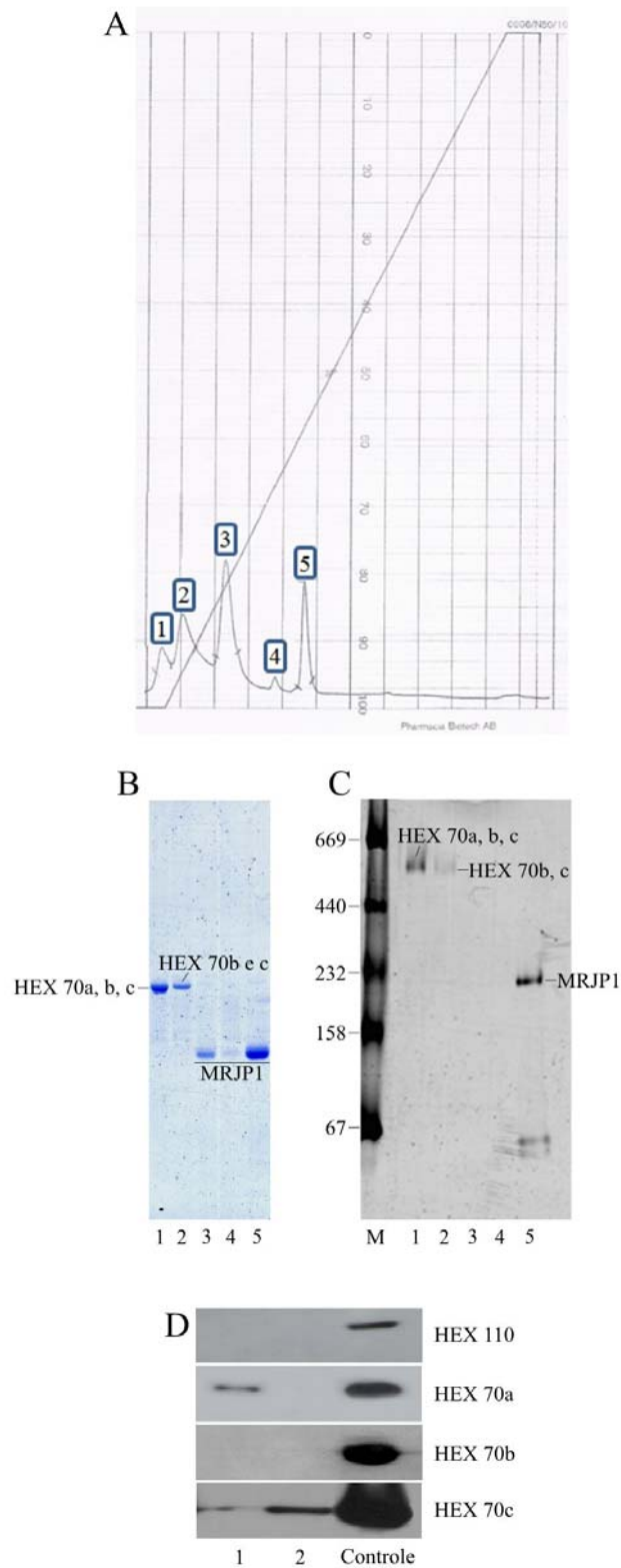


Figura 24: Cromatografia por troca-iônica das frações 2 e 3 obtidas da cromatografia por filtração em gel (ver **Fig. 23**). **(A)** Cromatograma. Os números indicam as frações coletadas. **(B)** SDS-PAGE de amostras das frações 1 a 5 obtidas da cromatografia. **(C)** PAGE não desnaturante de amostras das frações 1 a 5 obtidas da cromatografia. **(D)** *Western blot* de amostras das frações 1 e 2 utilizando-se anticorpos contra cada uma das quatro hexamerinas.

3. Produção das hexamerinas *in vitro*

Como alternativa para a tentativa de separação e purificação das hexamerinas por cromatografia, partimos para a expressão *in vitro* destas proteínas. Foram construídos *primers* específicos para esta finalidade, os quais foram eficientes em amplificar esses genes (**Fig. 25A**). A **Fig. 25B** mostra a eficiência da digestão e a **Fig. 25C** mostra que as bactérias foram transformadas e contêm os insertos dos genes de hexamerinas. SDS-PAGE do extrato de bactérias após indução da expressão da proteína HEX 70c mostrou uma banda indicativa da expressão desta proteína (**Fig. 25D**). Testes por *western blot* para identificação desta banda no purificado estão em andamento. A expressão e a purificação das outras subunidades de hexamerinas estão em andamento.

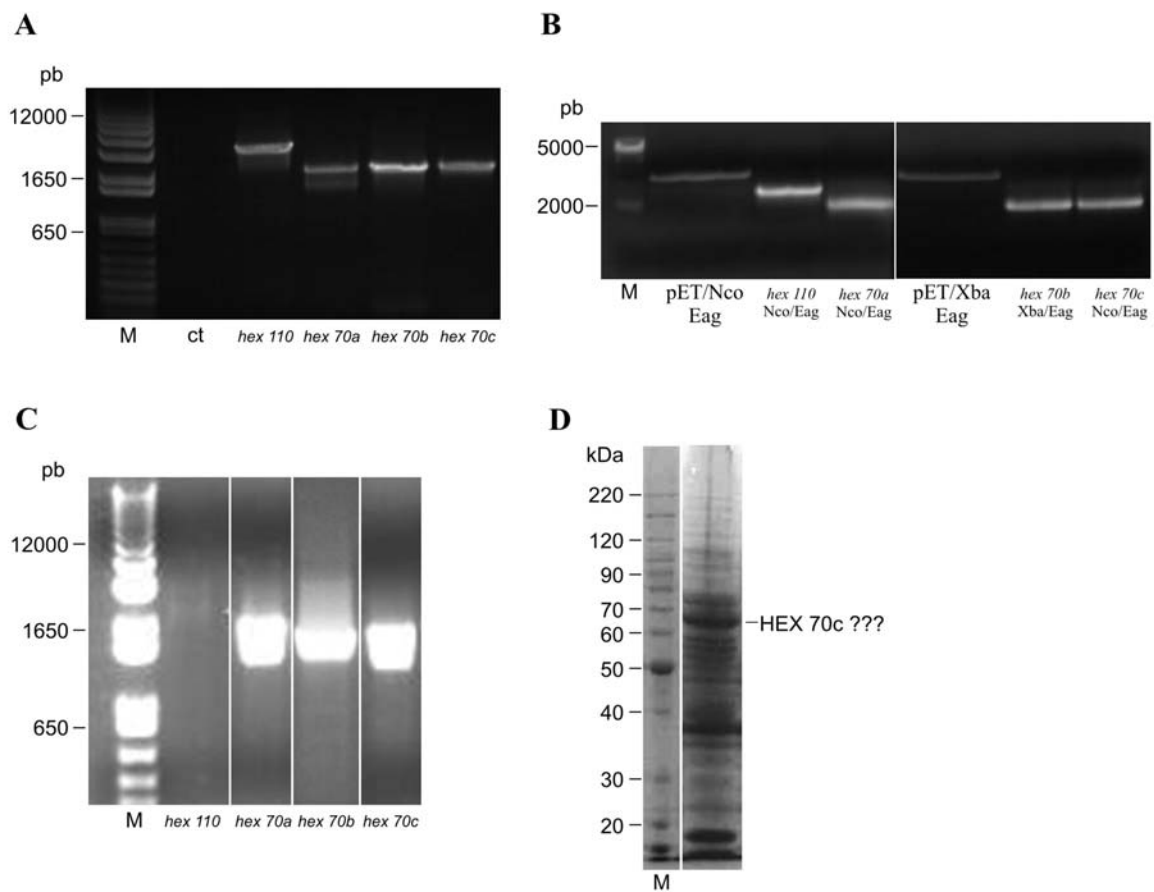


Figura 25: Expressão *in vitro* das quatro hexamerinas (HEX 110, HEX 70a, HEX 70b e HEX 70c). (A) Expressão dos genes *hex 110*, *hex 70a*, *hex 70b* e *hex 70c* obtida por RT-PCR semi-quantitativa seguida de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular. Ct: amostra sem cDNA. (B) Produto de digestão dos genes amplificados, assim como do plasmídeo pET-28a. Produto de PCR submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. (C) PCR de extratos das colônias DH5α que foram transformadas com os plasmídeos contendo os genes de hexamerinas. Produto de PCR semi-quantitativa em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. (D) SDS-PAGE do extrato de bactérias BL21 após indução da expressão da proteína HEX 70c.

4. Busca pelos receptores de hexamerinas

4.1. Análises *in silico* de sítios de fosforilação putativos nas hexamerinas preditas

Análises das sequências preditas das hexamerinas de *A. mellifera* utilizando-se o programa NetPhos 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) revelaram a presença de sítios de fosforilação por tirosina quinase (**Tabela VIII**). Quanto maior o valor de *score*, que varia de 0 a 1, maior a probabilidade da sequência analisada constituir um sítio autêntico de fosforilação (Blom *et al.*, 1999). Para as hexamerinas, o *threshold* adotado foi de 0,7 a 1.

Tabela VIII: Sítios putativos de fosforilação nas sequências preditas de hexamerinas de *A. mellifera*.

Nome	Fragmento	Score
HEX 110	FPPVYEILP	0,886
	KDIDYENVQ	0,984
	FTDFYVDLD	0,976
	QEPFYITEP	0,939
	SVDQYQQLK	0,900
	VSEYYQNKP	0,949
HEX 70a	NIDSYTNAA	0,943
	NEAQYIYSL	0,854
	RGEEYLYSH	0,798
	IDSGYILNN	0,761
	NTEFYGSID	0,809
	AASKYQIVP	0,913
	DEIYPNLK	0,922
	IGPKYDSHH	0,783
	SEIFYEKIE	0,923
	DKPLYDFNY	0,962
YDFNYEGPN	0,819	
HEX 70b	MKKTYYNNID	0,726
	GEVSYVSLD	0,973
	HMQKYVQMI	0,918
	SNVKYQVVP	0,968
	LGPKYDEFG	0,806
	ETFKYSSQP	0,839
HEX 70c	NMDMYKDKN	0,982
	SEQKYEVRM	0,954
	FELLYNAKD	0,723
	PDTKYMKFP	0,965
	VNTNYSSKN	0,805
	NMREYNDPE	0,783
	NDPEYKLDY	0,868
	SSSQYHMPK	0,865
YKYKYLNVI	0,810	

4.2. Busca por hexamerinas em amostras de concentrados de membranas do corpo gorduroso

Investigamos a possibilidade das hexamerinas de *A. mellifera* se ligarem à membrana plasmática. Análises por *western blot* com enriquecidos de membranas celulares do corpo

gorduroso de operárias pupas faratas (fase PP) revelaram a presença marcante da HEX 110 e vestígios de HEX 70b e HEX 70c. HEX 70a não foi detectada (**Fig. 26**).

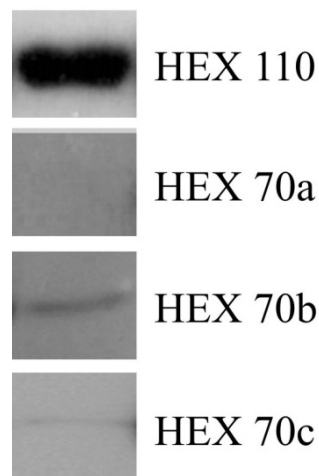


Figura 26: *Western blot* de amostras de enriquecidos de membranas do corpo gorduroso utilizando-se anti-HEX 110, anti-HEX 70a, anti-HEX 70b e anti-HEX 70c.

4.3. Teste de ligação de hexamerinas em extratos enriquecidos de membranas do corpo gorduroso

Amostras de extratos enriquecidos de membranas do corpo gorduroso de larvas L5F, pupas faratas (PP) e adultos faratos (Pbl) foram submetidas a SDS-PAGE (**Fig. 27A**). Os géis foram corados com Coomassie para verificar a eficiência do processo de extração das proteínas. Aliquotas das mesmas amostras foram utilizadas em procedimentos paralelos de SDS-PAGE seguidos de transferência das proteínas para membranas de PVDF por *western blot*. As membranas foram, então, incubadas com hemolinfa coletada de larvas L5F de operárias que apresenta alto conteúdo de hexamerinas. O intuito for verificar possível afinidade entre proteínas do extrato de membranas e proteínas solúveis da hemolinfa (**Fig. 27B**). Os resultados obtidos revelaram que HEX 110 da hemolinfa se liga a uma proteína de aproximadamente 110 kDa presente no extrato de membranas (**Fig. 27B**). A marcação é mais intensa em pupas faratas, fase de intenso sequestro de hexamerinas pelas células do corpo gorduroso (**Fig. 27B**). HEX 70a da hemolinfa se ligou a duas proteínas do extrato de membranas (**Fig. 27C**) com massas moleculares ao redor de 70 kDa. A marcação é mais acentuada nas larvas L5F, fase anterior ao início do sequestro de hexamerinas pelo corpo gorduroso (**Fig. 27C**). HEX 70b se ligou a uma proteína de aproximadamente 70 kDa, aparentemente exclusiva da fase PP (**Fig. 27D**).

A eletroforese (SDS-PAGE) foi então repetida com amostras do extrato de membranas. Em seguida ao procedimento de coloração com Coomassie coloidal, o gel contendo as bandas obtidas dos extratos de membranas foi comparado com as membranas

obtidas dos *western blots* com a finalidade de recortar do gel as bandas correspondentes. As proteínas das bandas foram identificadas por espectrometria de massa (**Fig. 27E**). Os resultados das análises revelaram a presença das três subunidades de hexamerinas HEX 110, HEX 70b e HEX 70c nas amostras de extratos enriquecidos de membranas. Além disso, proteínas como a endoplasmina (componente do retículo endoplasmático envolvido na degradação das proteínas em processo dependente de ubiquitinas) e uma *heat shock protein* de 60 kDa também foram identificadas.

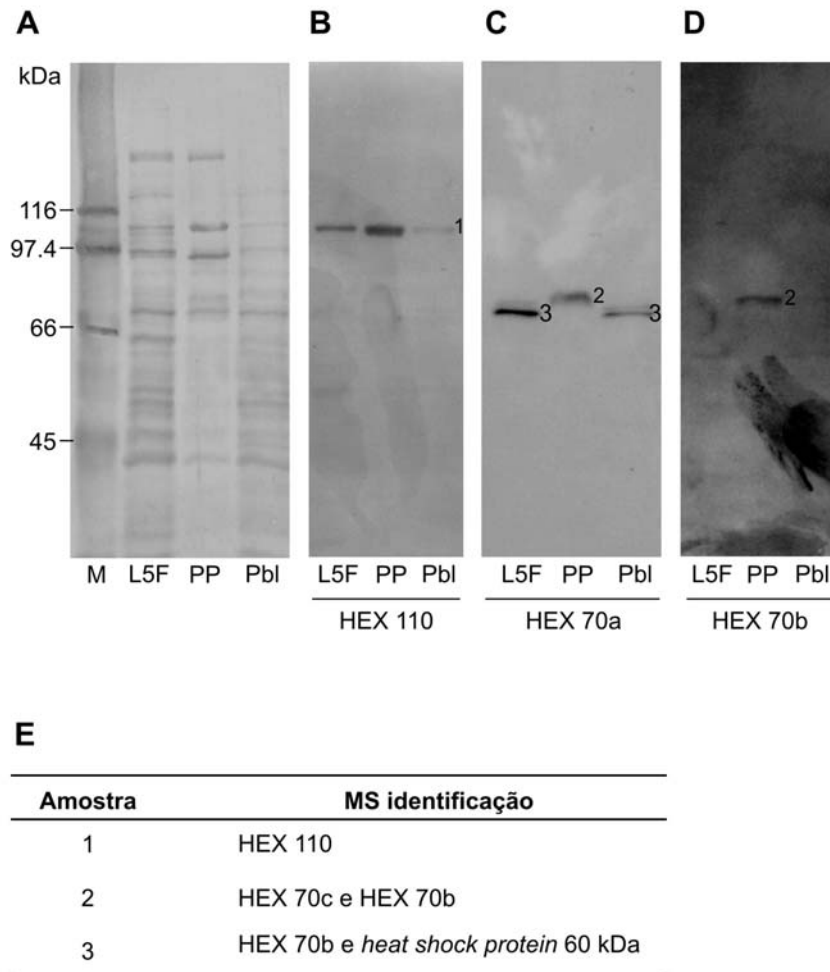


Figura 27: Ligantes de hexamerinas em amostras de enriquecido de membranas de corpo gorduroso. (A) SDS-PAGE do extrato de membranas do corpo gorduroso. SDS-PAGE seguido de *western blot* para as hexamerinas (B) HEX 110, (C) HEX 70a e (D) HEX 70b. M: marcador de peso molecular (kDa) no lado esquerdo da figura (A). L5F: larva de 5º instar em fase de alimentação. PP: pupa fãrata. Pbl: adulto fãrato. Os números de 1 a 3 indicam as bandas analisadas por espectrometria de massa. (E) Resultado obtido por espectrometria de massa.

Discussão

O genoma de *A. mellifera* apresenta quatro genes codificadores de hexamerinas. Estes genes foram sequenciados e a abundância de seus transcritos durante o desenvolvimento das diferentes castas e sexos foi caracterizada (Cunha *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2010). As sequências nucleotídicas obtidas revelaram diferenças estruturais e de organização de íntrons e éxons que, em conjunto com os perfis de mRNAs, a localização subcelular das hexamerinas no corpo gorduroso e nas gônadas, o estudo da regulação hormonal e nutricional, além da análise da estrutura das proteínas, indicam que as hexamerinas são proteínas multifuncionais, ressaltando sua importância no desenvolvimento e fisiologia dos insetos.

1. Hexamerinas no corpo gorduroso

Em concordância com estudos prévios sobre as proteínas da hemolinfa de *A. mellifera* (Danty *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 2006), baixos níveis de expressão dos genes de hexamerinas foram detectados em operárias adultas quando comparados com os níveis de transcritos obtidos em larvas. Dos quatro genes de hexamerinas, *hex 70a* e *hex 110* são os únicos com expressão detectável no corpo gorduroso de adultos. Seus perfis transcricionais diferem entre os adultos de rainhas, zangões e operárias. Níveis de transcritos de *hex 70a* foram muito baixos em rainhas e abundantes em operárias e zangões. Entretanto, em zangões, a abundância é limitada aos 5 primeiros dias após a emergência, já em operárias, se estende até o 30° dia de vida adulta. Estes perfis transcricionais em operárias e zangões são similares aos respectivos perfis de HEX 70a na hemolinfa (Martins *et al.*, 2008) e estão relacionados com a duração da vida adulta. Operárias vivem mais que zangões (Winston, 1991) e seus respectivos padrões de expressão de *hex 70a* refletem a atividade metabólica do corpo gorduroso. Mas a maior expressão de *hex 70a* no corpo gorduroso de operárias adultas, em comparação com rainhas, sugere função na fisiologia das operárias.

Assim como *hex 70a*, o gene *hex 110* está ativo no corpo gorduroso de operárias adultas, mas os transcritos são praticamente ausentes em rainhas e zangões. Apesar da evidente presença de transcritos de *hex 110* em operárias adultas, a subunidade correspondente (HEX 110) não é detectável na hemolinfa (Bitondi *et al.*, 2006), indicando que esta hexamerina não funciona como uma proteína de estocagem neste estágio.

Estes resultados são consistentes com a reindução da expressão de *hex 70a* e de *hex 110* nas abelhas adultas, embora só o produto de *hex 70a* se acumule na hemolinfa neste estágio. A presença de hexamerinas nos insetos adultos pode ocorrer por causa da persistência

de hexamerinas sintetizadas durante o estágio larval, ou devido a indução da atividade gênica especificamente no estágio adulto. Como exemplo, algumas espécies de Lepidoptera que não se alimentam de proteínas na fase adulta podem utilizar o estoque larval de hexamerinas para a produção dos ovos (Wheeler *et al.*, 2000); mRNAs para uma hexamerina específica de adultos aparece em fêmeas de *Musca domestica* só depois da indução por uma dieta rica em proteínas (Capurro *et al.*, 2000). Mas a presença de HEX 70a em abelhas adultas resulta da reindução depois de uma drástica redução dos níveis de transcritos durante a ecdise adulta (Martins *et al.*, 2010).

As rainhas de *A. mellifera* recebem continuamente, via trofalaxis, uma secreção glandular proteínica, a geleia real, que é produzida por operárias nutridoras (Haydák, 1970). As rainhas aparentemente não necessitam da reserva de hexamerinas larvais para a produção de seus ovos, uma vez que a dieta enriquecida de proteínas pode suprir esta demanda. Os nutrientes estruturais e a energia derivados da geleia real servida às rainhas não são utilizados para a síntese e estocagem de hexamerinas (os níveis de transcritos de hexamerinas são muito baixos ou indetectáveis no corpo gorduroso de rainhas adultas) mas devem ser direcionados para a vitelogênese e produção dos ovos. Diferente das rainhas, as operárias normalmente não produzem ovos, embora elas tenham acesso a uma dieta rica em proteínas, pelo menos enquanto são jovens (Hrassnigg e Crailsheim, 1998). O consumo de pólen aumenta a expressão de *hex 70a* e *hex 110* no corpo gorduroso e aumenta a abundância de HEX 70a na hemolinfa das operárias (Bitondi *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008). Aparentemente, o consumo de dieta rica em proteínas causa a reindução de ambos os genes de hexamerinas em operárias adultas, levando à estocagem de HEX 70a na hemolinfa.

O consumo de pólen também provoca o acúmulo de vitelogenina, a proteína do vitelo, na hemolinfa de operárias jovens (Bitondi e Simões, 1996). A vitelogenina é continuamente produzida e estocada na hemolinfa durante as duas primeiras semanas de vida adulta, mas sua concentração na hemolinfa se reduz consideravelmente nas operárias mais velhas que se tornam forrageiras (Rutz *et al.*, 1976; Engels *et al.*, 1990; Hartfelder e Engels, 1998; Piulachs *et al.*, 2003). HEX 70a segue um padrão similar.

Uma vez que as operárias normalmente não se reproduzem e, em geral, têm um ciclo de vida curto, a questão que permanece sem resposta é: por que elas estocam proteínas na hemolinfa? Podemos sugerir que o consumo de pólen pelas abelhas operárias jovens excede a demanda e o excesso é transformado em proteínas de estocagem e outros produtos para serem consumidos mais tarde, quando elas se tornarem forrageiras. Forrageiras se alimentam de néctar (Crailsheim *et al.*, 1992), o qual é composto primariamente por carboidratos (Slansky e Scriber, 1985). Desta forma, o estoque de proteínas sustentaria o metabolismo basal das

operárias durante o forragemanto. Os dados obtidos para HEX 70a (Martins *et al.*, 2008), vitelogenina (Engels *et al.*, 1990; Hartfelder e Engels, 1998; Piulachs *et al.*, 2003) e outras proteínas da hemolinfa (Crailsheim, 1986), que mostram diminuição gradual da concentração destas proteínas nas forrageiras, são consistentes com esta hipótese.

O destino das proteínas de estocagem na hemolinfa de operárias pode não ser fixo, mas dependente do contexto social. Quando há perda da rainha, certas operárias podem ativar seus ovários para a produção de zangões. Suas reservas de proteínas podem então ser direcionadas para a reprodução. Operárias acumulam proteínas de estocagem quando elas ainda são jovens e mais propensas a ativar seus ovários se separadas das rainhas. Foi demonstrado que as operárias adultas de *Camponotus festinatus* não estocam hexamerinas, mas aparentemente fazem uso delas para nutrir as larvas. Mas as hexamerinas se acumulam na hemolinfa destas operárias quando não há larvas na colônia. Também foi observado que as hexamerinas são abundantes em rainhas virgens de *C. festinatus*, mas tornam-se escassas quando elas estão produzindo ovos (Martinez e Wheeler, 1993 e 1994). O mesmo foi observado em cupins (Johnston e Wheeler, 2007).

Utilizando anticorpos específicos investigamos a localização das quatro hexamerinas nas células do corpo gorduroso de operárias no estágio de pupa farata. Neste estágio, a arquitetura típica do corpo gorduroso larval é modificada e as camadas ou aglomerados de células que formam este órgão se dissociam em células individuais (Hoshizaki, 2005). Esta mudança, que caracteriza o início da muda metamórfica nos insetos holometábolos e já foi descrita para *A. mellifera* (Snodgrass, 1956) e outras espécies de abelhas (Cruz-Landim, 2009; Poiani e Cruz-Landim, 2012), é marcada pela drástica diminuição da síntese/secreção de hexamerinas, para sua reabsorção da hemolinfa. Estudos que estabeleceram a correlação entre a diminuição de hexamerinas da hemolinfa e o aparecimento de grânulos no citoplasma dos trofócitos do corpo gorduroso anteciparam a demonstração experimental de que as hexamerinas sequestradas são estocadas na forma de grânulos para futura utilização como fonte de aminoácidos (Locke e Collins, 1968; Tojo *et al.*, 1978). Esta dinâmica de síntese/secreção/sequestro foi deduzida quando comparamos os níveis de HEX 70b na hemolinfa e no corpo gorduroso de *A. mellifera* em metamorfose. Há uma diminuição abrupta de HEX 70b na hemolinfa de pupas faratas (fase PP) e aumento no corpo gorduroso (ver **Fig. 4**). Neste aspecto, HEX 70b é a mais típica entre as hexamerinas de *A. mellifera*. Embora esta dinâmica não seja tão evidente para as outras hexamerinas, todas elas aparecem no corpo gorduroso na fase que antecede a muda metamórfica (L5S) indicando que estão sendo sequestradas. Como descrito para as hexamerinas dos insetos em geral, HEX 70b, HEX 70c e HEX 110 são essencialmente proteínas da metamorfose e sua abundância diminui a níveis

basais antes da ecdise adulta. Entretanto, como demonstrado previamente (Danty *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2008) HEX 70a persiste até nos adultos (veja **Fig. 4**).

Utilizando-se anticorpos específicos e microscopia confocal, as hexamerinas foram localizadas em pequenas e grandes inclusões, similares aos grânulos de proteínas de diferentes tamanhos, no citoplasma dos trofócitos de pupas faratas. O aparecimento dos grânulos de proteínas no corpo gorduroso de *A. mellifera* antes da pupação foi descrito décadas atrás por Bishop (1922; 1923). Utilizando ilustrações esquemáticas, Snodgrass (1956) descreveu a localização destes grânulos na periferia do citoplasma dos trofócitos em pupas faratas de *A. mellifera*, e também comentou que a abundância destes grânulos de proteínas continua a aumentar durante parte do estágio pupal para desaparecer próximo à ecdise adulta. Poiani e Cruz-Landim (2012) também encontraram grandes quantidades de grânulos de proteínas nos trofócitos de pupas faratas. As inclusões, ou grânulos, marcados com anti-HEX 70c ou anti-HEX 70b nos trofócitos foram principalmente localizados na periferia do citoplasma (ver **Fig. 6G, I, J, L**), assim como os grânulos descritos por Snodgrass (1956). Aparentemente, os grânulos marcados com anti-HEX 70b a anti-HEX 70c estão envolvidos na estocagem e reciclagem de HEX 70b e HEX 70c. Grânulos marcados com anti-HEX 110 e anti-HEX 70a foram muito menos abundantes nos trofócitos, mas isto pode ser devido à regionalização do corpo gorduroso. Já foi demonstrado em *D. melanogaster* que a abundância de grânulos de proteínas pode diferir entre as regiões do corpo gorduroso (Tysell e Butterworth, 1978). Os trofócitos mostrados na **Fig. 6** podem ser de diferentes regiões do corpo da pupa farata.

Como proposto (Locke e Collins, 1968), pequenos grânulos de proteínas são inicialmente formados nos trofócitos e mais tarde se fundem com outros grânulos e aumentam de tamanho. É então possível que nos trofócitos mostrados nas **Fig. 6A** (marcados com anti-HEX 110) e **6D** (marcados com anti-HEX 70a) a fusão dos grânulos de proteína tenha apenas se iniciado no momento da coleta do corpo gorduroso.

A presença de hexamerinas no citoplasma dos trofócitos era uma expectativa óbvia, mas nós encontramos pequenas marcações destas hexamerinas no citoplasma dos enócitos. Enócitos diferem dos trofócitos quanto à origem embriológica, morfologia, funções bioquímicas e fisiológicas, sendo necessários para o processamento de lipídeos, crescimento larval e produção de feromônios (Hoshizaki, 2005; Burns *et al.*, 2012). Foi uma surpresa encontrar hexamerinas nos enócitos. Notável, entretanto, foi detectar as quatro hexamerinas no núcleo dos trofócitos, e HEX 110 e HEX 70a no núcleo dos enócitos. A imunolocalização das hexamerinas no núcleo do corpo gorduroso através de microscopia confocal confirmou os resultados obtidos por *western blot* (**Fig. 5**), que tinham detectado as quatro hexamerinas em frações de enriquecidos nucleares do corpo gorduroso.

Corroborando nossos dados sobre a licalização intranuclear das hexamerinas, Begna *et al.* (2012) detectaram HEX 110 no proteoma nuclear de larvas de rainhas e operárias de 4° e 5° instares, utilizando eletroforese bidimensional e espectrometria de massa.

Aqui, nós também mostramos que a injeção de anticorpos contra cada hexamerina na hemocele de operárias em início do desenvolvimento adulto farato provoca diminuição parcial ou total da concentração de hexamerinas na hemolinfa ou no corpo gorduroso, 4 e/ou 24 h após a injeção. A injeção de cada anticorpo não resultou em mortalidade significativa em comparação aos controles. Entretanto, a ecdise para o estágio adulto foi antecipada. Esta resposta ocorreu independentemente do tipo de anticorpo anti-hexamerina injetado, evidenciando a importância de cada hexamerina no tempo de desenvolvimento do adulto farato.

Como pupas e adultos faratos não se alimentam, o seu desenvolvimento é viabilizado por estoques endógenos de nutrientes acumulados durante o estágio larval. Hexamerinas são as principais proteínas de estocagem na hemolinfa larval e a principal fonte de aminoácidos para o desenvolvimento pupal e adulto farato. Funcionando como um fator nutricional, a diminuição natural dos níveis de hexamerinas na hemolinfa e corpo gorduroso pode ter uma função crítica na sinalização do início da ecdise adulta. É possível que a diminuição dos níveis de hexamerinas nos adultos faratos tratados com anticorpo tenha de algum modo antecipado a ecdise em resposta à restrição de aminoácidos derivados das hexamerinas.

Sabe-se que o *status* nutricional das larvas tem importante função no controle do seu tamanho e início da muda metamórfica (Callier e Nijhout, 2011). O início da muda metamórfica depende de um tamanho limite, ou peso crítico, em que os eventos endócrinos levam ao término da alimentação larval e início da metamorfose (Davidowitz *et al.*, 2003; Nijhout *et al.*, 2006). Pode-se hipotetizar que um sinal nutricional também controle o tempo do desenvolvimento do adulto farato até a ecdise, o qual pode ter sido perturbado pela diminuição dos níveis de proteínas de estocagem.

2. Hexamerinas nas gônadas

2.1. Ovários

2.1.1. HEX 70a

Entre os insetos solitários há evidências circunstanciais de que as hexamerinas também são utilizadas para a reprodução. Em espécies de Lepidoptera, por exemplo, foi estabelecida a correlação entre a produção de ovos e a diminuição das reservas de hexamerinas (Pan e Telfer, 1996; Wheeler *et al.*, 2000). Mosquitos autógenos, que produzem

sua primeira leva de ovos sem se alimentar, podem utilizar as proteínas de estocagem larvais, principalmente as hexamerinas, como fonte de aminoácidos para esta finalidade (Wheeler e Buck, 1996; Zakharkin *et al.*, 2001). Também foi sugerido que os aminoácidos provenientes das proteínas de estocagem são utilizados para prover os ovos de *Schistocerca americana* (Hahn e Wheeler, 2003).

Utilizando *western blots*, Martins *et al.* (2010) investigaram a presença de transcritos de hexamerinas nas gônadas de *A. mellifera*. Exceto para *hex 70c*, os transcritos foram abundantes nas gônadas de larvas e pupas de operárias, rainhas e zangões, sugerindo que hexamerinas têm função na diferenciação dos ovários e também na espermatogênese, que ocorre durante o estágio pupal e é finalizada antes da emergência do zangão. Dois dos genes de hexamerinas, *hex 70a* e *hex 110*, também mostraram-se expressos em ovários de rainhas adutas. Transcritos de *hex 110* foram mais abundantes nos ovários de rainhas ovipositoras do que em rainhas virgens.

Sabe-se que o acasalamento provoca mudanças na expressão dos genes de fêmeas de *Drosophila* (McGraw *et al.*, 2004). O acasalamento também provoca mudanças fisiológicas e de comportamento nas rainhas de *A. mellifera*, e embora os mecanismos moleculares envolvidos nesta resposta não sejam conhecidos, foi verificado que eles envolvem expressão diferencial de genes nos ovários. Baseado nisto, a estes genes diferencialmente expressos foram atribuídas funções na ovogênese (Kocher *et al.*, 2008). O aumento de expressão de *hex 110* nos ovários de rainhas ovipositoras sugere uma função relacionada à atividade ovariana e reprodução.

Ovários de rainhas ovipositoras têm menores níveis de transcritos de *hex 70a* que ovários de rainhas recém-emergidas. Mas subunidades de HEX 70a existem em quantidade equivalente nos ovários de ambas, rainhas recém-emergidas e ovipositoras, como confirmado por *western blot* utilizando anticorpo específico (Martins *et al.*, 2008). É possível que assim como a vitelogenina (principal proteína do vitelo dos ovos) que é secretada na hemolinfa e incorporada aos ovários, parte das hexamerinas dos ovários resulte de sequestro dos estoques da hemolinfa.

Nossos procedimentos de imunolocalização por microscopia confocal mostraram que HEX 70a está localizada no núcleo de células germinativas e somáticas dos ovários e testículos. Esta localização, inesperada para uma proteína de estocagem, implica em funções regulatórias e estruturais nos núcleos. É a primeira vez que uma hexamerina é detectada no núcleo, HEX 70a cumpre todos os critérios para sua inclusão na classe das hexamerinas. Ela apresenta os três domínios de hemocianinas que são típicos de todas as hexamerinas. Ela é maciçamente sintetizada pelo corpo gorduroso durante o estágio de alimentação larval e

abundantemente estocada na hemolinfa (Danty *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2008). Esta característica está em conformidade com a função das hexamerinas prover aminoácidos para o desenvolvimento pupal e adulto farato.

Em sua estrutura nativa, HEX 70a é um oligômero (ver item III 2 - Resultados) e pode atuar no núcleo na forma monomérica, como recentemente demonstrado para a *royalactin*, um monômero de 57 kDa que funciona como um fator determinante de casta em *A. mellifera*. *Royalactin* forma o oligômero MRJP1, um membro da família das *Major Royal Jelly Proteins*, que está presente não só na geleia real secretada pelas glândulas hipofaríngeas das operárias, mas também na hemolinfa e em outros tecidos de *A. mellifera* (Kamakura, 2011).

A colocalização nuclear de HEX 70a com o marcador da fase S do ciclo celular (EdU) indicou que a HEX 70a pode ter função na replicação do DNA para a proliferação celular ou poliploidização. Esta hipótese é apoiada por dados da literatura. Foi demonstrado que o corpo gorduroso ou extratos de corpo gorduroso (de espécies de *Lepidoptera*) são capazes de estimular a proliferação de células tronco intestinais em sistema *in vitro* (Loeb e Hakim, 1996; Sadrud-Din *et al.*, 1996). Curiosamente, o fator do corpo gorduroso que induz a proliferação celular foi identificado como sendo uma subunidade de arilforina de 77 kDa (α -arilforina) (Blackburn *et al.*, 2004). Baixa concentração de α -arilforina purificada foi suficiente para estimular a proliferação das células tronco intestinais, excluindo um simples efeito nutricional. Experimentos usando marcação com BrdU confirmaram que a arilforina induz a síntese de DNA. A atividade de estimulação mitogênica da arilforina foi também detectada *in vivo* em insetos que mostraram um aumento nas taxas de crescimento depois de serem alimentados com uma dieta artificial contendo a arilforina (Blackburn *et al.*, 2004; Cermenati *et al.*, 2007). Portanto, metodologias experimentais muito distintas daquelas utilizadas nesta tese, nos levam a mesma conclusão, ou seja, que as arilforinas têm função na proliferação celular.

Verificamos também núcleos de células dos ovariolos que mostraram imunofluorescência para HEX 70a, mas não para EdU (o reverso não foi observado). Isto pode indicar que HEX 70a não tem função exclusiva na fase S do ciclo celular, ou que a estabilidade da proteína no interior do núcleo não é restrita à fase S. A hipótese de que HEX 70a está envolvida na proliferação celular foi reforçada pelos resultados dos experimentos onde o anticorpo anti-HEX 70a foi injetado em pupas faratas de rainhas, revelando um efeito negativo sobre a largura dos ovariolos que aumentam de tamanho via proliferação celular.

HEX 70a foi localizada no núcleo dos cistócitos dos ovários de operárias em início da fase pupa farata. Cistócitos são mitoticamente ativos, como mostrado aqui por marcação com EdU, e através de marcação por BrdU (*5-bromo-2'-deoxyuridine*) (Tanaka e Hartfelder,

2004). Cada cistócito prolifera para formar um clone de cerca de 48 ou mais células (Snodgrass, 1956; Büning, 1994) que se organiza como uma roseta e contém uma estrutura específica da linhagem germinativa, o polifusoma (Lin *et al.*, 1994). A proteína actina foi identificada como sendo um proeminente componente do polifusoma no centro das rosetas (Gutzeit *et al.*, 1993; Schmidt-Capella e Hartfelder, 2002). Um cistócito em cada roseta entrará em meiose e iniciará o crescimento e, então, se tornará morfologicamente distinguível das células dos cistócitos destinadas a serem nutridoras (*nurse cells*). As rosetas são gradualmente transformadas em folículos iniciais, com o fusoma sendo convertido em canais em anel que conectam o ovócito em desenvolvimento com as células nutridoras, e estas células entre si. Cada *cluster* de ovócito e células nutridoras é envolvido pelas células foliculares e serão divididos em câmara do ovo, onde a ovogênese e vitelogênese acontecem, e uma câmara trofocítica (ou câmara das células nutridoras) (Büning, 1994; Tanaka e Hartfelder, 2004; Wilson *et al.*, 2011). Enquanto este padrão é comum em rainhas, a progressão da ovogênese em operárias só ocorrerá se elas forem liberadas do efeito repressor do feromônio da rainha (Page e Erickson, 1988).

As células nutridoras passam por uma série de ciclos endomitóticos (Büning, 1994; Cruz-Landim, 2009). Esta característica, típica de um ovário meroístico, é uma estratégia evolutiva para aumentar a síntese de material a uma taxa elevada durante a ovogênese, e exportá-los para o ovócito em crescimento por meio dos canais em anel (Engels, 1968; Spradling, 1993). Durante a ovogênese de *A. mellifera*, as células foliculares se transformam em um espesso epitélio ao redor do ovócito em crescimento e em uma camada de células achatadas ao redor do agrupamento de células nutridoras (Fleig *et al.*, 1991). Para acompanhar o intenso crescimento do ovócito durante a ovogênese e vitelogênese, as células foliculares que o circundam passam por diversos ciclos de divisões mitóticas. Dados de nosso laboratório (Macedo LMF, comunicação pessoal) revelaram significativo aumento do número de células foliculares conforme o ovócito se desenvolve. Consistente com uma função na replicação de DNA, HEX 70a foi localizada no núcleo das células foliculares em proliferação que recobrem o ovócito em crescimento em ovários de rainhas. O padrão de marcação de HEX 70a nos núcleos difere entre as células nutridoras e foliculares. Os *foci* de HEX 70a se assemelham a pequenos pontos distribuídos por todo o núcleo das células nutridoras e são maiores e concentrados em áreas nucleares bem definidas nas células foliculares. HEX 70a também foi localizada no núcleo das células do filamento terminal, onde foi demonstrada a presença de células em divisão (Tanaka e Hartfelder, 2004), provavelmente células tronco da linhagem germinativa. Só nesta região do ovariolo pudemos distinguir marcação de HEX 70a

no citoplasma. Não obtivemos êxito em localizar HEX 70a no núcleo dos ovócitos em meiose.

A presença de HEX 70a no núcleo das células germinativas e somáticas de ovários sugere função na regulação, organização estrutural nuclear e/ou proliferação celular.

Aqui é preciso considerar que em contraste às células dos ovários que são mitoticamente ativas, como mostrado por marcação com BrdU (*5-bromo-2'-deoxy-uridine*) (Tanaka e Hartfelder, 2004) e também com EdU, as células do corpo gorduroso de pupas faratas não estão se dividindo, mas estão em processo de dissociação para a metamorfose. Qualquer que seja a função das hexamerinas no núcleo das células do corpo gorduroso de pupas faratas, certamente não está relacionada à proliferação celular. Uma proteína de estocagem de *Bombyx mori* (SP2), que apresenta cerca de 25-30% de similaridade com as hexamerinas de *A. mellifera* suprimiu a fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos em cultivos de células HeLa (Rhee *et al.*, 2007). Este intrigante resultado pode indicar que durante a metamorfose, as hexamerinas protegem certas células do corpo gorduroso da morte celular programada, mas isto tem que ser ainda investigado

2.1.2. HEX 110

Estudos prévios (Martins *et al.*, 2010), utilizando RT-PCR semi-quantitativa e quantitativa, indicaram a presença de mRNA do gene *hex 110* nos ovários de rainhas ovipositoras, sugerindo possível função desta proteína durante o processo reprodutivo. Os procedimentos de imunolocalização e microscopia confocal confirmaram marcações de HEX 110 no filamento terminal, germário e vitelário de ovários de rainhas ovipositoras. HEX 110 foi visualizada no núcleo e citoplasma das células do filamento terminal e região proximal do germário, locais onde se encontram os precursores das células foliculares e germinativas. A presença de pontes intercelulares e de centríolos no filamento terminal sugerem a ocorrência de proliferação celular (Cruz-Landim, 2009) e isto reforça a observação de Tanaka e Hartfelder (2004) em seus experimentos de marcação de ovários com BrdU.

Conforme o ovócito cresce no ovário da rainha e as câmaras nutridoras e ovocíticas vão se diferenciando na região do vitelário, a hexamerina HEX 110 passa a ser detectada apenas no citoplasma das células foliculares que circundam estas câmaras.

Em operárias adultas, transcritos de *hex 110* não foram detectados nos ovários. Isto não exclui a possibilidade de transferência de HEX 110 da hemolinfa para os ovários, o que nos motivou a utilizar o anticorpo anti-HEX 110 em experimentos de imunolocalização nos ovários de operárias adultas. HEX 110 foi detectada no núcleo das células do filamento

terminal, do germário e das células foliculares que envolvem a câmara ovocítica. Portanto, assim como HEX 70a, HEX 110 também se localiza no núcleo de células dos ovários.

No filamento terminal e na região proximal do germário, HEX 110 aparentemente localiza-se nos nucléolos. Mas esta marcação não é mais observada nos folículos em crescimento. Os nucléolos desaparecem dos ovários de *Drosophila melanogaster*, quando os ovócitos passam a ter alguma atividade transcricional (Liu *et al.*, 2006) que ocorre durante o crescimento do ovócito conforme demonstrado por marcações com BrdU (Bogolyubov, 2007). É possível que a não detecção de HEX 110 nos núcleos de folículos em crescimento deva-se ao desaparecimento dos nucléolos, mas isto tem que ser mais profundamente investigado.

2.2. Testículos

A localização intranuclear de HEX 70a também foi detectada nas células germinativas e somáticas da gônada masculina em desenvolvimento. Marcações citoplasmáticas de HEX 70a foram observadas somente nos estágios iniciais do desenvolvimento do testículo. Com o progresso da espermatogênese a marcação de HEX 70a se torna exclusivamente intranuclear. Este resultado se assemelha ao que ocorre nos ovários, onde HEX 70a se localiza no citoplasma de células do filamento terminal, que ainda não iniciaram a ovogênese, mas conforme os folículos crescem, passa a se localizar exclusivamente nos núcleos.

Nas pupas de zangões, os *clusters* de espermatogônias secundárias, também denominadas de cistócitos, são circundados por células somáticas ricas em actina. No interior destes cistos, as espermatogônias se tornam espermatócitos, que então iniciam a divisão meiótica (Louveaux, 1977). Dentro do cisto, as células germinativas estão conectadas por pontes citoplasmáticas, os canais em anel, similares àqueles vistos nos ovaríolos. Assim, a presença de HEX 70a nos núcleos dos cistócitos e das células somáticas dos zangões também pode estar associada à proliferação celular. Entretanto, HEX 70a também foi detectada no núcleo de espermátides e de espermatozoides que não estão em processo de proliferação.

Nos zangões de *A. mellifera*, o processo inteiro da espermatogênese, das células germinativas indiferenciadas até a formação do espermatozoide, ocorre durante o desenvolvimento pós-embriônico e é essencialmente concluído antes da emergência do zangão da célula de cria. Os espermatozoides então migram dos testíolos para as vesículas seminais onde são estocados por poucos dias antes do vôo para fecundar a rainha (Snodgrass, 1956). A espermatogênese em abelhas se caracteriza por (1) uma meiose atípica (zangões são originários de ovos haplóides) durante a qual os espermatozoides permanecem interconectados por pontes citoplasmáticas, (2) formação e subsequente eliminação dos

centríolos excedentes derivados da primeira divisão meiótica, e (3) divisão desigual dos espermátocitos secundários (Hoage e Kessel, 1968).

Durante a espermatogênese em *D. melanogaster*, formam-se cistos de 64 espermátides interconectadas, derivadas de uma única célula germinativa precursora. Estas espermátides sinciciais são finalmente separadas em espermatozoides em um processo chamado de individualização, que ocorre simultaneamente para todas as 64 espermátides. A polimerização da actina é importante para a individualização, e este processo é mediado por cones de actina que se formam ao redor de cada núcleo dos espermatozoides. Os cones de actina adquirem um formato triangular e se movem para longe do núcleo do espermatozoide, provocando a formação do corpo residual que contém citoplasma e organelas que serão descartados. Este processo leva à transição das espermátides sinciciais para os espermatozoides individualizados (Noguchi e Miller, 2003).

Durante a espermatogênese de zangões detectamos marcação de HEX 70a no núcleo das espermátides sinciciais, posteriormente à localização dos cones de actina, e também no núcleo dos espermatozoides individualizados. A presença de HEX 70a no núcleo das espermátides em diferenciação e nos espermatozoides certamente não pode estar associada à proliferação celular, mas sugere uma nova e distinta função para esta proteína durante a espermatogênese.

3. Hexamerinas e o HJ

Os quatro genes codificadores de hexamerinas em *A. mellifera* são diferencialmente expressos nos diferentes morfotipos (operárias, rainhas e zangões) durante o período de transição larval-pupal (Martins, 2008; Martins *et al.*, 2010). A diferença mais marcante ocorreu durante a fase de alimentação do 5º instar larval (L5F), onde foram observados os maiores níveis de transcritos de *hex 110*, *hex 70a* e *hex 70b* em operárias e zangões quando comparados aos de rainhas. Este é um resultado muito interessante se comparado com os títulos de HJ neste estágio, maiores em rainhas do que em operárias e zangões (Rembold, 1987; Rachinsky *et al.*, 1990). Sabe-se que o HJ tem função central na diferenciação das castas em *A. mellifera*. Os títulos deste hormônio geram respostas fisiológicas específicas em larvas: altos títulos de HJ induzem o desenvolvimento de rainhas e baixos títulos de HJ especificam o fenótipo de operárias (Wirtz e Beetsma, 1972; Rembold *et al.*, 1974). A relação inversa entre os níveis de transcritos de hexamerinas e os títulos de HJ leva-nos a especular se, como proposto para os cupins *Reticulitermes flavipes* (Zhou *et al.*, 2006a e b; Zhou *et al.*, 2007; Scharf *et al.*, 2007), as hexamerinas de *A. mellifera* podem funcionar como proteínas ligadoras de HJ. Por se ligarem e controlarem os níveis de HJ, as hexamerinas desta espécie

de cupim foram relacionadas ao processo de diferenciação de castas. Aplicando este modelo para *A. mellifera*, podemos hipotetizar que títulos altos de HJ excedem a capacidade de ligação das hexamerinas. Em consequência, o HJ livre interage com receptores específicos e promove o desenvolvimento da rainha. Com exceção de *hex 70c*, todos os genes de hexamerinas mostraram expressão significativamente maior em larvas de operárias L5F (apresentam baixos títulos de HJ) que em larvas de rainhas no mesmo estágio do desenvolvimento (apresentam altos títulos de HJ) (Martins, 2008; Martins *et al.*, 2010). O 5º instar larval é um período crítico para a determinação de castas em *A. mellifera*. Se as hexamerinas de fato se ligam ao HJ, também contribuem para a diferenciação da larva bipotente em rainha operária.

As hexamerinas podem não se ligar diretamente ao HJ, mas podem fazer parte de um complexo de proteínas envolvido no sequestro e transporte deste hormônio. A primeira demonstração física desta interação entre o HJ e um complexo de proteínas revelou a presença de duas hexamerinas (uma delas é uma arilforina) e uma lipoforina, além da proteína específica de ligação ao HJ, JHBP (*Juvenile hormone binding protein*), neste complexo (Zalewska *et al.*, 2009). Esta interação implica em importante participação das hexamerinas na regulação dos níveis e ação do HJ, mesmo não se ligando diretamente a ele.

A possibilidade das hexamerinas de *A. mellifera*, e de outros insetos, atuarem como proteínas ligadoras de HJ, assim influenciando na regulação dos níveis deste hormônio e, conseqüentemente, em aspectos essenciais do ciclo de vida, requer investigação. O primeiro passo nesta direção é a purificação parcial ou total das hexamerinas.

Além da hipotética função de “ligar” ao HJ, a expressão dos genes de hexamerinas de *A. mellifera* é induzida por este hormônio. Nossos resultados mostraram forte e positiva influência do HJ sobre a expressão dos genes *hex 70b* e *hex 70c*, e um efeito mais sutil sobre a expressão de *hex 70a* e *hex 110*. Estes resultados foram reforçados pela identificação, na região 5' UTR dos quatro genes de hexamerinas, de potencial sítio de ligação para a proteína Usp, a qual integra o complexo receptor de HJ (e ecdisteróides) (Martins *et al.*, 2010). Estes dados indicam que o HJ regula a atividade dos genes de hexamerinas. A **Fig. 28** resume os dois aspectos da relação entre as hexamerinas e o HJ.

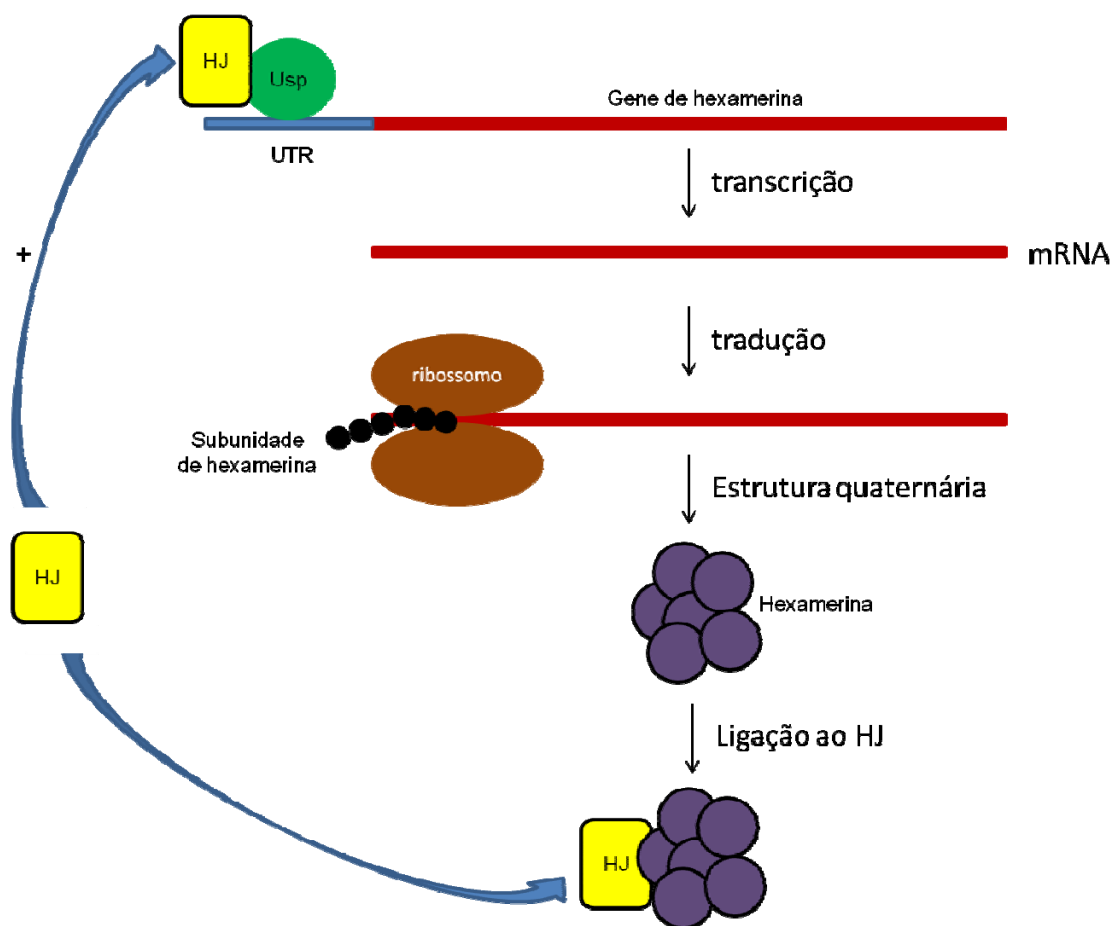


Figura 28: Esquema das possíveis relações entre o HJ e as hexamerinas de *A. mellifera*. O HJ em associação com a proteína Usp regula a transcrição dos genes de hexamerinas. As hexamerinas se ligam ao HJ modulando seus títulos e sua ação.

4. Hexamerinas e formação da cutícula

HEX 70a contém alta proporção de aminoácidos aromáticos (18,2%), o que a torna um membro da subclasse das hexamerinas, as arilforinas, as quais têm sido relacionadas à formação da cutícula. Aminoácidos aromáticos são necessários para o processo de esclerotização do exoesqueleto (Munn *et al.*, 1967; Webb e Riddiford, 1988; Wu e Tischler, 1995; Pan e Telfer, 1996 e 1999). Como demonstrado aqui, a inativação de HEX 70a *in vivo* pela injeção de anti-HEX 70a em pupas de operárias visivelmente interferiu no processo de formação da cutícula adulta e este efeito foi mais evidente na cutícula das pernas. O *knockdown* de HEX 70a na hemolinfa (e talvez no corpo gorduroso) provocado pela injeção do anticorpo específico foi suficiente para afetar a formação da cutícula, mesmo na presença de outra arilforina, HEX 70b, também presente no corpo gorduroso de adultas faratas (ver **Fig. 4**). Isto indica que HEX 70a tem participação essencial na formação da cutícula.

5. Hexamerinas e a dieta alimentar

Os genes codificadores de hexamerinas são regulados nutricionalmente no corpo gorduroso de operárias adultas. Mesmo o gene *hex 70b*, com expressão basal nas operárias adultas, pode ser re-induzido pela dieta. Dieta alimentar rica em pólen, a principal fonte de proteínas para as abelhas, induz o acúmulo de transcritos destes genes (Bitondi *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2008).

As operárias nutridoras que alimentam as larvas, tanto de operárias quanto de rainhas, produzem geleia real em suas glândulas hipofaríngeas a partir do alimento que consomem (Ricciardeli D'Albore e Battaglini Bernardini, 1978; Biondi *et al.*, 2003). Enquanto exercem a função de nutridoras, as operárias consomem pólen (Winston, 1991). Assim, alterando a quantidade de pólen oferecido às colmeias foi possível influenciar o consumo e, por extensão, o *status* nutricional das larvas, e assim, verificar o efeito sobre a expressão gênica. Verificamos que a abundância dos mRNAs de genes que codificam proteínas de estocagem, como hexamerinas e lipoforina, foi alterada nas larvas, dependendo da dieta oferecida à colônia. A manipulação da dieta não alterou somente a expressão destes genes, uma vez que em abelhas *A. mellifera* adultas, a alteração na alimentação gera uma cascata de eventos metabólicos capaz de influenciar a expressão dos genes da via de insulina, e os títulos de ecdisteróides e do hormônio juvenil (Edgar, 2006). Sabe-se que o alimento ingerido pelas larvas é ainda capaz de gerar uma série de sinais específicos para o crescimento de tecidos periféricos e produção de peptídeos de insulina (ILPs) pelas células neurosecretoras (Rulifson *et al.* 2002; Ikeya *et al.* 2002; Broughton *et al.* 2005). Os ILPs ativam o sistema-alvo da rapamicina (IIS-TOR), promovendo o crescimento (Zhang *et al.* 2000; Oldham *et al.* 2000; Oldham e Hafen 2003). Quando comparamos as colmeias que receberam dieta contendo 5 ou 20% de pólen encontramos níveis mais baixos de mRNA para o gene de insulina (*ilp2*) naquelas alimentadas com baixo teor de pólen, mas não observamos alteração na expressão de *TOR* e *Chico* (*insulin receptor substrate* - IRS). No entanto, a dieta contendo 20% de pólen foi capaz de induzir a expressão dos genes codificadores de receptores de ecdisteróides, EcRa e o EcRb, mas não de Usp. A elevada concentração de pólen no alimento também elevou os níveis de mRNA dos genes codificadores de produtos das vias de síntese (*mfe2*) e degradação (*jhe* e *jheh*) do HJ.

Sabe-se desde longa data que larvas de *A. mellifera* até os 3 dias de vida são bipotentes e podem se desenvolver em operárias ou rainhas dependendo da qualidade e quantidade de alimento recebido das operárias nutridoras. Larvas destinadas a serem operárias recebem geleia real acrescida de pólen e mel, enquanto que larvas de rainhas recebem somente geleia real (Winston, 1991). Para verificar o efeito da dieta larval sobre os níveis de expressão dos

genes de hexamerinas durante o período de determinação de castas, transferimos larvas de 1º instar (L1) para alvéolos de operárias e cúpulas de rainhas onde foram mantidas por 4 dias, ou 2 dias, quando trocamos as larvas que estavam nas cúpulas de rainha para os alvéolos de operárias e vice-versa.

Análises por RT-PCR semi-quantitativa e *western blot* do corpo gorduroso destas larvas revelaram que apenas o gene *hex 70a* teve sua expressão modulada diferentemente dependendo do tipo de dieta oferecida às larvas. Corpo gorduroso de larvas mantidas exclusivamente com dieta de rainhas durante 4 dias apresentou baixos níveis de mRNA quando comparado àquele extraído de larvas mantidas exclusivamente com dieta de operária durante 4 dias. Nível intermediário de transcritos foi verificado em larvas mantidas 2 dias em cada dieta. Portanto, a expressão do gene *hex 70a* é sensível à dieta alimentar que determina as castas, mas isto não foi verificado para os outros genes de hexamerinas.

É difícil explicar porque *hex 70b*, *hex 70c* e *hex 110* não responderam à variação da dieta alimentar. É possível que estendendo-se o período do experimento se consiga obter uma resposta mais clara.

O resultado obtido para *hex 70a* (maior expressão em larvas de operárias que de rainhas) é semelhante ao obtido de larvas de operárias de 5º instar (L5F), as quais também têm níveis de transcritos de *hex 70a* significativamente mais elevados que larvas de rainhas no mesmo estágio (Martins *et al.*, 2010). Este resultado leva-nos a especular se, como foi proposto para a espécie de cupim *Reticulitermes flavipes* (Zhou *et al.*, 2006a; Zhou *et al.*, 2006b; Zhou *et al.*, 2007; Scharf *et al.*, 2007), maiores níveis de hexamerinas em operárias teriam como consequência a diminuição dos títulos de HJ, ao contrário do que aconteceria nas rainhas. Estudos são necessários para investigar esta hipótese.

6. Caracterização da hexamerinas

As hexamerinas são proteínas com massa molecular estimada ao redor de 500 kDa e compostas por seis subunidades em geral com cerca de 70 a 85 kDa. Mas algumas hexamerinas podem apresentar maior massa, por exemplo, HEX 110 de *A. mellifera* e HEX 102 e HEX 109 de *Nasonia* (Martins *et al.*, 2010), além de uma molécula homóloga de *Drosophila*, FBP1 (*fat body protein 1*) (Burmester *et al.*, 1999), têm massa molecular maior que 100 kDa. A estrutura hexamérica vem em geral sendo inferida por meio de PAGE não desnaturante e desnaturante (Telfer e Kunkel, 1991). Mas muitos fatores contribuem para alterar a mobilidade eletroforética das proteínas e, conseqüentemente, tornar imprecisa a determinação da massa molecular (Ryan *et al.*, 1985). Dessa forma a massa molecular inferida da sequência de DNA pode diferir daquela estimada por SDS-PAGE (Willott *et al.*,

1989). Em busca de melhor definição dos resultados, outras metodologias podem ser adotadas, como a ultra-centrifugação analítica (Ryu *et al.*, 2009) e o *crosslinking* (Shapiro *et al.*, 1992; Koopmanschap *et al.*, 1992).

Recentemente, Kayser *et al.* (2009) identificaram uma hexamerina de *C. vinula* com massa de aproximadamente 500 kDa, determinada por diversos métodos, composta de 6 subunidades diferentes de aproximadamente 85 kDa. Também foram observados oligômeros com metade da massa molecular de 500 kDa, provavelmente trímeros formados pela dissociação do hexâmero nativo. Dessa forma, o complexo hexamérico pode ser um dímero de trímeros. Markl *et al.* (1992) chegaram à mesma conclusão ao analisar arilforinas de moscas varejeiras.

Análises por cromatografia de filtração em gel associadas a eletroforese em gel de poliacrilamida, espectrometria de massa e *western blot* mostram que, em *A. mellifera*, os hexâmeros apresentam massa molecular ao redor de 660 kDa, mas foram eluídos na mesma fração, não sendo possível separá-los por este tipo de cromatografia. Resultados obtidos por cromatografia de troca-iônica sugerem que os oligômeros sejam heterogêneos, já que duas hexamerinas, a HEX 70b e a HEX 70c foram eluídas na mesma fração.

Iniciamos a produção *in vitro* destas hexamerinas, com o intuito de tê-las separadas e puras para esclarecer quais as possíveis combinações na formação de um hexâmero por meio de ensaios por calorimetria. Bactérias foram transformadas para a produção destas proteínas. Ensaios de indução estão em andamento.

Ao mesmo tempo, e utilizando um procedimento relativamente simples, verificamos se as hexamerinas da hemolinfa se associam a extratos de membranas do corpo gorduroso. Hexamerinas sintetizadas durante o estágio de alimentação larval e estocadas na hemolinfa, são seqüestradas pelo corpo gorduroso pré-pupal, pupal e adulto-farato (Ismail e Dutta-Gupta, 1990; Haunerland, 1996; Burmester e Scheller, 1999). A seletividade do processo de sequestro das hexamerinas requer a presença de um receptor na membrana das células do corpo gorduroso. Surpreendentemente, os receptores de hexamerinas não pertencem a nenhuma classe de receptores conhecida, mas são semelhantes aos seus próprios ligantes, as hexamerinas (Burmester e Scheller, 1996).

Embora tenha havido esforços para caracterizar bioquimicamente estes receptores em *C. cephalonica*, *C. vicina*, *D. melanogaster*, *H. zea*, *Sarcophaga peregrina* (Ueno e Natori, 1984; Burmester e Scheller, 1995a; Chung *et al.*, 1995; Burmester *et al.*, 1999; Damara *et al.*, 2010), nenhum domínio típico transmembrana foi encontrado nas sequências destas proteínas (Burmester e Scheller, 1995b). Há evidências de que os receptores de hexamerinas têm entre 80 e 130 kDa e sua fosforilação é mediada por uma tirosina quinase em presença de 20-

hidroxiecdisona (20E) (Ueno e Natori, 1984; Wang e Haunerland, 1994a e b; Chung *et al.*, 1995; Burmester e Scheller, 1997; Kirankumar *et al.*, 1997; Burmester e Scheller, 1999; Arif *et al.*, 2003).

Análises *in silico* das sequências de aminoácidos das subunidades de hexamerinas de *A. mellifera* revelaram sítios de fosforilação por tirosina quinase. Por meio de *western blot* verificamos a presença de três (HEX 110, HEX 70b e HEX 70c) das quatro hexamerinas em concentrados de membranas do corpo gorduroso.

Os testes para verificar se proteínas da hemolinfa se ligam a proteínas de enriquecidos de membranas mostraram que HEX 110 só interage com a HEX 110; HEX 70a interage com a HEX 70b e HEX 70c; HEX 70b se liga a HEX 70b e HEX 70c.

Este resultado mostra interação entre as subunidades nas membranas celulares, mas não esclarece sobre qual possível receptor.

Estudo recente sugere que o receptor de hexamerinas é uma proteína ancorada à face externa da membrana plasmática por meio de ligação covalente com o glicolípido glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Budatha *et al.*, 2011). Proteínas ancoradas a GPI apresentam funções variadas (ativação celular, transdução de sinal, hidrólise de proteínas da matriz extracelular, adesão celular) e podem funcionar como receptores e mediar o sequestro de ligantes por meio de fosforilação. A ligação dos receptores ancorados a GPI promove um aumento da concentração local das hexamerinas o que otimiza o sequestro ou endocitose (Abrami *et al.*, 2003; Nohe *et al.*, 2006).

Conclusão

Nossos estudos revelaram que as hexamerinas de *A. mellifera* são mais do que simples proteínas de estocagem ou reservas de aminoácidos. A variação da abundância das hexamerinas no corpo gorduroso e na hemolinfa, durante e após a muda metamórfica, é consistente com a dinâmica temporal de estocagem na hemolinfa durante o estágio larval para reciclagem no corpo gorduroso e utilização durante o estágio pupal. A localização das quatro hexamerinas (HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c e HEX 110) no citoplasma de células do corpo gorduroso reforça esta função canônica. HEX 70b, HEX 70c e HEX 110 foram também localizadas em enriquecidos de extratos de membranas do corpo gorduroso podendo estar associadas ao processo de endocitose. Surpreendente foi verificar que as quatro hexamerinas se localizam nos núcleos das células do corpo gorduroso e, além disto, duas delas (HEX 70a e HEX 110) se localizam no citoplasma e núcleo de células germinativas e somáticas dos ovários e testículos. A localização nuclear supõe função reguladora ou estrutural, ainda não descrita. A co-localização de HEX 70a e um marcador de fase S do ciclo celular (EdU) nos núcleos de células ovarianas sugere que HEX 70a tem função na proliferação celular para o desenvolvimento e maturação das gônadas. A inativação *in vivo* de HEX 70a por meio de injeção de anticorpo específico prejudicou o crescimento dos ovariolos, reforçando a hipótese de função na proliferação celular, além de impedir a perfeita formação e esclerotização da cutícula, e sinalizar para a antecipação da ecdise.

Experimentos *in vivo* mostraram que a expressão dos genes de hexamerinas é regulada pela dieta alimentar e pelo título de HJ. Análises *in silico* identificaram sítio de ligação à proteína Usp (receptor de HJ) na região 5'UTR de cada gene de hexamerina, reforçando a evidência de que o HJ regula a expressão dos genes de hexamerinas.

Na tentativa de purificar as quatro hexamerinas foram realizadas cromatografias de filtração e troca iônica. Estes procedimentos estão em andamento, mas há indícios do caráter heterogêneo dos hexâmeros, formados por diferentes subunidades de hexamerinas. Em paralelo, iniciamos os procedimentos de expressão *in vitro* das quatro hexamerinas em bactérias, com o objetivo de obtê-las puras para caracterização da estrutura e de interações entre as subunidades e com outras moléculas.

Referências Bibliográficas

Abrami L, Fivaz M, Glauser P-E, Sugimoto N, Zurzolo C, van der Goot FG (2003) Sensitivity of polarized epithelial cells to the pore-forming toxin aerolysin. *Infect Immun* 71: 739–746.

Adams J, Rothman ED, Kerr WE, Paulino Simões ZL (1977) Estimation of number of sex alleles and queen matings from diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera*. *Genetics* 86: 583-596.

Andersen SO (2005) Cuticular sclerotization and tanning. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (Eds). *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol 4. Oxford: Elsevier Pergamon Press, pp. 145-170.

Arif A, Scheller K, Dutta-Gupta A (2003) Tyrosine kinase mediated phosphorylation of the hexamerin receptor in the rice moth *Corcyra cephalonica* by ecdysteroids. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 921-928.

Barchuk AR, Cristino AS, Kucharski R, Costa LF, Simões ZLP, Maleszka R (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev Biol* 7: 70.

Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeasts C, Eddy SR (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acid Res* 32: D138-141.

Begna D, Han B, Feng M, Fang Y, Li J (2012) Differential expressions of nuclear proteomes between honeybee (*Apis mellifera* L.) queen and worker larvae: a deep insight into caste pathway decisions. *J Proteome Res* 11: 1317–1329.

Beintema JJ, Stam WT, Hazes B, Smidt MP (1994) Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (hexamerins). *Mol Biol Evol* 11: 493-503.

Biondi C, Bedini G, Felicioli A (2003) Gelatina reale: metodologia proposta per la determinazione dell' origine geografica e della qualità. *Apitalia* 526: 32-37.

Bishop GH (1920) Fertilization in the honeybee. I. The male sexual organs: their histological structures and physiological functioning. *J Exp Zool* 31: 225-265.

Bishop GH (1922) Cell metabolism in the insect fat body. I. Cytological changes accompanying growth and histolysis of the fat body of *Apis mellifica*. *J Morphol* 36: 567-601.

Bishop GH (1923) Cell metabolism in the insect fat body. II. A functional interpretation of the changes in structure in the fat body cells of the honey bee. *J Morphol* 37: 533-553.

Bitondi MM, Nascimento AM, Cunha AD, Guidugli KR, Nunes FM, Simões ZL (2006) Characterization and expression of the Hex 110 gene encoding a glutamine-rich hexamerin in the honey bee, *Apis mellifera*. *Arch Insect Biochem Physiol* 63: 57-72.

Bitondi MMG, Simões ZLP (1996) The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin, and juvenile hormone titers in Africanized *Apis mellifera* workers. *J Apic Res* 35: 27-36.

Blackburn MB, Loeb MJ, Clark E, Jaffe H (2004) Stimulation of midgut stem cell proliferation by *Manduca sexta* a-arylphorin. *Arch Insect Biochem Physiol* 55: 26-32.

Blom N, Gammeltoft S, Brunak S (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294: 1351-1362.

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.

Bogolyubov D (2007) Localization of RNA transcription sites in insect oocytes using microinjections of 5-bromouridine 5'-triphosphate. *Folia Histochem Cytobiol* 45: 129-134.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.

Braun RP, Wyatt GR (1996) Sequence of the hexameric juvenile hormone-binding protein from the hemolymph of *Locusta migratoria*. *J Biol Chem* 271: 31756-31762.

Broughton SJ, Piper MDW, Ikeya T, Bass TM, Jacobson J, Drieger Y, Martinez P, Hafen E, Withers DJ, Leivers SJ (2005) Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3105–3110.

Budatha M, Ningshen TJ, Dutta-Gupta A (2011) Is hexamerin receptor a GPI-anchored protein in *Achaea janata* (Lepidoptera: Noctuidae)? *J Biosci* 36: 545-553.

Büning J (1994) *The Insect Ovary. Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution.* London: Chapman & Hall.

Burmester T (1999) Identification, molecular cloning, and phylogenetic analysis of a nonrespiratory pseudo-hemocyanin of *Homarus americanus*. *J Biol Chem* 274: 13217-13222.

Burmester T (2001) Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. *Mol Biol Evol* 18: 184-195.

Burmester T (2002) Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J Comp Physiol* 172: 95-107.

Burmester T, Antoniewski C, Lepesant JA (1999) Ecdysone-regulation of synthesis and processing of fat body protein 1, the larval serum protein receptor of *Drosophila melanogaster*. *Eur J Biochem* 262: 49-55.

Burmester T, Scheller K (1992) Identification of binding proteins involved in the stagespecific uptake of arylphorin by the fat body cells of *Calliphora vicina*. *Insect Biochem Mol Biol* 22: 211-220.

Burmester T, Scheller K (1995a) Ecdysterone-mediated uptake of arylphorin by larval fat bodies of *Calliphora vicina*: involvement and developmental regulation of arylphorin-binding proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 25: 799–806.

Burmester T, Scheller K (1995b) Complete cDNA-sequence of the receptor responsible for arylphorin uptake by the larval fat body of the blowfly, *Calliphora vicina*. *Insect Biochem Mol Biol* 25: 981-989.

Burmester T, Scheller K (1996) Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor. *J Mol Evol* 42: 713-728.

Burmester T, Scheller K (1997) Developmentally controlled cleavage of the *Calliphora* arylphorin receptor and posttranslational regulation by 20-hydroxyecdysone. *Eur J Biochem* 247: 695-702.

Burmester T, Scheller K (1999) Ligands and receptors: common theme in insect storage protein transport. *Naturwissenschaften* 86: 468-474.

Burns KA, Gutzwiller LM, Tomoyasu Y, Gebelein B (2012) Oenocyte development in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev Gene Evol* 222: 77-88.

Callier V, Nijhout HF (2011) Control of body size by oxygen supply reveals size-dependent and size-independent mechanisms of molting and metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 14664-14669.

Capurro ML, Moreira-Ferro CK, Marinotti O, James AA, de Bianchi AG (2000) Expression patterns of the larval and adult hexamerin genes of *Musca domestica*. *Insect Mol Biol* 9: 169-177.

Cermenati G, Corti P, Caccia S, Giordana B, Casartelli M (2007) A morphological and functional characterization of *Bombyx mori* larval midgut cells in culture. *Invert Suv J* 4: 119–126.

Chan QWT, Howes CG, Foster LJ (2006) Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. *Mol Cell Proteomics* 5: 2252-2262.

Chung SO, Kubo T, Natori S (1995) Molecular cloning and sequencing of arylphorin-binding protein in protein granules of *Sarcophaga* fat body. *J Biol Chem* 270: 4624–4631.

Crailsheim K (1986) Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifera carnica* Pollm). *J Insect Physiol* 32: 629-634.

Crailsheim K, Schneider LHW, Hrassnigg N, Buhlmann G, Brosch U, Gmeinbauer R, Schoffmann B (1992) Pollen consumption and utilization in worker honey bees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *J Insect Physiol* 38: 409-419.

Cristino AS, Nunes FMF, Lobo CH, Bitondi MMG, Simões ZLP, Da Fontoura Costa L, Lattorff HMG, Moritz RFA, Evans JD, Hartfelder K (2006) Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality. *Insect Mol Biol* 15: 703-714.

Cruz-Landim C (2009) Aparelho reprodutor feminino e ovogênese. In: *Abelhas - Morfologia e Função de Sistemas*. São Paulo: Editora Unesp, pp 15–57.

Cunha AD, Nascimento AM, Guidugli KR, Simões ZL, Bitondi MM (2005) Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera*. *J Insect Physiol* 51: 1135-1147.

Damara M, Gullipalli D, Dutta-Gupta A (2010) Cloning and expression of fat body hexamerin receptor and its identification in other hexamerin sequestering tissue of rice moth, *Corcyra cephalonica*. *J Insect Physiol* 56: 1071-1077.

Danty E, Arnold G, Burmester T, Huet JC, Huet D, Pernollet JC, Masson C (1998) Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem Mol Biol* 28: 387-397.

Davidowitz G, D'Amico LJ, Nijhout HF (2003) Critical weight in the development of insect body size. *Evol Dev* 5: 188-197.

Edgar BA (2006) How flies get their size: genetics meets physiology. *Nat Rev Genet* 7: 907-916.

Enderle U, Kauser G, Reum K, Scheller K, Koolman J (1983) In: Scheller K (Eds). *The larval serum proteins of insects*. Stuttgart: Thieme-Stratton, pp. 40-49.

Engels W (1968) Extraoocytäre Komponenten des Eiwachstums bei *Apis mellifica*. I. Trophocytäre RNS-Zufuhr. *Insect Soc* 15: 271–288.

Engels W, Kaatz H, Zillikens A, Simões ZLP, Trube A, Braun R, Dittrich F (1990) Honeybee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In: Hoshi M, Yamashita O (Eds). *Advanced Invertebrates Reproduction*. Elsevier, Oxford.

Estoup A, Solignac M, Cornuet JM (1994) Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proc R Soc Lond B* 258: 1-7.

Faria FS, Garcia ES, Goldenberg S (1994) Synthesis of a hemolymph hexamerin by the fat body and testis of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol* 24: 59-67.

Fleig R, Gutzeit HO, Engels W (1991) Structural organization of ovarian follicle cells in the cotton bug (*Dysdercus intermedius*) and the honey bee (*Apis mellifera*). *Cell Tissue Res* 265: 297–305.

Gilbert LI, Rybczynski R, Warren JT (2002) Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Ann Rev Entomol* 47: 883–916.

Gutzeit HO, Zissler D, Fleig R (1993) Oogenesis in the honeybee *Apis mellifera*: cytological observations on the formation and differentiation of previtellogenic ovarian follicles. *Roux's Arch Dev Biol* 202: 181–191.

Hagner-Holler S, Pick C, Girgenrath S, Marden JH, Burmester T (2007) Diversity of stonefly hexamerins and implication for the evolution of insect storage proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 1064-1074.

Hahn DA, Wheeler DE (2003) Presence of a single abundant storage hexamerin in both larvae and adults of the grasshopper, *Schistocerca americana*. *J Insect Physiol* 49: 1189-1197.

Hartfelder K, Engels W (1998) Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr Topics Dev Biol* 40: 45-77.

Hauerland NH (1996) Insect storage proteins: gene families and receptors. *Insect Biochem Mol Biol* 26: 755-765.

Haydak MH (1970) Honey bee nutrition. *Annu Rev Entomol* 15: 143-156.

Hiruma K, Riddiford LM (1988) Granular phenoloxidase involved in cuticular melanization in the tobacco hornworm: regulation of its synthesis in the epidermis by juvenile hormone. *Dev Biol* 130: 87-97.

Hoage TR, Kessel RG (1968) An electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera* L.), with special reference to centriole replication and elimination. *J Ultrastruct Res* 24: 6-32.

Hopkins TL, Kramer KJ (1992) Insect cuticle sclerotization. *Annu Rev Entomol* 37: 273-302.

Hoshizaki DK (2005) Fat cell development. In: Kerkut GA, Gilbert LI (Eds). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Oxford: Elsevier, pp 315-345.

Hrassnigg N, Crailsheim K (1998) The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol* 44: 393-404.

Ikeya T, Galic M, Belawat P, Nairz K, Hafen E (2002) Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Curr Biol* 12: 1293-1300.

Ismail SM, Dutta-Gupta A (1990) 20-hydroxyecdysone mediated activation of larval haemolymph protein uptake by fat body cells of *Corcyra cephalonica* (Insecta). *Biochem Int* 22: 261-268.

Jia K, Chen D, Riddle DL (2004) The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* 131: 3897-3906.

Jones G, Jones D, Teal P, Sapa A, Wozniak M (2006) The retinoid-X receptor ortholog, ultraspiracle, binds with nanomolar affinity to an endogenous morphogenetic ligand. *FEBS J* 273: 4983-4996.

Johnston ML, Wheeler DE (2007) The role of storage proteins in colony-founding in termites. *Insect Soc* 54: 383-387.

Kamakura M (2011) Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* 473: 478–483.

Kayser H (1985) Pigments. In: Kerkut GA, Gilbert LI (Eds). *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. New York: Pergamon Press, pp 367–415.

Kayser H, Mann K, Machaidze G, Nimtz M, Ringler P, Müller SA, Aebi U (2009) Isolation, characterization and molecular imaging of a high-molecular-weight insect biliprotein, a member of the hexameric arylphorin protein family. *J Mol Biol* 389: 74-89.

Kerr WE, Silveira ZV (1974) A note on the formation of honeybee spermatozoa. *J Apic Res* 13: 121-126.

Kirankumar N, Ismail SM, Dutta-Gupta A (1997) Uptake of storage protein in the rice moth *Cocrya cephalonica*: identification of storage protein binding proteins in the fat body cell. *Insect Biochem Mol Biol* 27: 671-679.

Kocher SD, Richard FJ, Tarpy DR, Grozinger CM (2008) Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen. *BMC Genomics* 9: 232.

Koopmanschap B, Lammers H, de Kort S (1992) Storage proteins are present in the hemolymph from larvae and adults of the Colorado potato beetle. *Arch Insect Biochem Physiol* 20: 119-133.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–682.

Levenbook L, Bauer AC (1984) The fate of the larval storage protein calliphorin during adult development of *Calliphora vicina*. *Insect Biochem* 14: 77-86.

Lin H, Yue L, Spradling AC (1994) The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development* 120: 947–956.

Liu JL, Buszczak M, Gall JG (2006) Nuclear bodies in the *Drosophila* germinal vesicle. *Chromosome Res* 14: 465-475.

Locke M, Collins JV (1965) The structure and formation of protein granules in the fat body of an insect. *J Cell Biol* 26: 857-884.

Locke M, Collins JV (1966) Sequestration of protein by the fat body of an insect. *Nature* 210: 552-553.

Locke M, Collins JV (1967) Protein uptake in multi vesicular bodies in the molt-intermolt cycle of an insect. *Science* 158: 467-469.

Locke M, Collins JV (1968) Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. *J Cell Biol* 36: 153-183.

Loeb MJ, Hakim RS (1996) Insect midgut epithelium *in vitro*: an insect stem cell system. *J Insect Physiol* 42: 1103–1111.

Loeb MJ (2010) Factors affecting proliferation and differentiation of Lepidopteran midgut stem cells. *Arch Insect Biochem Physiol* 74: 1-16.

Lourenço AP, Mackert A, Cristino AS, Simões ZLP (2008) Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* 39: 372-385.

Louveaux J (1977) Anatomie de l'abeille: XL'appareil reproducteur du male, *Bull. Tech Apic* 4: 43–48. In: Tozetto SO, Bitondi MMG, Dallacqua RP, Simões ZLP (2007) Protein profiles of testes, seminal vesicles and accessory glands of honey bee pupae and their relation to the ecdysteroid titer. *Apidologie* 38: 1-11.

Magee J, Kraynack N, Massey HCJr, Telfer WH (1994) Properties and significance of a riboflavin-binding hexamerin in the hemolymph of *Hyalophora cecropia*. *Arch Insect Biochem Physiol* 25: 137-157.

Markl J, Burmester T, Decker H, Savel-Niemann A, Harris JR, Süling M, Naumann U, Scheller K (1992). Quaternary and subunit structure of *Calliphora* arylphorin as deduced from electron microscopy, electrophoresis, and sequence similarities with arthropod hemocyanin. *J Comp Physiol B* 162: 665–680.

Martins JR (2008) Caracterização da região codificadora e análise de expressão de Hexamerinas durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas com ênfase em Genética) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Martins JR, Nunes FMF, Cristino AS, Simões ZLP, Bitondi MMG (2010) The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. *BMC Mol Biol* 11: 23.

Martins JR, Nunes FMF, Simoes ZLP, Bitondi MMG (2008) A honeybee storage protein gene, hex 70a, expressed in developing gonads and nutritionally regulated in adult fat body. *J Insect Physiol* 54: 867-877.

Martinez T, Wheeler DE (1993) Identification of two storage hexamers in the ant, *Camponotus festinatus*: accumulation in adult queen-less workers. *Insect Biochem Mol Biol* 23: 309-317.

Martinez T, Wheeler DE (1994) Storage proteins in adult ants (*Camponotus festinatus*): roles in colony founding by queens and in larval rearing by workers. *J Insect Physiol* 40: 723-729.

McGraw LA, Gibson G, Clark AG, Wolfner MF (2004) Genes regulated by mating, sperm, or seminal proteins in mated female *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 14: 1509-1514.

Michelette ERF, Soares AEE (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honeybee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 24: 431-440.

Munn EA, Feinstein A, Greville GD (1967) A major protein constituent of pupal of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *Biochem J* 102: 5-6.

Nagamanju P, Hansen IA, Burmester T, Meyer SR, Scheller K, Dutta-Gupta A (2003) Complete sequence, expression and evolution of two members of the hexamerin protein family during the larval development of the rice moth, *Coccyra cephalonica*. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 73-80.

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255-262.

Nijhout HF, Davidowitz G, Roff DA (2006) A quantitative analysis of the mechanism that controls body size in *Manduca sexta*. *J Biol* 5: 16.

Noguchi T, Miller KG (2003) A role for actin dynamics in individualization during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Development* 130: 1805–1816.

Nohe A, Keating E, Fivaz M, van der Goot FG, Petersen N (2006) Dynamics of GPI-anchored proteins on the surface of living cells. *Nanomedicine* 2: 1–7.

Oldham S, Hafen E (2003) Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol* 13: 79–85.

Oldham S, Montagne J, Radimerski T, Thomas G, Hafen E (2000) Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev* 14: 2689–2694.

Page RE, Erickson EH (1988) Reproduction by worker honey bees (*Apis mellifera* L). *Behav Ecol Sociobiol* 23: 117–126.

Pan ML, Telfer WH (1996) Methionine-rich hexamerin and arylphorin as precursor reservoirs for reproduction and metamorphosis in female luna moths. *Arch Insect Biochem Physiol* 33: 149-162.

Pan ML, Telfer WH (1999) Equivalent of riboflavin-binding hexamerin and arylphorin as reserves for adult development in two saturniid moths. *Arch Insect Biochem Physiol* 42: 138-146.

Patel A, Fondrk MK, Kaftanoglu O, Emore C, Hunt G, Frederick K, Amdam GV (2007) The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. *PLoS ONE* 2: e509.

Patrício K, Cruz-Landim C (2002) Mating influence in the ovary differentiation in adult queens of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). *Braz J Biol* 62: 641-649.

Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551–3567.

Peter MG, Scheller K (1991) Arylphorins and integument. In: Retnakaran A, Binnington K (Eds). *The Physiology of Insect Epidermis*. North Carolina: Intaka Press, pp 115-124.

Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuck AR, Cruz J, Simões ZL, Bellés X (2003) The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 459-465.

Poiani SB, Cruz-Landim C (2012) Stored products and presence of acid phosphatase in fat body cells at pre-pupal worker stage of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae). *Micron* 43: 475–478.

Rachinsky A, Hartfelder K (1998) *In vitro* biosynthesis of juvenile hormone in larval honey bees: comparison of six media. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34: 646–648.

Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K (1990) Caste and metamorphosis – hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen Comp Endocr* 79: 31-38.

Rembold H (1987) Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochem* 17: 1003-1006.

Rembold H, Czoppelt C, Rao PJ (1974) Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Insect Physiol* 20: 1193-1203.

Rembold H, Kremer JP, Ulrich GM (1980) Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 11: 29-38.

Rhee WJ, Lee EH, Park JH, Lee JE, Park TH (2007) Inhibition of HeLa Cell apoptosis by storage-protein 2. *Biotechnol Prog* 23: 1441-1446.

Ricciardelli D'Albore G, Battaglini Bernardini M (1978) Origine géographique de la gelée royale. *Apidologie* 9: 1-17.

Ries H (1932) Die Prozesse der Eibildung und des eiwachstums bei pediculiden und mallophagen. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 16: 314-388. In: Cruz-Landim C (2009) Aparelho reprodutor feminino e ovogênese. In: *Abelhas - Morfologia e Função de Sistemas*. São Paulo: Editora Unesp, pp 15–57.

Roberts DB, Turing JD, Loughlin SA (1991) The advantages that accrue to *Drosophila melanogaster* possessing larval serum protein 1. *J Insect Physiol* 37: 391-400.

Rulifson EJ, Kim SK, Nusse R (2002) Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science* 296: 1118–1120.

Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16: 944-945.

Rutz W, Gerig L, Wille H, Lüscher M (1976) The function of juvenile hormone in adult worker honeybees, *Apis mellifera*. *J Insect Physiol* 22: 1485-1491.

Ryan R, Anderson D, Grimes W, Law J (1985) Arylphorin from *Manduca sexta*: carbohydrate structure and immunological studies. *Arch Biochem Biophys* 243: 115-124.

Ryan RO, Schmidt JO, Law JH (1984) Arylphorin from the hemolymph of the larval honeybee. *Insect Biochem* 14: 515-520.

Ryu KS, Lee JO, Kwon TH, Choi HH, Park HS, Hwang SK, Lee ZW, Lee KB, Han YH, Choi YS, Jeon YH, Cheong C, Kim S (2009) The presence of monoglucosylated N196-glycan is important for the structural stability of storage protein, arylphorin. *Biochem J* 421: 87-96.

Sadrud-Din SY, Loeb MJ, Hakim RS (1996) *In vitro* differentiation of isolated stem cells from the midgut of *Manduca sexta* larvae. *J Exp Biol* 199: 319–325.

Scharf ME, Buckspan CE, Grzymala TL, Zhou X (2007) Regulation of polyphonic caste differentiation in the termite *Reticulitermes flavipes* by interaction of intrinsic and extrinsic factors. *J Exp Biol* 210: 4390-4398.

Scheller K, Fisher B, Schenkel H (1990) Molecular properties, functions and developmentally regulated biosynthesis of arylphorin in *Calliphora vicina*. In: Hagerdorn HH, Hildebrand JG, Kidwell MG, Law JH (Eds). *Molecular Insect Science*. New York: Plenum Press, pp 155-162.

Schmidt-Capella IC, Hartfelder K (1998) Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J Insect Physiol* 44: 385-391.

Schmidt-Capella IC, Hartfelder K (2002) Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honey bee ovary. *Cell Tissue Res* 307: 265–272.

Shapiro JP, Silhacek DL, Niedz RP (1992) Storage proteins of the larval root weevil *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae): riboflavin binding and subunit isolation. *Arch Insect Biochem Physiol* 20: 315-331.

Silveira ZV (1972) Efeito da temperatura na meiose dos machos de *Apis mellifera*, II. *Ciência e Cultura* 24: 160.

Slansky JR, Scriber JM (1985) Food consumption and utilization. In: Kerkut GA, Gilbert LI (Eds). *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Oxford Pergamon Press, New York.

Snodgrass RE (1956) *Anatomy of honeybee*. Comstock Publ Ass Cornell Univ. New York: Press Ithaca, pp 344.

Spradling AC (1993) Developmental genetics of oogenesis. In: Bate M, Martinez-Arias A (Eds). *Drosophila Development*. New York: Cold Spring Harbor Press, pp 1–70.

Tanaka ED, Hartfelder K (2004) The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. *Arthropod Struct Dev* 33: 431–442.

Tatar M, Bartke A, Antebi A (2003) The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299: 1346-1350.

Telfer WH, Kunkel JG (1991) The function and evolution of insect storage hexamers. *Annu Rev Entomol* 36: 205-228.

Tojo S, Betchaku T, Ziccardi V, Wyatt G (1978) Fat body protein granules and storage proteins in the silkworm, *Hyalophora cecropia*. *J Cell Biol* 78: 823-838.

Tozetto SO (1997) Hormonelle Steuerung in der Entwicklung von Drohnen (*Apis mellifera carnica*), Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls Universität Tübingen. In: Tozetto SO, Bitondi MMG, Dallacqua RP, Simões ZLP (2007) Protein profiles of testes, seminal vesicles and accessory glands of honey bee pupae and their relation to the ecdysteroid titer. *Apidologie* 38: 1-11.

Tozetto SO, Bitondi MMG, Dallacqua RP, Simões ZLP (2007) Protein profiles of testes, seminal vesicles and accessory glands of honey bee pupae and their relation to the ecdysteroid titer. *Apidologie* 38: 1-11.

Tysell B, Butterworth FM (1978) Different rate of protein granule formation in the larval fat body of *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 24: 201-206.

Ueno K, Natori S (1984) Identification of storage protein receptor and its precursor in the fat body membrane of *Sarcophaga peregrina*, *J Biol Chem* 259: 12107-12111.

Velthuis HH (1970) Ovarian development in *Apis mellifera* worker bees. *Entomol Exp Appl* 13: 377-394.

Wang Z, Haunerland NH (1991) Ultrastructural study of storage protein granules in fat body of the corn earworm *Heliothis zea*. *J Insect Physiol* 37: 353-363.

Wang Z, Haunerland NH (1994a) Receptor-mediated endocytosis of storage proteins by fat body of *Helicoverpa zea*. *Cell Tissue Res* 278: 107-115.

Wang Z, Haunerland N (1994b) Storage protein uptake in *Helicoverpa zea*: arylphorin and VHDL share a single receptor. *Arch Insect Biochem Physiol* 26: 15-26.

Webb B, Riddiford LM (1988) Synthesis of two storage proteins during larval development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol* 130: 671-681.

Wheeler DE, Buck NA (1996) A role for storage proteins in autogenous reproduction in *Aedes atropalpus*. *J Insect Physiol* 42: 961-966.

Wheeler DE, Tuchinskaya IL, Buck NA, Tabashnik BE (2000) Hexameric storage proteins during metamorphosis and egg production in the diamond-back moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera). *J Insect Physiol* 46: 951-958.

Willet E, Wang XY, Wells M (1989) cDNA and gene sequence of *Manduca sexta* arylphorin, and aromatic amino acid-rich larval serum protein. *J Biol Chem* 264: 19052-19059.

Wilson MJ, Abbott H, Dearden PK (2011) The evolution of oocyte patterning in insects: multiple cell-signaling pathways are active during honeybee oogenesis and are likely to play a role in axis patterning. *Evol Dev* 13: 127–137.

Winston ML (1991) *The Biology of the honey bee*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, London, England, pp 4-109.

Wirtz P, Beetsma J (1972) Induction of caste differentiation in the honeybee (*Apis mellifera* L.) by juvenile hormone. *Entomol Exp Appl* 15: 517-520.

Wu M, Tischler ME (1995) Utilization of [¹⁴C]phenylalanine derived from arylphorin or free amino acid in *Manduca sexta* pharate adults. *Arch Insect Biochem Physiol* 28: 257-272.

Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993) Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* 366: 476-479.

Yao TP, Segraves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM (1992) *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* 71: 63-72.

Zakharkin SO, Headley VV, Kumar NK, Buck NA, Wheeler DE, Benes H (2001) Female-specific expression of a hexamerin gene in larvae of an autogenous mosquito. *Eur J Biochem* 268: 5713-5722.

Zalewska M, Kochman A, Estève JP, Lopez F, Chaoui K, Susini C, Ozyhar A, Kochman M (2009) Juvenile hormone binding protein traffic – interaction with ATP synthase and lipid transfer proteins. *Biochim Biophys Acta* 1788: 1695-1705.

Zhang H, Stallock JP, Ng JC, Reinhard C, Neufeld TP (2000) Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes & Dev* 14: 2712–2724.

Zhou XG, Oi FM, Scharf ME (2006a) Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4499-4504.

Zhou X, Tarver MR, Bennett GW, Oi FM, Scharf ME (2006b) Two hexamerin genes from the termite *Reticulitermes flavipes*, sequence, expression, and proposed functions in caste regulation. *Gene* 376: 47-58.

Zhou X, Tarver MR, Scharf ME (2007) Hexamerin-based regulation of juvenile hormone dependent gene expression underlies phenotypic plasticity in a social insect. *Development* 134: 601-610.

Apêndice

Trabalhos em colaboração

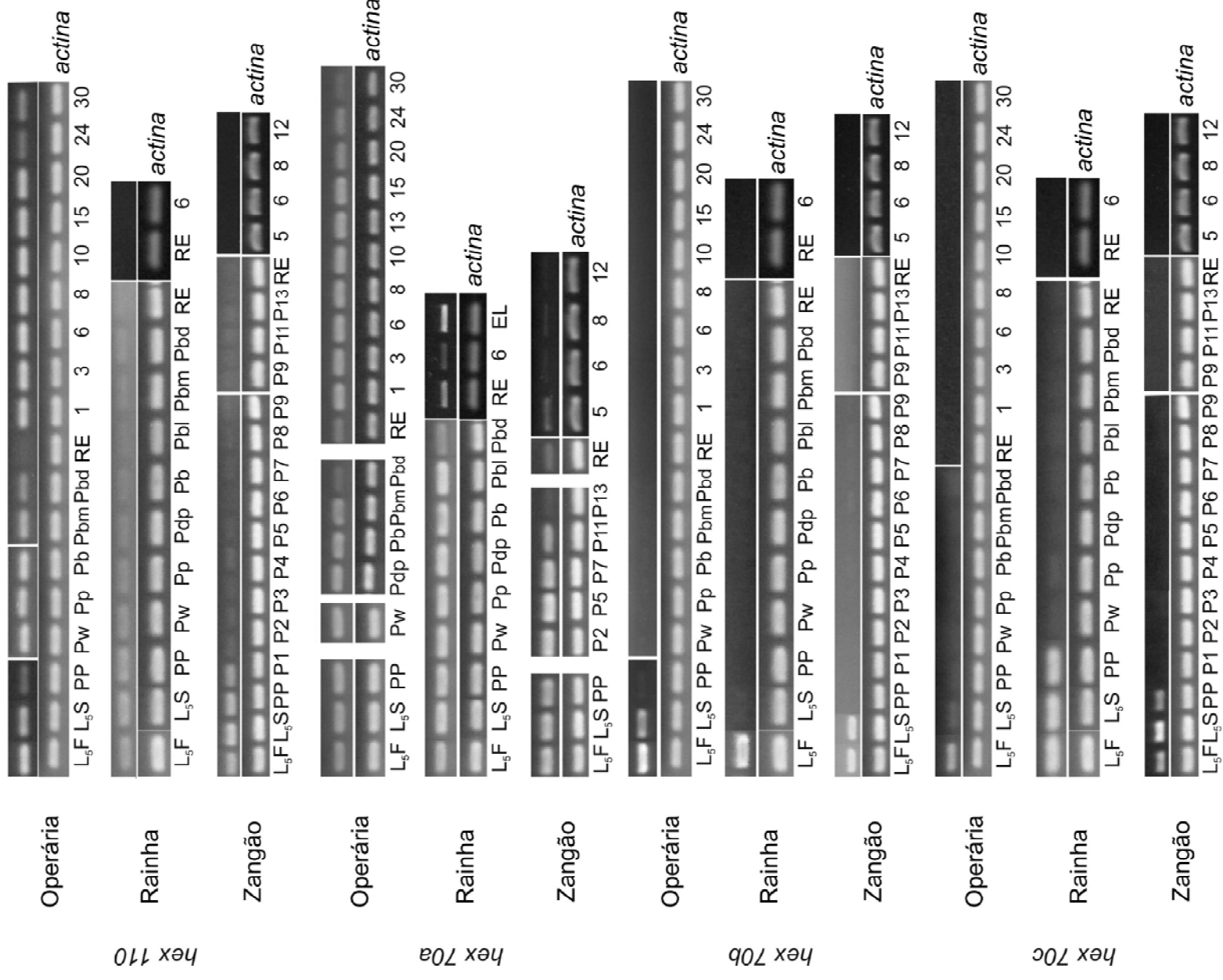
- Lourenço AP, Martins JR, Bitondi MMG, Simões ZLP (2009) Trade-off between immune stimulation and expression of storage protein genes. Arch Insect Biochem Physiol, DOI: 10.1002/arch.20301.

- Lourenço AP, Martins JR, Guidugli-Lazzarini KR, Macedo LF, Bitondi MMG, Simões ZLP (2012) Costs of bacterial infection on storage protein gene expression and reproduction in queenless *Apis mellifera* worker bees on distinct dietary regimes. J Insect Physiol, 58: 1217-1225.

Figura 29: Genes de hexamerinas. **(A)** Diagrama esquemático da estrutura dos genes de hexamerinas. Éxons e íntrons estão representados por retângulos e linhas, respectivamente. As setas à direita e à esquerda de cada gene indicam os códons de início e término, respectivamente. As UTRs sequenciadas estão marcadas em cinza escuro. Número dos nucleotídeos (nt) estão indicados para os éxons e os íntrons. **(B)** Sequências codificadoras completas (determinadas por sequenciamento). Éxons estão separados por asteriscos. Os *primers* utilizados para o sequenciamento dos genes estão sublinhados. O sequenciamento dos genes foi realizado por: Cunha *et al.* (2005) para *hex 70b*; Martins *et al.*, (2008) para *hex 70a*; Martins (2008) e Martins *et al.* (2010) para *hex 110* e *hex 70c*.

Figura 30: Expressão dos genes de hexamerinas no corpo gorduroso de operárias, rainhas e zangões em desenvolvimento e adultos. **(A)** A abundância de transcritos de *hex 110*, *hex 70a*, *hex 70b* e *hex 70c* foi caracterizada por RT-PCR semi-quantitativa seguida por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. O gene codificador de actina de *A. mellifera* foi utilizada como controle interno e normalizador. **(B)** Diagrama simplificado baseado na abundância dos transcritos detectados por RT-PCR. As linhas espessas, finas e tracejadas no diagrama representam alto, intermediário e baixo nível de transcritos, respectivamente. L5F e L5S: fase de alimentação e tecelagem do casulo do 5º instar larval. PP: pupa farata. Pw, Pp, Pdp, Pb, Pbl, Pbm e Pbd: fases sucessivas do estágio pupal de operárias e rainhas. P1 a P13: fases sucessivas do estágio pupal de zangões. RE: recém emergida. Ov: rainha ovipositora. Números indicam a idade em dias do adulto.

A



B

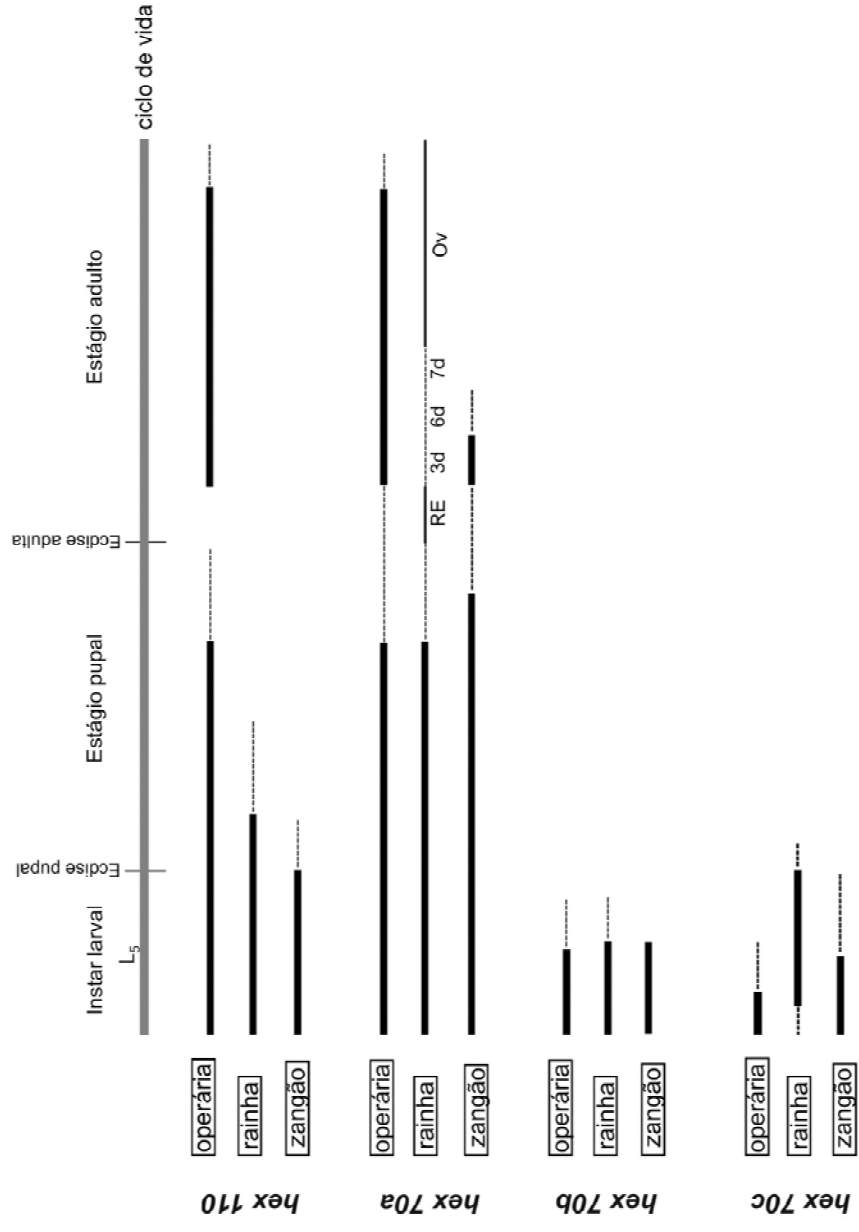
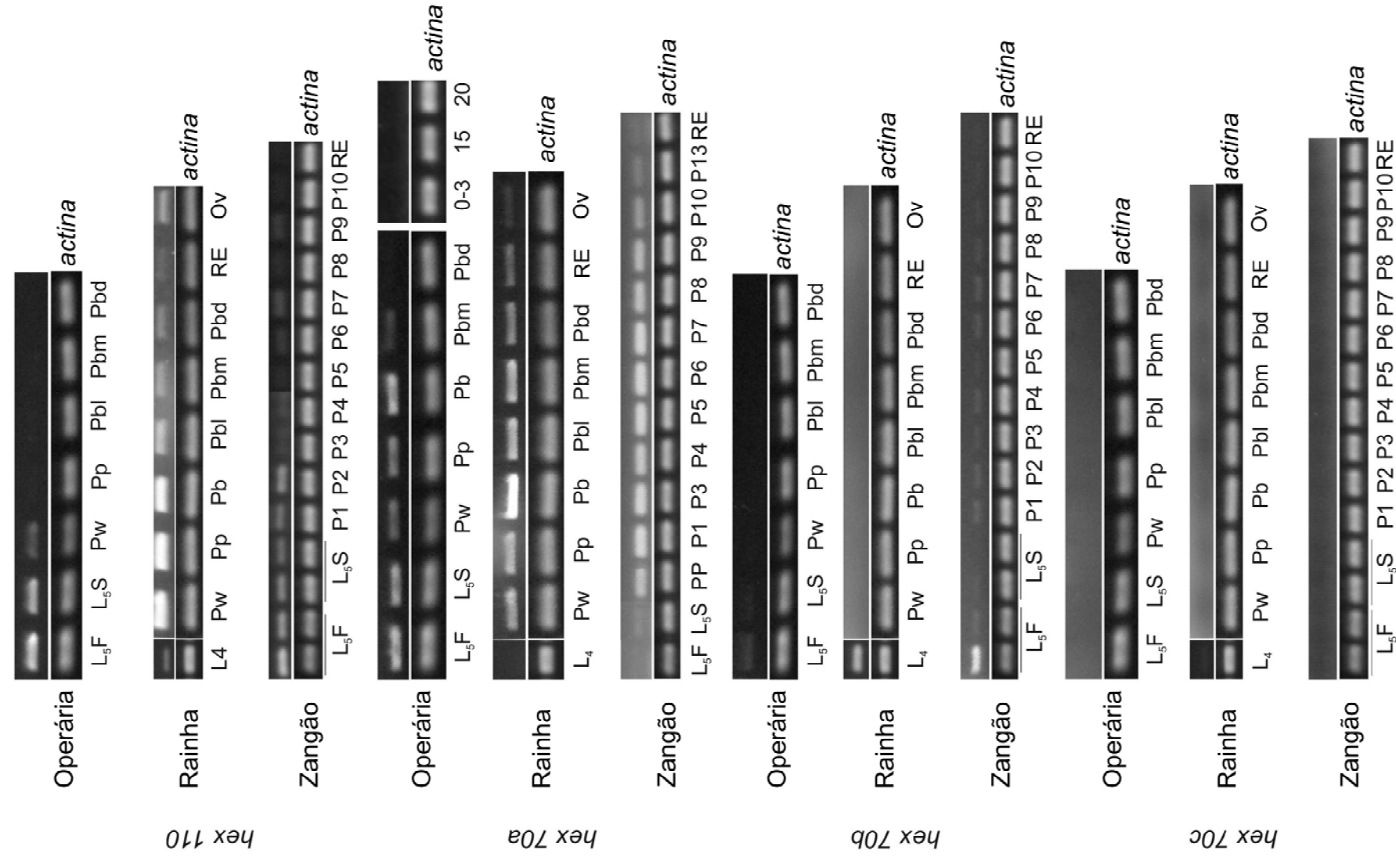
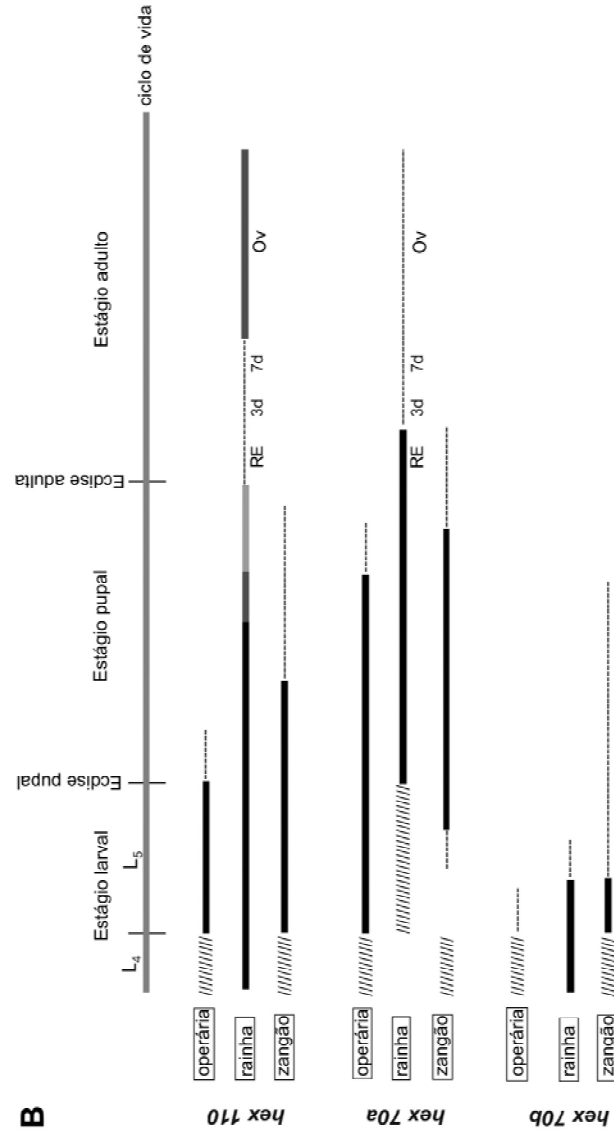


Figura 31: Expressão dos genes de hexamerinas nas gônadas de operárias, rainhas e zangões em desenvolvimento e adultos. **(A)** A abundância de transcritos de *hex 110*, *hex 70a*, *hex 70b* e *hex 70c* foi detectada por RT-PCR semi-quantitativa seguida por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. O gene codificador de actina de *A. mellifera* foi utilizado como controle interno e normalizador. **(B)** Diagrama simplificado baseado na abundância dos transcritos detectados por RT-PCR. As linhas pretas, cinza-escuro, cinza-claro e tracejadas no diagrama representam diferentes níveis de transcritos (alto, intermediário, baixo e muito baixo, respectivamente). Dados não mostrados são indicados (///). L4 e L5: 4° e 5° instar larval. L5F e L5S: fase de alimentação e tecelagem do casulo do 5° instar larval. PP: pupa farata. Pw, Pp, Pdp, Pb, Pbl, Pbm e Pbd: fases sucessivas do estágio pupal de operárias e rainhas. P1 a P13: fases sucessivas do estágio pupal de zangões. RE: adultos recém-emergidos. Ov: rainha ovipositora. Números indicam a idade em dias do adulto.

A



B



Multiplos alinhamentos incluindo HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c e HEX 110

HEX70a MFIPSHQVWLVLGLLAFS-LVGAEEYDTKTADKDFLLKQKQVYNLLYRVAQPALANITWYN
 HEX70b MIV---IMKAGFLFLASLCLLVQAVPNKQVADKTYVTRQKNIYELFWHVDQPTVYHPELYQ
 HEX70c MLSK--VVLLVALAAICGAQGASVYAGRHTADMDFLHKQKKIFDLLLLYVRQADLSDAEWYD
 HEX110 M-----RYFIIILLALVALGVCAPNVKQRAADQDLLNKQDVIQLLQKISQP-IPNQLQN
 * * . . :.*** : :*. : : * : . : . :

HEX70a EGQAWNIEANIDSYTNAAAVKEFLSIYKHGMLP-RGELFSLYYPQLREMSALFKLFYHA
 HEX70b KARTFNLVENLDNYNDKEAVNEFMQLLKHGMLP-RGQVFTMMNKEMRHQAVVLFRLLYSA
 HEX70c VGRNYDMESNMDMYKDKNVVQKFLWVYKQGMFLSRNAIFTPLNSEQKYEVRLMFELLYNA
 HEX110 LGASYDIESNSHQYKNPIIVMYAGAVKAGLVQPQTTFSNSISQLRKEVSLLYRILLGA
 . : : * . * : * : * * : . * : : : * : : * : : * :

HEX70a KDFDIFFKTALWAKNNINEAQYIYSLYTAVITRPDTKFIQLPPLYEMCPYFFFNSEVLQK
 HEX70b KTFDFVYNTAVWARFNVNEQMYLYALSVAVIHRPDTKLMKLPMPYEVMPHLYFNDEVMQK
 HEX70c KDFQTFYKTAAWARLRMNSGMFTTAFSIAVLYRDPDKYMKFPAYEIPNYFFDSSVIEE
 HEX110 KDYQTFLKTAAWARVHVNEGQFLKAFVAAVLTRQDTQGVIFPPVYEILPQHLLDSRVIQE
 * : : * : * * : . : : * * : * * : : : * : * * : * . : : * : : :

HEX70a ANHALIFGKLDTKTSG-KYKEYIIPANYSGWYLNHDYNLENKLIYFIEDIGLNTYYFFLR
 HEX70b AYNIAMGDTADMKKTYNNDIYLLAANYTGWYLTKHNVPQRLNYFTEDVGLNHFYFMLN
 HEX70c AQNLKMSRGSVVTGMNNIETYIVNTNYSKSNMREYNDPEYKLDYFMEDVELNAYYYYMR
 HEX110 AQNIAIQN----TQGKNNQQNILIPVNYS----ALLSHDEQQLSYFTQDIGLAAYYAQVN
 * : : : . : : * * : * * * : * : * * : * : * : . :

HEX70a QAFPFWLPSKEYDLP-----DYRGEELYSHKLLLN
 HEX70b HNYPPFMLSNSLNFP-----QIRGEFYFFLHKQVLN
 HEX70c EMLPYWSSSQYHMPK-----EIRGQLYYFLHKQLMT
 HEX110 LAGYIQEQNQQQQQQPLTQQQYQQQIVGKYLQQQAGQQDQQANIGRGAQYLYLHQQLLA
 * * * : * : : :

HEX70a RYYLERLSNDLPHLEEFDWQKPFYPGYYPTMTYSNGLPFPQRP IWSNFPIYKYKYIREIM
 HEX70b RYYLERLSNDMGEVSYVSLDHP IPTGYYPTMRFRNGLAFPQRETGATVPLHMOKYVQMIH
 HEX70c RYFLERMSNDLGKTAEFDWNKP INSGFYSTIMYSNGVTFPQRNRFSSLPYKYKYLNVIN
 HEX110 RYELNRLSNGLGPIKDIDYEN-VQSLYQPHLRGLNGLEFAGRPQNLQLQSQRNQLIQYVA
 * * * : * * : . . : . : : * * : * . * . : : . :

HEX70a NKESTRISAAIDSGYILNNDGKWHNIYSEKGLNILGNIIEGNADSYNTEFYGSIDTLARKI
 HEX70b DLHTRISTAIDLGYVVDSYGNHVKLYTKQGLNVLGNIVQGNQSVNVQLYGQLDLLVRKV
 HEX70c ALEMRLMDAIDSGYLIDEYGKKIDIYTP EGLNMLGNVIEGSSDSINTKFYGMIDILARDI
 HEX110 TLEKRLRDAIDSGNVITPQGVFLSLYQPQGMNIGDLIEGTGRSVNPRYYGSLQAAARKL
 . * : * * * * : : * . : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : :

HEX70a LGYNLEAASKYQIVPSALEIFSTSMKDPAFYRIYKRIIDYYHSYKMHQKPYNKDEIIYPN
 HEX70b LGFGYESNVKYQVVPALQMWSTSLRDPVFFSIYKTILDYYHKYKENLPKYTTEELNFPG
 HEX70c LGYNFDFQNKNNLIPSALQSYSTSMRDPAFYMLYQNILSYFLRYKKLQPQYSQSELQMPG
 HEX110 LGNAPEVENIWDYTPSSLELGEVAVHDPVFYQLYKKVMNLYQQYQQSLPVYQYNDLILPG
 * * : : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : :

HEX70a LKIESFTVDKLITYFEQFDTTINNGLLLEEQRNDDK--PFLIKIRQYRLNHKPFNFHITI
 HEX70b VSIESVTVDKLITYFDHFESMLNNGVSIQSHAKAKN---TMIKARQYRLNHKPFYTHIVV
 HEX70c VKFESVNIDKLYTYFDKCDTLINNAVAVENFKGG-M--YLRLKARRACMNYERFTYKINI
 HEX110 VTIQNVDVSQLVTLFTDFYVDLDAVTGHQSQQQQEQTQSRVRAHLKRLDHQPYQYKIAV
 : : : : : : * * * . : : : : : : : : : : : : * : :

```

HEX70a NADKPMK-AAIRIFIGPKYDSH-HKLEIIPEDLKYFYEIDNWMLDLNGLNKITRNSLDC
HEX70b NSDKNVK-GMVRIFLGPYDEFHGHEVDLVHNYMN-FMQMDEFVNLKSGSNTIERNSES
HEX70c NSDKETK-GMMRIFLGPFAFDEIKHDMVYLQKYFYLFMEMDRFAVTLRPGSNSIERQSSS
HEX110 HSEQNVPVAVRVLGPKHDHQ-GRPISISKQHLFVVDLQFIQNLHAGENTIIRNSQQA
      :::: . :*:*:** .*          : : * :*:.: *..* *.* *: * :.

HEX70a FFTMNDLEPSEIFYEKIETSLNSDKPFTYNE--RIFGFPGRLLLPRGKKEGMPFQLFLYV
HEX70b VFVVPDEVPSDVLNRLVVSEdGSETFKYSS--QPYGFPERLLLPGKKEGMPYNVLVWV
HEX70c PFTTSTIMP SDIFYDKLNKAIGGSEPFTYSE--KMLGFPERLILPRGKPEGMRYKMFFFL
HEX110 PGQSPDWPSTSQIQRGVNAAIRSQEPFYITEPHQIFSFARLSLPKGPQGFPLQFLVVI
      .:. : : : ..:* .. : .** ** **:*: *: :.:. :

HEX70a SPVS-S-----
HEX70b SPFDDS-----
HEX70c SSMDES-----
HEX110 SSSNPLNVPYGPVIPEQSLTYQDQYQVVSVDQYQQLKEQGQISQVGGGIQQNVEVLPEN
      * . .

HEX70a -----
HEX70b -----
HEX70c -----
HEX110 LVNAQQVQAVRNYANLYTKYHGQYPNTQIQNPVQGGQDMTYSVQGVGVNAGGWLGGQ

HEX70a -----
HEX70b -----
HEX70c -----
HEX110 GNSWSQQVQQAQQVQQMQAAMAAVQQSQQRHQHAAQMIYGHQQSHHGLHINS SPSSVQ

HEX70a -----
HEX70b -----
HEX70c -----
HEX110 SGQQQQSVLQGLGVQGVQQGVQGVQTAQGVQGVQGVQGVQGVQGVQGVQGVQVPGLLQGVQQVFG

HEX70a -----
HEX70b -----
HEX70c -----
HEX110 QGVQGMNVPYGMQRGQSGGQ TWSNSQVQGVAVPGSGIVASGQQHAGGWQSIYAQPQTVQD

HEX70a -----EYNQYNSRIWGGYKFDKRSFGFPLDKPLYDFNYEGPNMLFKDIL IYHKDEFDM
HEX70b -----NVVQIDSPVWGRHIYDGRAMGFPLDKPVDPLLLVLSNIHVKEVLVHHREMEEL
HEX70c -----NTKSYEIPLYGKMTLDDKVF GFPLDRPMWAWNFTIPNMYFKDVF IYNRPNEES
HEX110 QIVSEYYQNKPISEVIGGAI SLDGKPLGFPLDRPLSLGALSVPNIFVKDVLVHFHQGQPTN
      : . : * * : :*****: : .*: .*: : : : :

HEX70a NITY
HEX70b NVAL
HEX70c MNY-
HEX110 DITQ

```

Figura 32: Múltiplos alinhamentos das sequências deduzidas das hexamerinas HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c e HEX 110 de *A. mellifera* utilizando ClustalW 1.83.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones

Juliana R Martins¹, Francis MF Nunes², Alexandre S Cristino³, Zilá LP Simões² and Márcia MG Bitondi*²

Abstract

Background: Hexamerins are hemocyanin-derived proteins that have lost the ability to bind copper ions and transport oxygen; instead, they became storage proteins. The current study aimed to broaden our knowledge on the hexamerin genes found in the honey bee genome by exploring their structural characteristics, expression profiles, evolution, and functions in the life cycle of workers, drones and queens.

Results: The hexamerin genes of the honey bee (*hex 70a*, *hex 70b*, *hex 70c* and *hex 110*) diverge considerably in structure, so that the overall amino acid identity shared among their deduced protein subunits varies from 30 to 42%. Bioinformatics search for motifs in the respective upstream control regions (UCRs) revealed six overrepresented motifs including a potential binding site for Ultraspiracle (Usp), a target of juvenile hormone (JH). The expression of these genes was induced by topical application of JH on worker larvae. The four genes are highly transcribed by the larval fat body, although with significant differences in transcript levels, but only *hex 110* and *hex 70a* are re-induced in the adult fat body in a caste- and sex-specific fashion, workers showing the highest expression. Transcripts for *hex 110*, *hex 70a* and *hex 70b* were detected in developing ovaries and testes, and *hex 110* was highly transcribed in the ovaries of egg-laying queens. A phylogenetic analysis revealed that HEX 110 is located at the most basal position among the holometabola hexamerins, and like HEX 70a and HEX 70c, it shares potential orthology relationship with hexamerins from other hymenopteran species.

Conclusions: Striking differences were found in the structure and developmental expression of the four hexamerin genes in the honey bee. The presence of a potential binding site for Usp in the respective 5' UCRs, and the results of experiments on JH level manipulation *in vivo* support the hypothesis of regulation by JH. Transcript levels and patterns in the fat body and gonads suggest that, in addition to their primary role in supplying amino acids for metamorphosis, hexamerins serve as storage proteins for gonad development, egg production, and to support foraging activity. A phylogenetic analysis including the four deduced hexamerins and related proteins revealed a complex pattern of evolution, with independent radiation in insect orders.

Background

Hexamerins essentially participate in the dynamics of amino acid storage and exploitation that occurs during insect development. These six-subunit proteins are primarily synthesized by the larval fat body and are massively stored in hemolymph as an amino acid source for

development toward the adult stage [1]. They also may function as JH-binding proteins [2,3], and in addition, there is circumstantial evidence supporting the hypothesis that larval hexamerins are targeted for egg production [4-8].

While hexamerins have been the focus of numerous studies in solitary insects [9,10], the characterization of these proteins in social insects has received much less attention, in spite of the potential for discovering unique

* Correspondence: mmgbit@usp.br

² Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

physiological functions linked to aspects of the social way of life. Workers of an ant species may use hexamerins as an amino acid source for brood nourishment, and there is circumstantial evidence that, by acting as a JH-binding protein, hexamerins regulate JH titer and caste differentiation in a termite species [11-15].

The highly eusocial honey bee hatches as a larva after a 72 h embryonic stage, and develops through a series of molts that define the five larval instars. This is a period of feeding, and the larva gains weight while it is continuously fed by worker bees. During the larval stage, queens, workers and drones have distinct nutritional requirements. Depending on the quality and quantity of nutrition, a diploid female larva develops as a queen or as a worker. A queen-destined larva is fed with secretions produced by worker hypopharyngeal and mandibular glands, the royal jelly, in a much higher proportion than a worker-destined larva. As a supplement to its nutritional regime, the worker larva also receives pollen, nectar and honey. Drone larval nourishment is composed of these same nutrients, but they are fed on a larger quantity of food, and their diet also differs in quality when compared to that given to workers [16]. Female and male larvae grow enormously because of these nutrients, and accumulate proteins, lipids and glycogen for use as structural materials and energy during the subsequent non-feeding pupal and pharate-adult stages. Duration of development from egg to adult eclosion differs considerably among queens, workers and drones, spanning 16, 21 and 24 days, respectively [17] with some differences among *A. mellifera* subspecies.

The single adult queen in the hive is adapted to egg production. When fertilized, the eggs will give rise to workers and occasionally to a new queen, while non-fertilized eggs become drones. The functionally sterile workers perform a series of flexible but age-correlated tasks, a phenomenon known as age polyethism. The younger worker bees usually stay inside the hive and are engaged in brood rearing, queen tending, nest building, nest cleaning, and food processing. Older workers take over the duties of foraging for pollen and nectar that are used to provision and maintain the hive. Drones do not have any known function other than mating with the queen [18].

Our goal was to determine whether these morphotypes (queen, worker, drone), which are so divergent in their developmental rate, size, morphology and other essential characteristics, and which perform very distinct functions as adults in the hive, also show hexamerin gene expression profiles that are correlated with their unique developmental trajectories. The current study was undertaken to deepen our knowledge of the four hexamerin genes found in the honey bee genome [19-21] by exploring their structures, expression patterns, and putative

functions using a comparative approach. To this end we determined (1) the features of the full-length cDNA coding sequences and their conceptual translation products; (2) the potential regulatory sequences present in the respective 5' UCRs; (3) the expression patterns in the fat body and gonads of developing and adult queens, workers and drones; (4) the effect of JH on the expression in larval fat body; (5) the relative quantities of hexamerin transcripts in females and drones during the metamorphic molt and adult stage, and (6) the evolutionary relationships among the honey bee hexamerins and related members of the hemocyanin superfamily in other insect species. Consistent with the hypothesis that hexamerins have multiple functions in the honey bee, our findings disclosed striking structural differences among the hexamerin gene sequences and tissue-, caste- and sex-specific expression patterns. Additionally, the recognition of potential JH-target sites in 5' UCR of all hexamerin genes together with the observed JH-effect on the levels of hexamerin transcripts indicate regulation by this hormone.

Results

Structural characteristics of the hexamerin CDSs and respective translation products

The entire CDSs of *hex 70b* and *hex 70a*, as well as a portion of their respective 5' and 3' untranslated regions (UTRs), were previously sequenced by our research group [19,21]. Part of the *hex 110* CDS (a cDNA fragment of 180 bp) also was previously cloned and sequenced in our laboratory [20]. In the current work, the sequencing of *hex 110* was extended to the entire CDS and part of the 5' and 3' UTRs. In addition, we cloned and sequenced the *hex 70c* CDS as well as segments of its UTRs. Sequence analyses using the Artemis platform [22] allowed comparisons of the structural characteristics of *hex* CDSs (Figure 1A, Additional files 1, 2, 3 and 4). Each of these sequences is present as a single copy in the Honeybee Genome Assembly (version 4.0) as confirmed by BLAST searches. The *hex 70a*, *hex 70b* and *hex 70c* sequences are tandemly arrayed in GroupUn.53, whereas *hex 110* is separately positioned in Group 11.32.

The translation products contain the N-terminal sequences determined by Danty et al [23] using automated Edman degradation. The conserved N, M and C hemocyanin domains (Figure 1B) were identified in all hexamerin subunits (HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c and HEX 110), but as previously observed [20], the hemocyanin C domain of HEX 110 is interrupted by a 291 amino acid insertion. This insertion is very rich in glutamine and glutamic acid (Glx) and contributes significantly to the total Glx content (20.9%) of HEX 110.

Some features of the honey bee hexamerin genes and of the respective deduced subunits are compiled in Table 1. The four hexamerin subunits are also characterized by

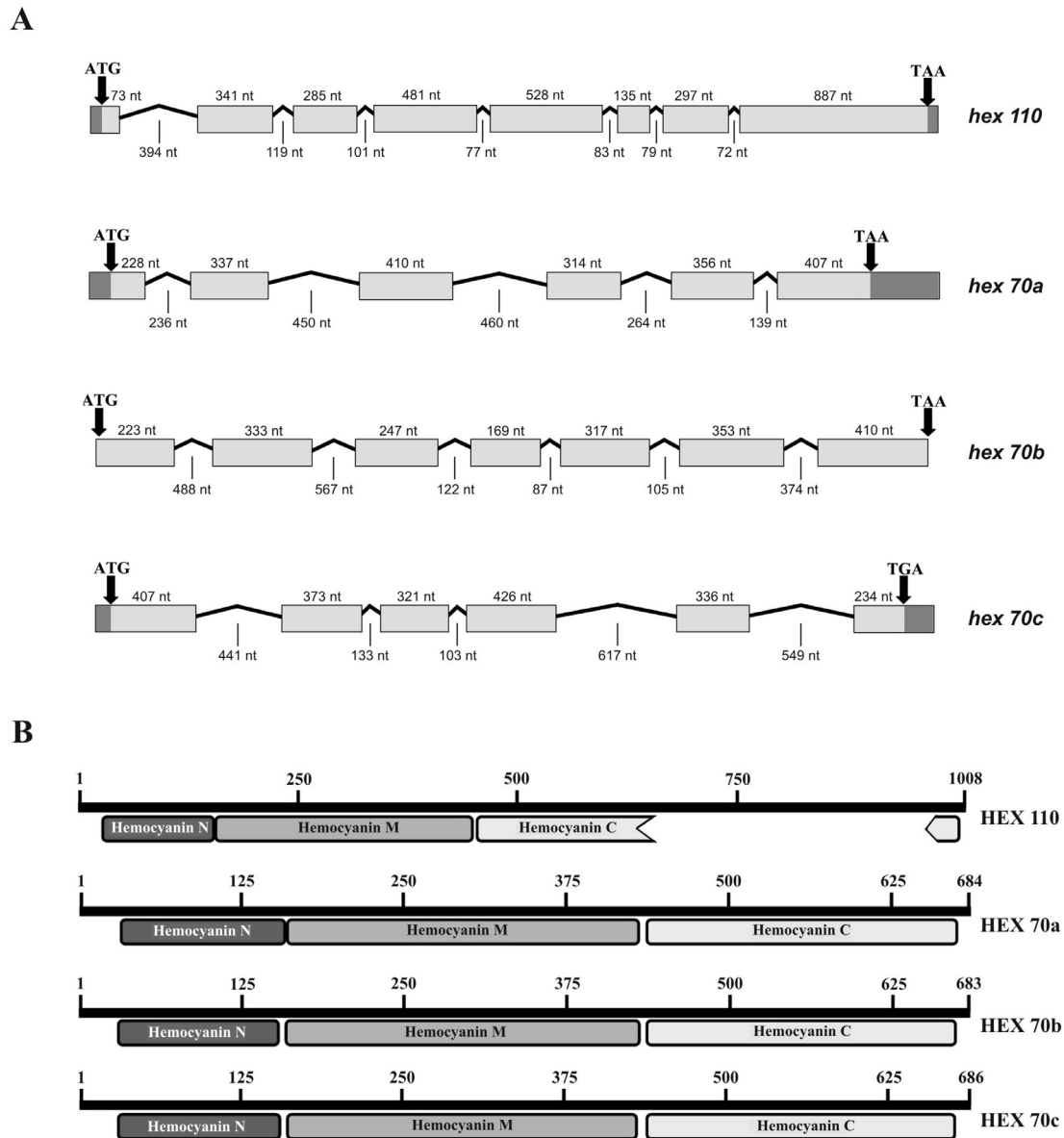


Figure 1 Hexamerin genes and deduced protein subunits. (A) Schematic diagram of hexamerin genes structure. Exons and introns are represented by boxes and lines, respectively. Arrows at the right and left of each gene indicate initiation and termination codons, respectively. Sequenced untranslated regions (UTR) are marked in dark gray. Number of nucleotides (nt) are indicated for exons and introns (exons and the primers used for hexamerin sequencing are marked in the nucleotide sequences shown in Additional files 1, 2, 3 and 4). (B) Diagrams of the deduced hexamerin proteins showing the N, M and C hemocyanin domains. Note that the C domain is interrupted in the HEX 110 sequence. Signal peptides and conserved motifs are marked in hexamerin sequences shown in Additional files 5, 6, 7 and 8.

the presence of glycosylation sites, a conserved histidine and motifs typically found in other insect hexamerins (Additional files 5, 6, 7 and 8). We used the software <http://phobius.sbc.su.se> for prediction of signal peptides and transmembrane topology from the amino acid sequences of each of the hexamerin subunits in the honey bee, HEX110, HEX70a, HEX 70b and HEX 70c. Hydropathy profiles were produced for each of them and included in the Additional file 9. The subunits are predicted to

contain each a signal peptide (Table 1, hydrophobic amino acids specified in Additional file 9) that directs transport of the protein through the secretory pathway. As expected, none of the subunits contain transmembrane helices. With respect to amino acid composition, HEX 70a and HEX 70c contain a relatively high quantity of phenylalanine, tryptophan and tyrosine (18.2% and 16.9%, respectively), and thus belong to the class of aromatic amino acid-rich hexamerins (or arylphorins) [24].

Table 1: Characteristics of hexamerin genes and respective subunits in the honey bee.

Hexamerin genes/ subunits	Gene structure		Conceptual product			
	ORF (nt)	Exon number	Amino acid Number	Molecular mass (kDa)	pI	Signal peptide length
<i>hex 70a</i> /HEX 70a	2,055	6	684	79.19	6.45	21
<i>hex 70b</i> /HEX 70b	2,052	7	683	77.26	6.64	21
<i>hex 70c</i> /HEX 70c	2,061	6	686	79.44	7.67	19
<i>hex 110</i> /HEX 110	3,027	8	1008	110.21	6.37	24

Molecular mass and pI calculated using <http://expasy.org/cgi-bin/protparam> and <http://phobius.sbc.su.se/>

With their relatively high methionine content, HEX 70b (4.4%) and HEX 70c (6.4%) can be included in the class of methionine-rich hexamerins, which are composed of 4 to 11% methionine [10].

The overall amino acid identity shared among the deduced honey bee hexamerins varies from 30% to 42%. A multiple alignment using ClustalW 1.83 (Additional file 10) revealed that HEX 70a, HEX 70b and HEX 70c are more similar to each other (39 to 42% identity) than they are to HEX 110 (30 to 32% identity).

Overrepresented motifs in upstream control regions (UCRs)

Motif analyses of the UCRs were carried out with two goals in mind: to search for potential JH response elements, and to search for hexamerin-specific conserved regions. Table 2 shows six DNA motifs, here named site1 to site6, that are overrepresented in the UCRs of the four hexamerin genes. All of the six motifs were mapped on an extension of the UCR corresponding to 1.5 kb from the translation start codon (Figure 2A). Site1 is 80% identical to the *D. melanogaster* Ultraspiracle (Usp) binding site, also known as chorion factor-1 (CF1, [Flybase ID: FBgn0003964]) [25], and is located very close to the 5' end (Figure 2A and 2D). Two site1 motifs enrich the *hex 110* UCR, whereas only one was found in each of the UCRs of the three *hex 70* genes. None of the other five motifs (site2 to site6) are similar to any binding site described to date in the TRANSFAC database, and may be specific to hexamerin gene UCRs. The *hex 70b* UCR showed the greatest complexity because it is the only one containing all six motifs. Few of these motifs were found in the *hex 70a* UCR, possibly because it is still a gapped DNA region (Figure 2A).

Based on Figure 2A, we graphically represented the types (Figure 2B) and quantities (Figure 2C) of the potential regulatory sites shared by the four honey bee hexam-

erin UCRs. Site1 is shared by all four hexamerin genes; site2 is shared by hex 70a and hex 70b; site3 is present in hex 70b, hex 70c and hex 110; site4 is specific to the hex 70 genes (it is absent from the hex 110 UCR); and site5 and site6 were both detected in hex 70b, hex 70c and hex 110 (Figure 2B). Therefore, the hex 70b and hex 70c UCRs share a maximum of five of these motifs whereas the hex 70a and hex 110 UCRs share only one motif (Figure 2C). This relationship suggests that at least some of the hexamerin genes are co-regulated.

Effect of JH on the expression of hexamerin genes

JH-treatment was performed at the feeding phase of the 5th larval instar. During this developmental phase, larvae have a high titer of JH in hemolymph [26]. The treatment with exogenous hormone aimed to maintain JH titer at a high level for a prolonged period of time, thus circumventing the normal decay that normally occurs at the transition from the feeding to the spinning phase [26]. Figure 3 shows that expression of the genes *hex 70b* and *hex 70c* is higher in JH-treated larvae than in the controls, although the JH-effect on the expression of *hex 70a* and *hex 110* is more discrete. Together, these results support a function of JH in inducing the expression of hexamerin genes in honey bee larvae.

Evolutionary relationship among the honey bee hexamerins and related proteins

We investigated the evolutionary relationships among 45 hexamerin amino acid sequences from six insect orders (Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, Isoptera, and Orthoptera), and hemocyanins from 8 insect species and from a crustacean. The tree structure mainly reflects the molecular relationship at the level of insect order (Figure 4). Within the hymenopteran cluster, the honey bee HEX 110 (named AmeHEX 110 in the

Table 2: DNA motifs discovered in the 5' UCRs of the honey bee hexamerin genes.

Motif name	Motif	Church	Roc-auc	P-value
site1	GnnGwnnmCsshC	9.3E-09	0.98	3.5E-06
site2	TTGyGngnrrnAawk	3.8E-06	0.87	4.4E-04
site3	GsnsakwCgmmnG	3.9E-06	0.97	2.2E-04
site4	gwnAtnnnanwnwTCG AwAwys	3.8E-06	1.00	8.0E-07
site5	awCGAwAAwnnknn wwRnA	9.3E-09	1.00	2.1E-05
site6	ATykCGAaTnmrannA	4.1E-06	0.99	9.5E-06

Site 1 motif is 80% similar to the USP binding site of *D. melanogaster*. The other motifs (sites 2 to 6) do not have similarity to any binding site sequences in TRANSFAC database, and may be specific of hexamerin genes.

tree) grouped with two hexamerins from *Nasonia vitripennis* wasps, NviHEX102 and NviHEX109. Like the honey bee HEX 110 (with ~110 kDa and 20.9% Glx), these wasp hexamerins have a molecular mass higher than that typically exhibited by hexamerins (102 kDa and 109 kDa, respectively) and are composed of a high or very high proportion of Glx (here defined as 10% to 15%, and >15%, respectively). Explicitly, NviHEX102 and NviHEX109 are composed of 14.2% and 15.1% Glx, respectively. The other hymenopteran hexamerins [NviHEX79, NviHEX75, NviHEX81, NviHEX94, NviHEX83; CfeHEX2; AmeHEX70a (HEX 70a), AmeHEX70b (HEX 70b), AmeHEX70c (HEX 70c)], which are in the range of 70-95 kDa, generally display an intermediary Glx content (7%<Glx<10%). Exceptions in this group are NviHEX79 and NviHEX81, which have higher amounts of Glx (10.1% and 11.8%, respectively).

Most of the hymenopteran hexamerins (seven of twelve) contain more than 15% aromatic amino acids, and are therefore considered arylphorins. Five of twelve meet the criterion for inclusion in the methionine-rich class. A wasp hexamerin (NviHEX79) and two of the honey bee hexamerins (HEX 70a, HEX 70b) contain more than 10% leucine and are here defined as leucine-rich.

Hexamerins from the coleopterans *Tribolium castaneum* and *Tenebrio molitor* form a well-defined group (Figure 4). Without exception, they are all arylphorins. Aside from TcaHEX5, they all have a high Glx content (at 9.8% Glx, TcaHEX5 fails to meet our criterion for inclusion among the high-Glx hexamerins by a small margin).

Among lepidopterans (Figure 4), the arylphorin BmoSP2 is positioned separately from the methionine-rich hexamerins HceHEX1, HzeHEX, TniJHSP2, CfuDAP2, BmoSP1 and HceHEX2, which are organized in two branches, one of them also including HviHEX. As only part of the HviHEX sequence is available in data Bank, we could not classify it as an arylphorin or a methionine-rich hexamerin. All lepidopteran hexamerins contain intermediary or low Glx (< 7%) content, and only

three of them (HceHEX1, HzeHEX and TniJHSP) are rich in leucine. Interestingly, these leucine-rich hexamerins were grouped in a single branch.

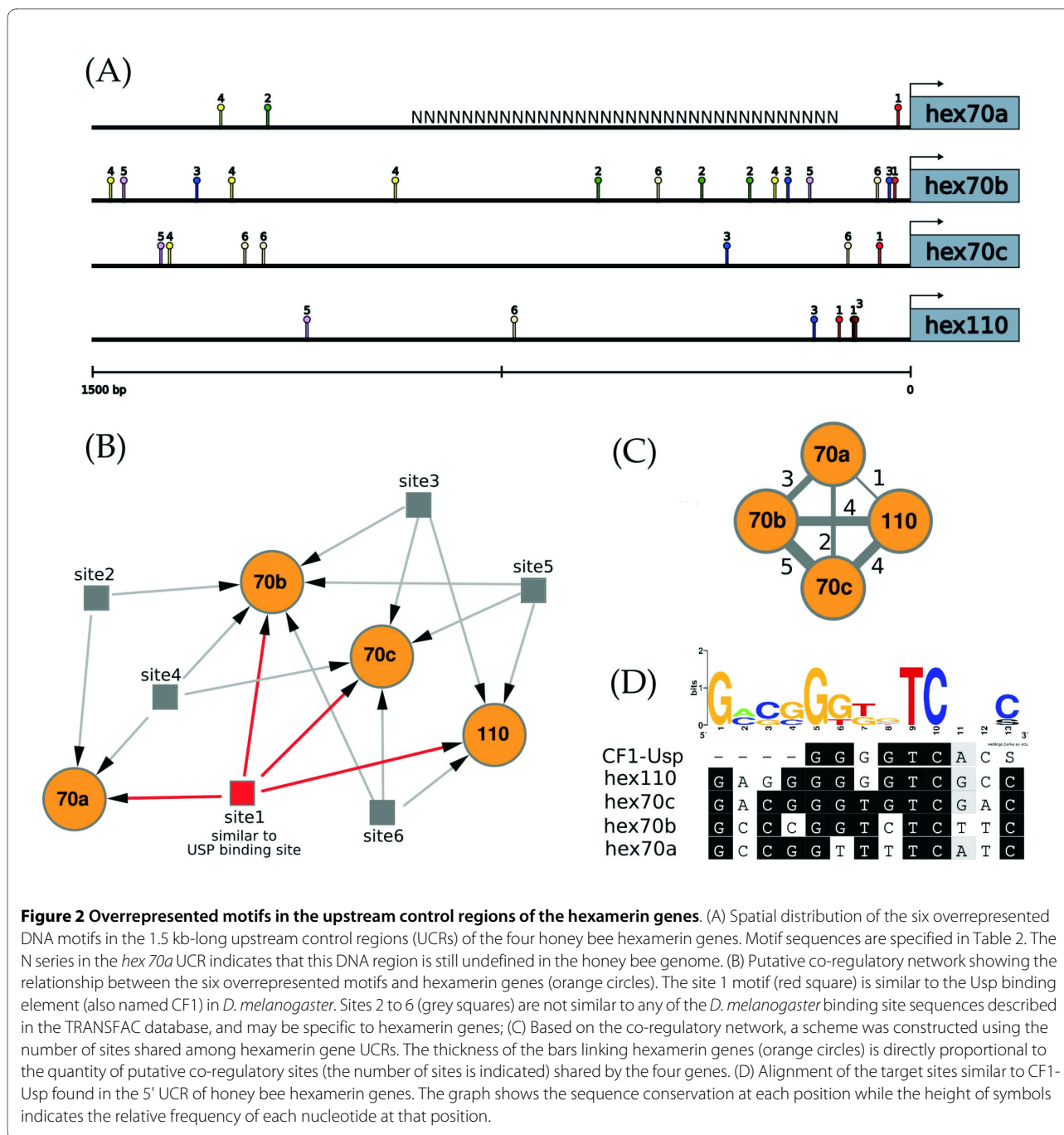
A branch of dipteran hexamerins (Figure 4) included the very high Glx (20%)/high molecular mass DmeFBP1 and two other hexamerins from *D. melanogaster*, Dme7320 and Dme8100, both containing a high Glx content (13.7% and 10.8%, respectively), but a typical molecular mass ~70 kDa. All hexamerins in this branch are rich in leucine. The other three main branches consist of hexamerins in the range of 82-99 kDa. One of them clustered the DmeLSP1 isoforms (α , β and γ). The other two branches grouped some *Anopheles gambiae* hexamerins with OatHEX 1.2 from the mosquito *Ochlerotatus atropalpus*, and some *A. gambiae* hexamerins with DmeLSP2. Except for some incomplete sequences (Aga29840, Aga16795, and Aga31208) for which we could not determine the exact amino acid composition, all the hexamerins forming these three branches are arylphorins, and OatHEX1.2, DmeLSP1 α and DmeLSP1 β are also rich in methionine. Several of them have a high Glx content. None is rich in leucine.

The only orthopteran hexamerin used in tree construction, LmiJHBS (Figure 4), is distinguished by a high proportion of leucine. The basal position of this hexamerin is evident. Two isopteran hexamerins, RfiHEX1 and RfiHEX2 clustered in a single branch. Both are arylphorins, but RfiHEX1 is also rich in methionine. RfiHEX2, but not RfiHEX1, has a high Glx content (10.4%).

As expected, the insect hemocyanins clustered separately from the hexamerins (Figure 4), and formed a well-supported monophyletic clade (1.0 Bayesian posterior probability), with ScuHC1 at the most basal position.

Expression of hexamerin genes in the fat body of developing and adult workers, queens and drones

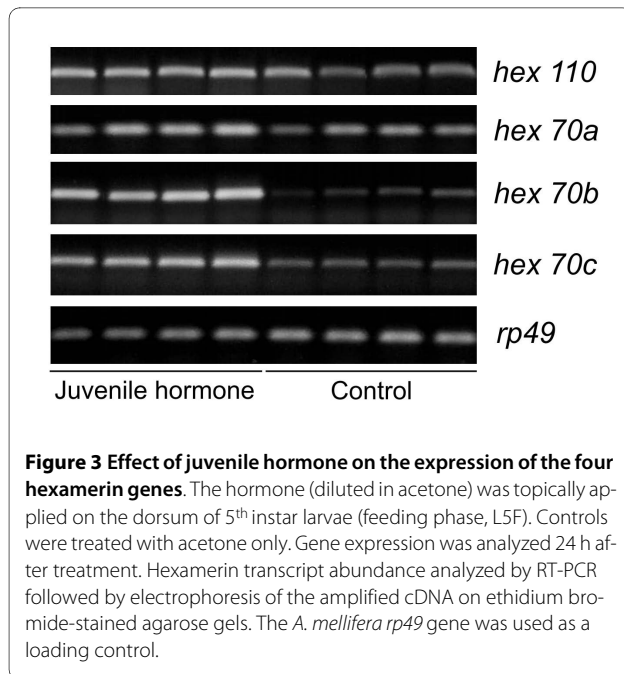
Figure 5 schematically represents RT-PCR transcriptional profiles from the current and previous studies of the four



hexamerin genes in the fat body of workers, queens and drones (see Additional file 11). Relative expression is shown from the 5th larval instar throughout the pupal and adult stages. Because the expression data on earlier larval phases (2nd to 4th larval instars) was mostly obtained using workers instead of queens and drones, they are not shown here.

In the fat body of workers, *hex 110* transcripts were abundant from the 5th larval instar throughout the pupal stage, with a decrease in the amount of transcripts nearby

the time of adult eclosion. But expression increased again in adult workers. In contrast, in the fat body of drones and queens, *hex 110* expression was found basically in the 5th larval instar, extending up to the early pupal stage in queens. The expression of *hex 70a* differs from *hex 110* mainly in adults, which showed sex- and caste-specific patterns of *hex 70a* transcription. Workers and drones showed high levels of *hex 70a* transcripts up to the ages of 30 and 5 days, respectively. In 3- to 7-day-old virgin queens, *hex 70a* expression was reduced in comparison



to the newly emerged ones, but increased again in older, egg-laying queens. Comparatively, the expression of *hex 70a* is lower in adult queens than in adult workers. The expression of the other two hexamerin genes, *hex 70b* and *hex 70c*, was detectable only in the 5th larval instar of females and males.

Together, the data summarized in Figure 5 highlight that: (1) all the honey bee hexamerin genes are highly expressed in the larval fat body of workers, queens and drones, and (2) *hex 110* and *hex 70a* were transcribed in a caste- and sex-specific fashion in pupal and adult fat body. These expression patterns suggest that in addition to their primary role as storage proteins that supply amino acids during non-feeding pupal development, hexamerins have different functions in the adult stage.

Using real-time RT-PCR we quantified the levels of the four hexamerin transcripts in the fat body at two periods of the honey bee life cycle: during larval-pupal transition and in adults. Figure 6A shows that the transcriptional profiles are similarly modulated, with an abrupt increase in the quantity of transcripts in the 5th larval instar, followed by a marked decrease in newly ecdysed pupae. However, at definite points of this developmental period, we found interesting differences among the honey bee morphotypes. In workers and drones, the four hexamerin transcripts reached maximal levels during the feeding phase of the 5th larval instar (L5F). In queens, maximal transcript levels were detected at the subsequent spinning phase (L5S) (except for *hex 70b* transcripts, which reached maximal levels in L5F). Moreover, the maximal expression in workers and drones was significantly higher than the maximal expression in queens (except for *hex*

70c). Figure 6A also shows that in workers and drones at the L5F phase, when expression of the four hexamerin genes reached a maximum, the levels of *hex 110/hex 70b* transcripts were much higher than the levels of *hex 70a/hex 70c* transcripts.

Pearson's correlation coefficient (R) was used to evaluate the relationship among these expression profiles. Figure 6B graphically represents the hexamerin genes (orange circles) linked by bars. The greater the thickness of the bar, the greater the R value. In queens, the expression profiles of *hex 110* and *hex 70c* were the only positively correlated. In drones, by contrast, the expression profiles of all the hexamerin genes except *hex 70b/hex 110* were positively correlated. Similarly, in workers the expression profiles of all but *hex 70b/hex 110* and *hex 70b/hex 70c* were positively correlated. Therefore, workers and drones share similar transcriptional profiles during the larval-pupal transition that are distinct from those exhibited by queens. In other words, workers and drones differ from queens in the patterns of co-expression of the four hexamerin genes.

Fat body from adult females was also used to quantitatively compare the levels of *hex 70a* and *hex 110* transcripts (the only ones found at this stage). We compared age-matched workers and queens (3-day-old), but to investigate the effect of mating in transcript levels, we also included egg-laying queens in this analysis. Figure 7 shows that 3-day old workers have a significantly higher quantity of both transcripts than queens, independent of their reproductive status.

Expression of hexamerin genes in the gonads of developing and adult workers, queens and drones

The expression of hexamerin genes was also investigated in developing and adult female and male gonads using RT-PCR (Figure 8; see Additional file 12). The only hexamerin gene apparently inactive in ovaries and testes is *hex 70c*, as presumed from the complete absence of its transcript in these organs. The levels of *hex 70b* transcripts were abundant, but only in the larval gonads of queens and drones. A high level of *hex 110* mRNA was found in the larval gonads of workers, queens, and drones. Expression then decreases during the pupal stage to be resumed exclusively in the ovaries of egg-laying queens. Similarly, a relatively high level of *hex 70a* transcripts was found in the gonads of workers and drones at the larval/pupal stages, and in the ovaries of queens at the pupal/early adult stages. This is followed by transcript depletion in the gonads of workers and drones, but not in the ovaries of virgin and egg-laying queens where *hex 70a* expression is maintained, although at a low level, throughout the adult stage.

In summary, the presence of hexamerin transcripts in larval and pupal gonads of workers, drones and queens

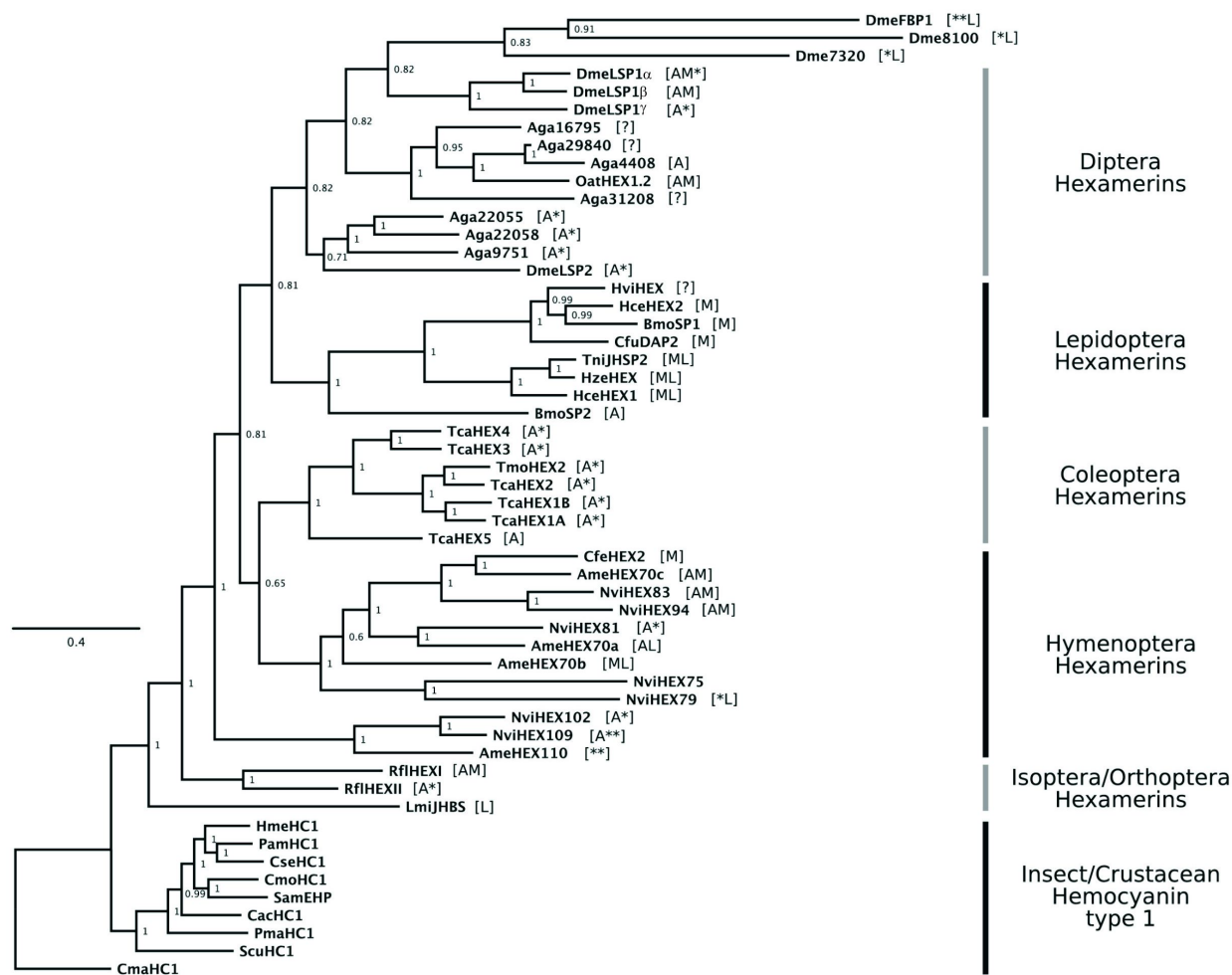


Figure 4 Evolutionary relationships among insect hexamerins and hemocyanins. The phylogenetic tree was inferred by bayesian method and the posterior probabilities are represented at each node. [See Additional data for the accession numbers of hexamerins and hemocyanins included in the tree (file 14), and for the alignment use in tree reconstruction (file 15)]. Symbols and letters in brackets indicate: ** very high-Glx content (>15%); * high-Glx content (between 10% and 15%); A: arylphorin; M: methionine-rich; L: leucine-rich; ? indicates that amino acid composition could not be determined. The first three letters of the protein's abbreviation represent the species: Cma: *Cancer magister*; Scu: *Sinella curviseta*; Pma: *Perla marginata*; Cac: *Chelidurella acanthopygia*; Sam: *Schistocerca americana*; Cmo: *Carausius morosus*; Cse: *Cryptotermes secundus*; Pam: *Periplaneta americana*; Hme: *Hierodula membranacea*; Rfl: *Reticuliformis flavipes*; Lmi: *Locusta migratoria*; Ame: *Apis mellifera*; Nvi: *Nasonia vitripennis*; Cfe: *Camponotus festinatus*; Tca: *Tenebrio castaneum*; Tmo: *Tenebrio molitor*; Bmo: *Bombyx mori*; Hce: *Hyalophora cecropia*; Hze: *Helicoverpa zea*; Tni: *Trichoplusia ni*; Cfu: *Choristoneura fumiferana*; Hce: *Hyalophora cecropia*; Hvi: *Heliopsis virescens*; Dme: *Drosophila melanogaster*; Aga: *Anopheles gambiae*; Oat: *Ochlerotatus atropalpus*.

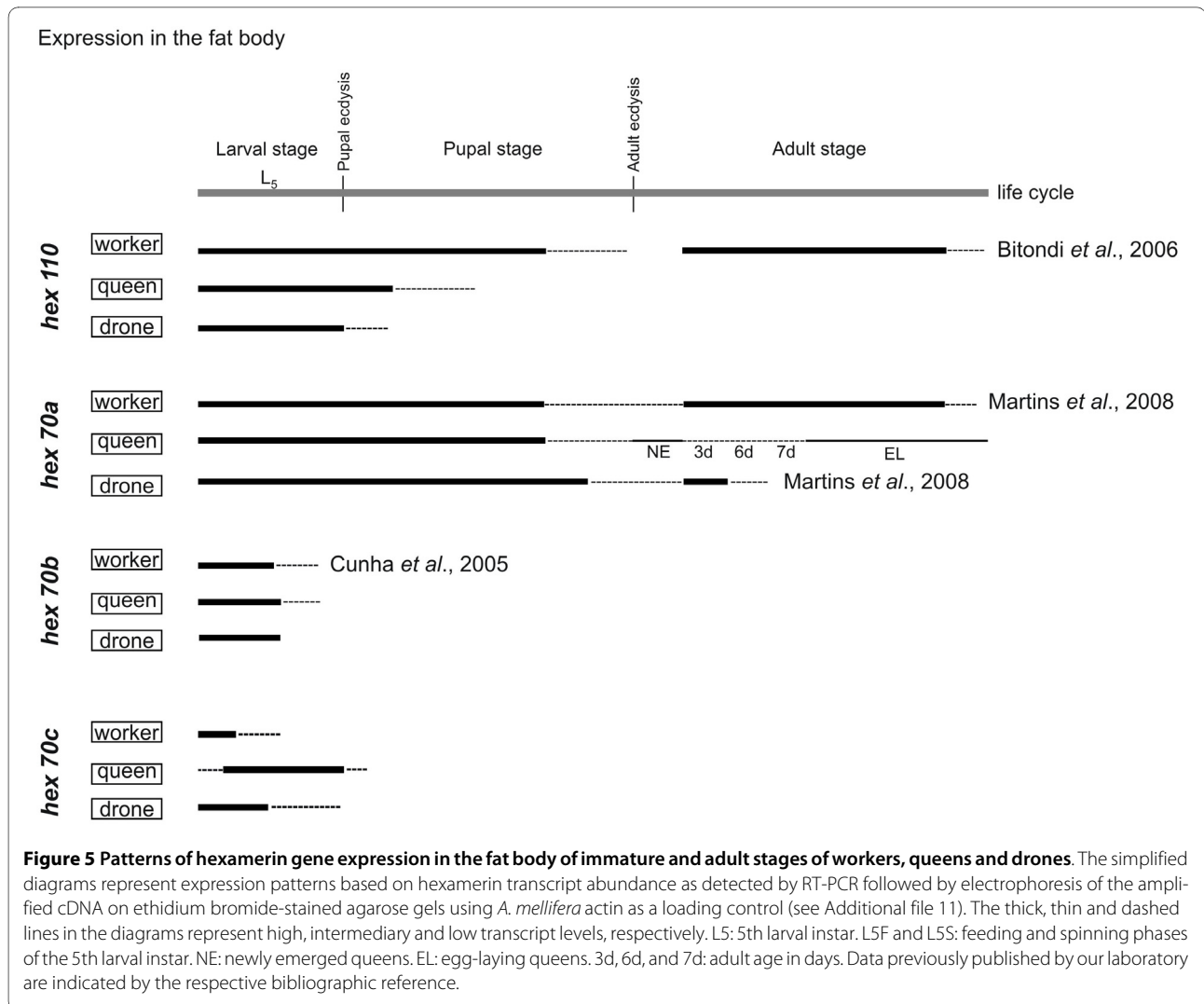
suggests roles in ovary and testis development, and in spermatogenesis, which occurs during the pupal stage. The higher expression of *hex 110* in the ovaries of egg-laying than virgin queens is remarkable, and suggests a function in reproduction.

Discussion

Hexamerin genes and deduced proteins revealed striking structural differences

The tandem organization of the *hex 70a*, *70b* and *70c* genes in the honey bee genome supports the hypothesis of origin by gene duplication, a common phenomenon

among insect hexamerins [27]. The separately located *hex 110* gene exhibits unusual features throughout its sequence. It encodes a subunit that is longer than those usually found, and which carries a very high proportion of Glx (20.9%). Because these features are also displayed by hexamerins found in some species of ants [28] and wasps [29], it had been previously thought that they were restricted to hymenopterans. In fact, two hexamerins in the *N. vitripennis* wasp (NviHEX102 and NviHEX109) exhibit such characteristics (see Figure 4). However, a receptor in *Drosophila*, DmFBP1 (which is closely related to its own ligand DmLSP1) [30], is also composed by a



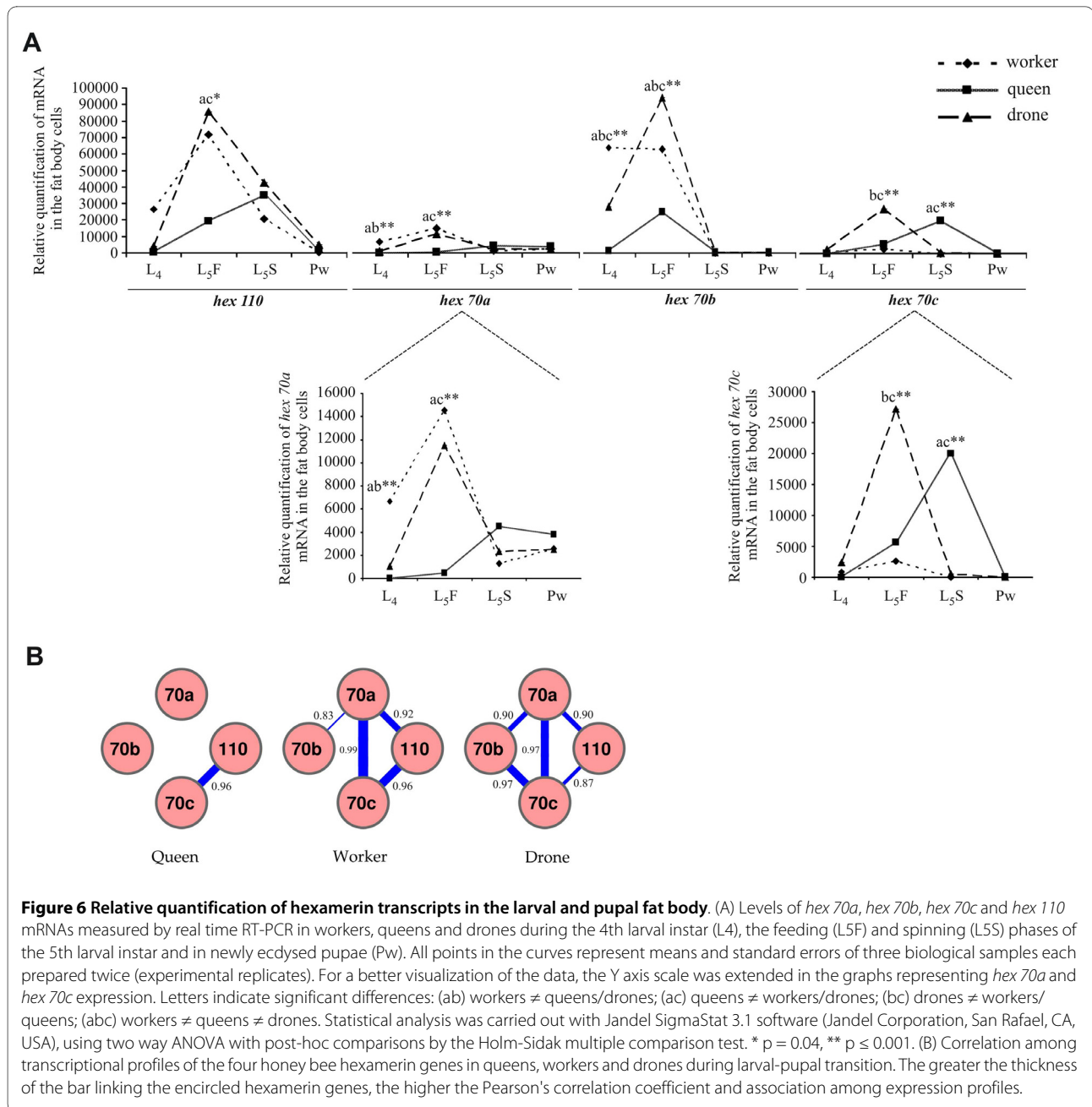
very high Glx content (20%) and has a high molecular mass (116 kDa). We also identified hexamerins containing slightly lower Glx percentages (between 10% and 15%) among the dipterans, coleopterans and in the isopteran included in the tree (see Figure 4). The physiological significance of such a high proportion of glutamine and glutamic acid in hexamerins remains to be elucidated.

A conserved histidine residue was identified in each of the four amino acid sequences. In the ancestral hemocyanins, six copper-liganding histidines confer the ability to bind and transport oxygen. The insect hexamerins lost most or all of the histidine residues and, thus, the oxygen-binding function [31].

The ~70 kDa hexamerins in the honey bee were classified as arylphorins and/or methionine-rich, according to their particular amino acid composition. Due to the importance of aromatic amino acids in sclerotization, the HEX 70a and HEX 70c arylphorins may contribute to

exoskeleton hardening and differentiation during pharate adult development. HEX 70c is also rich in methionine, and like HEX 70b (also a methionine-rich hexamerin) it may act as a sulfur reserve for development toward the adult stage.

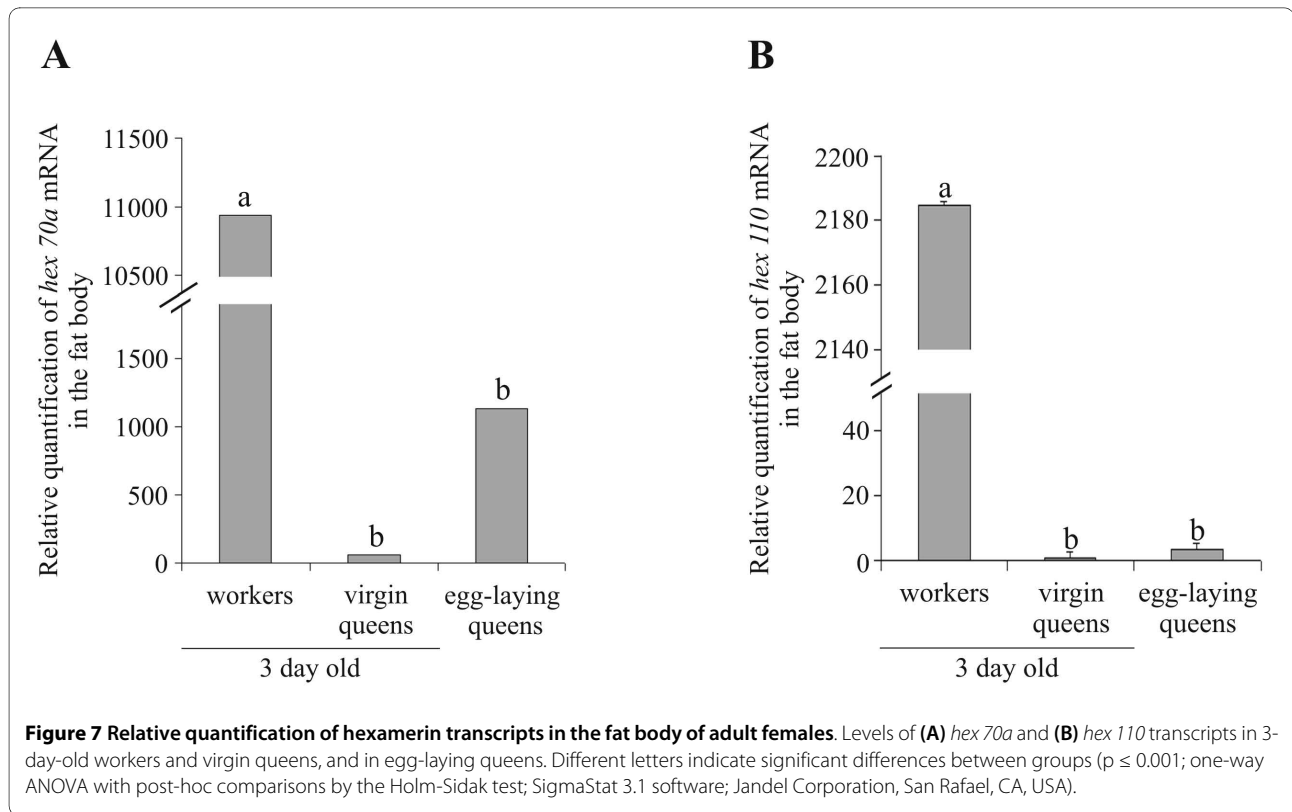
The search for *cis*-acting elements in the UCR of each hexamerin gene using bioinformatic analyses revealed a total of six overrepresented DNA motifs. It was very interesting to find out that all four hexamerin genes exhibit potential binding sites for the protein Usp, thus suggesting regulation by JH and/or ecdysteroids. Usp has been primarily studied as part of the 20-hydroxyecdysone (20E)-binding nuclear receptor complex [32,33]. However it was recently also identified as a potential target for compounds based on a methyl farnesoid structure, like JH [34]. The potential Usp binding motif is located near the start codon of each hexamerin gene (see Figure 2A), a conserved pattern that increases the likelihood of its functionality. Using a hormone manipulation experi-



ment, we recently demonstrated that *hex 70b* is induced by JH and repressed by 20E [19]. In the current study we expanded this experiment to investigate the action of JH on the expression of the other honey bee hexamerin genes. To make this approach comparative, we re-tested the expression of *hex 70b* in the same fat body samples used for the analysis of the other genes. The results showed a strong and positive JH-influence on the expression of *hex 70b* and *hex 70c*, and a weaker effect on the expression of *hex 70a* and *hex 110*. The observed differential effect of JH on expression levels suggests that the JH titer that induces a hexamerin gene for maximal

expression may differ from the JH-threshold needed for maximal expression of their homologous. Further studies using a series of JH doses for treating aged-synchronized honey bee larvae may confirm (or refute) this hypothesis. These results are in accord with the proposed functionality of the Usp regulatory element in UCRs.

In addition to the potential Usp binding motif, five additional motifs (site2 to site6) were overrepresented in the UCRs of all four hexamerin genes, suggesting co-regulation. In the context of metamorphosis, or larval-pupal transition, this would assure the massive and synchronized production of hexamerins in late larvae for using



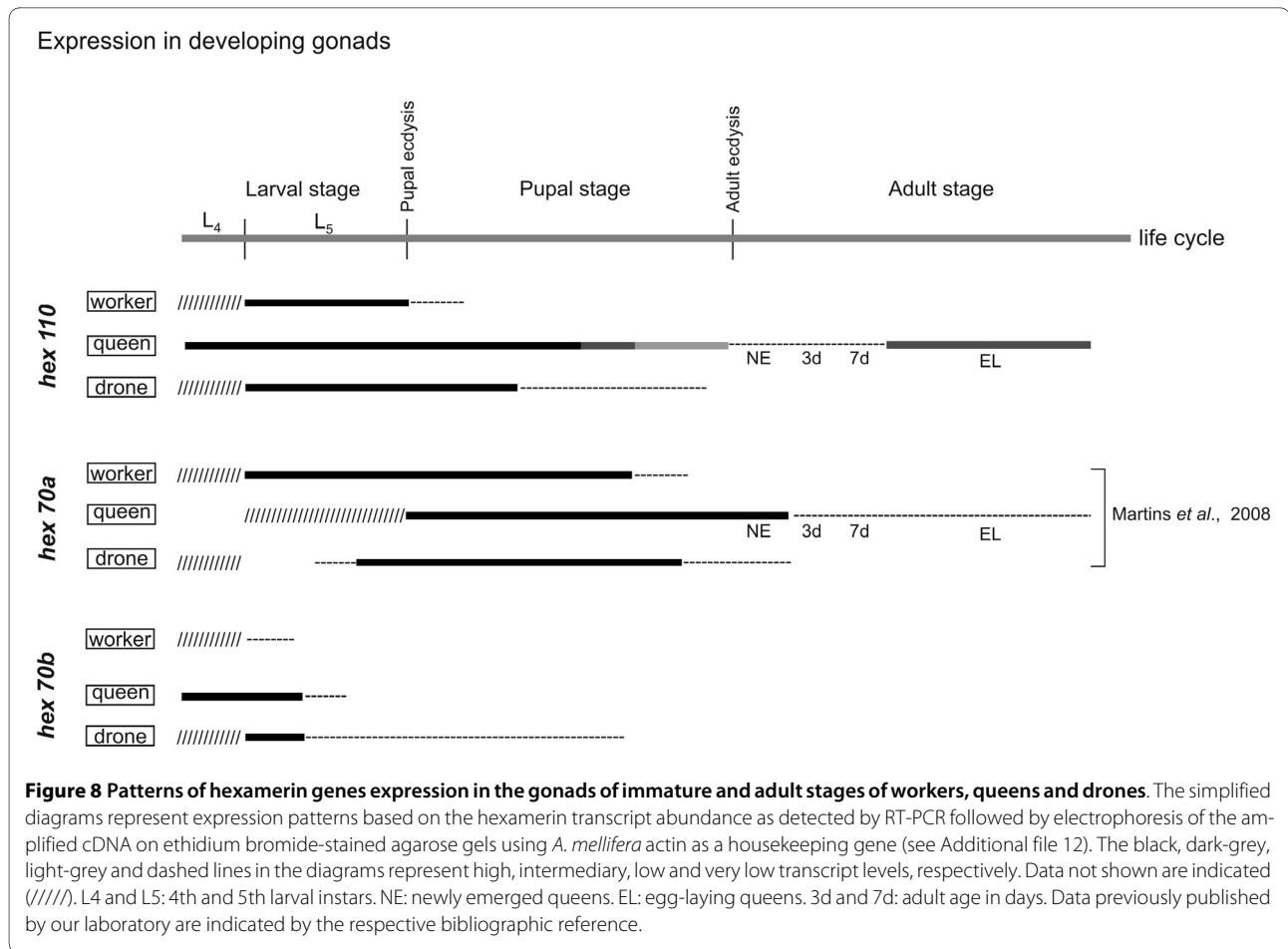
during pupal and pharate-adult development. In fact, all four hexamerin genes reached their highest expression level during the very same stage, the 5th larval instar (see Figure 6A). Lending support to the idea of co-regulation, we found that the transcriptional profiles of the hexamerin genes in each caste and sex during the larval-pupal transition are in general positively correlated. Regulatory factors could interact with the common sequence motifs, thus influencing the correlated expression. However, the transcriptional profiles of *hex 70b/hex 110* in workers and drones, and of *hex 70b/hex 70c* in workers, did not show a positive correlation (see Figure 6B). Furthermore, in metamorphosing queens, only the *hex 70c* and *hex 110* transcriptional profiles showed a significant Pearson's correlation coefficient. Such differences might be due to structural features in the architecture of each hexamerin gene UCR, such as the type, number and spatial distribution of the overrepresented motifs, which raises the possibility of nuanced differences in the co-regulatory mechanism.

Diversification of hexamerins associated with independent radiation within insect orders

Based on amino acid sequence similarities and hexameric structure, it has been proposed that arthropod hemocyanins gave rise to the insect hexamerins [31,35], which lost the ability to bind Cu^{2+} ions. Therefore, in contrast to the ancestral molecule, hexamerins do not bind and deliver

hemolymph oxygen, but mainly have a role as storage proteins. The molecular phylogeny shown in Figure 4 shows a complex pattern of hexamerin evolution, with independent radiation in each of the selected insect orders. In general, our analysis resulted in a similar tree topology as those published before [36], with the hemimetabola (orthopteran and isopteran) hexamerins in a basal position, followed by hymenopteran and coleopteran hexamerins, which are basal to the lepidopteran and dipteran ones. As previously noticed, these evolutionary relationships are in good agreement with phylogeny of insect orders [37].

Most of the information on hexamerin evolution derives from studies on dipteran and lepidopteran species, with a few studies on other holometabolous and hemimetabolous orders, although data from an evolutionarily less-derived order (Plecoptera) have been recently published [38]. The main contribution of the current phylogenetic analysis was to explore the evolutionary relationship among the honey bee hexamerins and their homologue sequences in other insect orders. It is evident in our phylogenetic tree that the high molecular mass AmeHEX110 is located at the most basal position among the holometabola hexamerins. AmeHEX110 shares this position with two probable orthologues, NviHEX102 and NviHEX109. Similarly, the gene encoding AmeHEX70a apparently has an orthologue, NviHEX81, in the genome of *N. vitripennis*. Other poten-



tial orthology relationship was exhibited by the honey bee AmeHEX70c, and the ant CfeHEX2.

The molecular phylogeny also revealed a potential orthology relationship outside the hymenopteran clade, between the hexamerins from *T. molitor*, TmoHEX2, and *T. castaneum*, TcaHEX2, but a definitive conclusion would only be possible if *T. molitor* had its genome sequenced. For the lepidopteran hexamerin sequences it is more complicated to infer orthology relationships, at least until they were available in public databases. Orthology may be a reflection of functional equivalence, although it is important to consider that in view of gene loss and other events in evolution of a group of organisms, genes from different species sharing high sequence similarity may be not orthologues at all [39]. Functional studies are therefore decisive to elucidate this complex relationship among hexamerin genes.

A relevant observation taken from our molecular phylogeny is the well-supported split between dipteran hexamerins and the group formed by the hexamerin receptor DmeFBP1 and Dme8100 plus Dme7320 (0.82 posterior probability; Figure 4). It has already been suggested that dipteran hexamerin receptors, which also belong to the

hemocyanin-hexamerin superfamily, form a separate group in phylogenetic trees [37]. Whether these other two DmeFBP1 paralogs have a similar function is still unknown.

It is also obvious that most of the lepidopteran hexamerins used in tree reconstruction are methionine-rich proteins, thus suggesting that they derived from an ancestral molecule containing a high proportion of this amino acid. We also observed that, except for AmeHEX110 every basal hexamerin in each insect order is an arylphorin, thus suggesting that insect hexamerins have evolved from an ancestral arylphorin. Our phylogenetic analysis also supports the hypothesis of gene duplication events taking place mainly after the split of insect orders.

Expression of hexamerin genes in larval fat body: the well-known role in metamorphosis and a putative role in binding JH and regulating caste differentiation

The four hexamerin genes were highly transcribed in the larval fat body of workers, queens and drones, and are probably involved in hexamerin synthesis for amino acid storage to support metamorphosis and development

toward the adult stage. However, these genes were differentially co-expressed in the honey bee morphotypes, as revealed by transcript quantification during the critical period of larval-pupal transition. The most evident difference occurred during the feeding phase of the 5th larval instar (L5F), where we observed a higher level of *hex 110*, *hex 70a* and *hex 70b* transcripts in workers and drones than in queens. This is a very interesting finding if contrasted to the caste and sex-specific JH titer at this stage, which is higher in queens than in workers and drones [26,40]. It is known that JH plays a central role in phenotypic caste differentiation in *A. mellifera*. This hormone triggers specific physiological responses in the bipotent female larvae, a high titer inducing development of a queen and a low titer specifying the worker phenotype [41,42]. The inverse relationship between levels of hexamerin transcripts and JH titers leads us to speculate that, as was proposed for the termite *Reticulitermes flavipes* [14,15,43,44], the honey bee hexamerins may function as JH-binding proteins. By binding and controlling JH levels, hexamerins were implicated in the process of JH-dependent caste differentiation in this termite. By applying this model to the honey bee, we may hypothesize that if JH titer exceeded the binding capacity of hexamerins, it would interact with target receptors and therefore cause the bipotent female larva to develop as a queen. If not, the larva would develop as a worker. Interestingly, all the four hexamerin genes showed a significantly higher expression in drone feeding larvae (low JH titer) than in queens at the same stage (high JH titer), thus reinforcing our hypothesis on a role for the honey bee hexamerins in binding and controlling JH action. But this needs further validation.

To our knowledge, hexameric JH-binding proteins have been characterized only in orthopterans [2,3,45]. The cDNA and predicted amino acid sequences of the high affinity JH-binding hexamerin from *L. migratoria* (LmiJHBS) show peculiar structural features. It is clear that LmiJHBS is not closely related to any other hexamerin, including the potential JH-binding hexamerin from *R. flavipes* (RfHEX1) and the honey bee hexamerins (see Figure 4). The lack of homology clearly indicates that these hexamerins have evolved independently, and it is unlikely that comparisons among their primary sequences will bring to light amino acid regions or domains that could be involved in JH binding. Such regions or domains could not be identified in the LmJHBS sequence [3]. Thus, functional binding assays and determination of dissociation constants are required to assess the potential role of hexamerins in binding JH and, by extension, to verify the role of the honey bee hexamerins in caste determination.

An interesting finding is that insect hexamerins may not directly bind JH but may be part of a multiprotein

complex engaged in JH sequestration and transport. The first demonstration of a physical interaction among JH-binding proteins (both free and in a complex with JH), two hexamerins (one of them is an arylphorin), and an apolipophorin was recently provided [46]. This interaction implies an important participation of hexamerins in regulating JH levels, and action, even if they do not directly bind to JH.

Re-induction of hexamerin gene expression in the adult fat body: differential roles in workers and queens

In agreement with previous reports on hemolymph proteins in the honey bee [23,47], lower levels of hexamerin gene expression were found in adult workers in comparison to larvae. Of the four hexamerin genes, *hex 70a* and *hex 110* were the only ones with detectable expression in the adult fat body. Their transcriptional profiles differed conspicuously among adult queens, drones and workers. Levels of *hex 70a* transcripts were very low in queens and abundant in drones and workers. However, in drones, the abundance is limited to the five first post-emergence days, whereas, in workers, it is extended up to the 30th day of adult life. These transcriptional profiles in workers and drones match the respective HEX 70a profiles in hemolymph [21], and are closely connected with adult life duration. Workers live longer than drones [48,49], and their respective patterns of *hex 70a* expression reflects fat body metabolic activity and lifespan. But the higher expression of *hex 70a* in the fat body of adult workers in comparison to queens (see Figures 5 and 7) suggests an important role in worker physiology. This is discussed below.

The expression of *hex 110* is somewhat different when compared to that of *hex 70a*. Like *hex 70a*, the *hex 110* gene is considerably active in the fat body of adult workers, but it is practically silent in queens (see Figures 5 and 7) and drones (see Figure 5). Yet, in spite of the evident presence of *hex 110* transcripts in adult workers, a negligible amount of HEX 110 subunits were detected in hemolymph [20], indicating that this hexamerin does not function as a storage protein at this stage. But a potential function in the fat body of adult workers cannot be ruled out, given its specific and abundant expression in this tissue.

Our results are consistent with re-induction of *hex 70a* and *hex 110* expression in adult bees, although only the product of *hex 70a* accumulates in hemolymph at this stage. The presence of hexamerins in adult insects may occur either because they were carried over from the larval stage, or due to a specific induction in adults. As examples, some lepidopterans that do not feed on protein as adults may use the larval store of hexamerins for egg production [5]; mRNAs for an adult-specific hexamerin appears in *Musca domestica* females only after induction

by a rich protein meal [50]. Differently, the presence of HEX 70a in the adult honey bee results from gene re-induction after a drastic reduction in transcript levels during adult ecdysis (see Figure 5).

The honey bee queen continuously receives, via trophallaxis, a proteinaceous glandular secretion, the royal jelly, which is produced by nurse workers [51]. She may not need to allocate amino acids from larval hexamerins for egg production, since such compounds are continuously derived from her protein-enriched diet. The structural nutrients and energy contained in royal jelly administered to queens are not used for the synthesis and storage of hexamerins (levels of hexamerin transcripts are very low, or undetectable, in the fat body of adult queens; see Figures 5 and 7) but must be mainly directed to vitellogenesis and egg production. In contrast to the queen, workers normally do not produce eggs, although they also have access to a rich source of dietary proteins. They actively consume pollen when they are younger, i.e., during the first two weeks of adult life [52]. Pollen consumption increases the expression of *hex 70a* and *hex 110* in the fat body, and increases the abundance of HEX 70a in hemolymph [20,21]. This is consistent with dietary protein consumption causing reinduction of both hexamerin genes in adult workers, and thereby enabling the storage of HEX 70a. Whether *hex 110* mRNAs are translated and, if so, why their subunits do not accumulate in hemolymph are questions that remain unanswered.

Pollen consumption also causes the accumulation of vitellogenin, the yolk protein precursor, in the hemolymph of young workers [53]. Vitellogenin is continuously produced and stored in hemolymph during the first two weeks of adulthood to be subsequently depleted as worker bees get older and become foragers [54-57]. HEX 70a follows a similar pattern.

Since workers normally do not reproduce and in general have a short life, the question that remains unanswered is: why do they store proteins? We suggest that the consumption of pollen by young workers exceeds demand, and the excess is hoarded in the form of storage proteins to be consumed later, when they become foragers. Foragers rather eat nectar [58], which is composed primarily by carbohydrates [59]. By this means, stored proteins could provide amino acids for sustaining worker basal metabolism during foraging. The well documented observations that HEX 70a [21], vitellogenin [55-57], and total hemolymph protein titers [60] decrease gradually in foragers is consistent with this hypothesis.

The destination of proteins stored in worker hemolymph would not be fixed, but dependent on the social context. In case there is queen loss, workers may activate their ovaries for drone production. Their protein reserves would then be directed to meet reproduction demands. Interestingly, workers accumulate storage proteins when

they are younger and more prone to activate their ovaries if separated from the queen. Also in the ant *Camponotus festinatus*, hexamerins are possibly involved in important facets of sociality. It was demonstrated that in the presence of larvae, adult workers do not store, but apparently make use of hexamerins to nourish larvae. Conversely, hexamerins accumulate in hemolymph of workers with no larvae to feed. It was also observed that hexamerins exist in great amounts in virgin queens and are depleted when they seal themselves in a chamber to lay eggs to found a new colony, thus indicating utilization for egg production and rearing the first brood [11,12]. The high levels of hexamerins stored by certain species of termites were also found to be related to colony founding and to the production of initial broods [13].

In adult honey bee workers, vitellogenin and HEX 70a may be part of the above mentioned multiprotein complex engaged in JH binding and sequestration [46], since the presence of both in hemolymph coincides with a low JH titer (in younger workers), and their depletion occurs in synergy with JH titer increase (in foragers). If so, as proposed for vitellogenin [61], HEX 70a also may be a player in the physiological process of JH-regulated transition to forager.

Yet, HEX 70a may have developed another role in adult workers. A protein fragment found in the honey bee venom [62] matched HEX 70a N-terminal sequence. Its function in the venom, and whether it is synthesized by the venom gland or sequestered from hemolymph, was not yet determined.

Hexamerin gene expression in gonads: a proposed role in ovary and testis development and activity

Among solitary insects there is circumstantial evidence supporting the hypothesis that hexamerins are also used for reproduction. In lepidopteran species, for example, it was established a correlation between egg production and depletion of the larval reserve of hexamerins [4,5]. Autogenous mosquitoes that produce their first batch of eggs without a feeding may use larval storage proteins, mainly hexamerins, as amino acid source for this purpose [6,7]. It has also been suggested that amino acids held in storage proteins are used for provisioning eggs of *Schistocerca americana* [8].

To shed light on whether the "adult" honey bee hexamerins are important or not for reproduction, we checked for the presence of transcripts in the gonads. Except for *hex 70c*, hexamerin transcripts were abundant in the gonads of larvae and pupae, suggesting roles in ovary differentiation, and also in spermatogenesis, which in drones occurs during pupal stage and is finalized before adult emergence. Two of the hexamerin genes, *hex 70a* and *hex 110*, were also expressed in adult gonads, and this was exclusively in queen ovaries. Interestingly, the

expression of *hex 110* is higher in the ovaries of mated, egg-laying queens than in the young, virgin ones.

It is known that mating triggers changes in gene expression in *Drosophila* females [63]. Mating also elicits physiological and behavioral changes in honey bee queens, and although the molecular mechanisms underlying such responses are largely unknown, it was verified that they involve differential gene expression into the ovaries. Based on gene ontology annotation, a function in oogenesis and reproduction was attributed to these differentially expressed genes [64]. The high expression of *hex 110* in the ovaries of egg-laying queens suggests a role linked to ovary activity and reproduction.

Ovaries of egg-laying queens have a lower level of *hex 70a* transcripts than ovaries of newly emerged ones. But HEX 70a subunits exist in equivalent amounts in the ovaries of both, newly emerged and egg-laying queens, as confirmed by Western blots using a specific antibody [21]. Therefore, ovarian HEX 70a molecules seem to have a dual origin. It is produced by the fat body of egg-laying queens (see Figure 5) and secreted in hemolymph [21,23], implying that it could be incorporated into the ovaries in addition to being synthesized by them. The function of HEX 70a in the ovaries of virgin and egg-laying queens is to be determined.

Conclusions

Our study revealed dramatic differences in structure, organization and expression of the four hexamerin genes of the honey bee, where these differences might have arisen concurrently with their functional diversification. The amino acid composition, motifs and conserved regions were identified in the deduced protein subunits, which were also used in a phylogenetic analysis to explore their evolutionary relationship with homologue sequences of other insect species. Analyses of the UCR of each hexamerin gene revealed a total of six overrepresented DNA motifs, indicating co-regulation. One of these motifs is a potential binding site for the protein Usp, and suggested gene regulation by JH. This hypothesis was reinforced by manipulating JH-levels in experiments in vivo, which resulted in JH-induction of the expression of hexamerin genes in larval fat body. Apparently under a high dietary protein input as occurring during larval stage, JH induces hexamerins for a high expression.

The detailed expression studies using fat body, ovaries and testes revealed that: (1) the four hexamerin genes are highly transcribed in the larval fat body, and are likely involved in hexamerin synthesis for amino acid storage and use during pupal stage; (2) in young adult workers, the expression of *hex 70a* in the fat body is in accordance with the idea of amino acid storage for a later support of foraging; (3) the expression of hexamerin genes in larval

and pupal gonads suggests a role in ovaries and testes differentiation, and in spermatogenesis; (4) the expression of *hex 110* in the ovaries of egg-laying queens, was associated with ovary activity for egg production; (5) at definite points of the honey bee development, the inverse relationship between the fat body levels of hexamerin transcripts and JH titer suggests that hexamerins regulate JH availability and, consequently, may be involved in the processes of caste-differentiation and worker transition to foraging.

Together, the findings of the present study are significant in that they highlighted the potential participation of hexamerins in important aspects of the life cycle of a social insect, in addition to their primordial role in metamorphosis.

Methods

Honey bees

Africanized honey bees were collected from hives maintained at the apiary of the University of São Paulo in Ribeirão Preto, Brazil. Developing queens (reared by standard apicultural procedures), workers and drones were staged according to Rembold et al [65], Michelette and Soares [66], and Tozetto et al [67], respectively. Adult workers and drones of known ages were obtained by paint marking the newly emerged ones and returning them to their hives to be collected a specified number of days later. Adult virgin queens were used at the third day after emergence, and egg-laying queens of unknown ages were collected from colonies kept in our apiary.

Fat body and gonad samples used in hexamerin expression studies

Transcripts for the four hexamerin genes were assessed in the fat body of workers, queens and drones collected at different ontogenetic stages (larval, pupal and adult). Larvae were collected at the 4th and 5th instars, and individually sampled for total RNA extraction. As at the 4th instar the fat body removed by dissection frequently resulted in small quantities of total RNA, we opted to use the whole larvae as fat body source. To optimize comparisons within larval stage, the same was done for the 5th instar larvae. The abdominal carcass (dorsal integument and subjacent fat body) from pupae, pharate-adults and adults was sufficient to obtain individual RNA amounts, and then it was used as fat body source. Expression was also investigated in the ovaries of queens and workers, and in the testes of drones, during pre-imaginal and adult stages. Ovaries and testes were carefully dissected and exhaustively washed in Ringer saline to eliminate contaminant fat body before being used for RNA extractions. Data from our laboratory concerning *hex 110* [20], *hex 70b* [19] and *hex 70a* [21] gene expression in the worker fat

body, and concerning that of *hex 70a* [21] in female and male gonads, were used for comparisons.

Testing the effect of JH on the expression of hexamerin genes

To test the effect of JH on the expression of hexamerin genes, a commercial JH III (Fluka) was diluted in acetone to make 10 µg per µl, and 1 µl was topically applied on 5th instar worker larvae at the feeding phase (L5F). Control larvae at the same age were topically treated with 1 µl acetone. To obtain age-controlled worker larvae, the queen was caged on a comb and left to lay eggs for 6 h. When age-synchronized larvae reached the L5F stage, the comb was retrieved from the hive and transported to the laboratory for hormone treatment. The hormone (or acetone only) was carefully deposited on each larva in its comb cell using a micropipette. In this occasion, the comb was mapped for further identification of treated and control larvae, and thereafter they were returned to the hive. Treated and control larvae were collected after 24 h for RT-PCR analyses.

Characterization of hexamerin coding sequences (CDSs)

The previously described N-terminal sequences of two of the honey bee hexamerins, HEX 70c (AYYAGRHTAD-MFFLH) and HEX 110 (APNVKQRAADQDLLNKQQD-VIQLLQKISQPIPQELQNLG) [23], were individually aligned against the Official Gene Set database [68,69]. Matching predicted amino acid sequences (GB13613-PA and GB14361-PA) were identified, and the corresponding nucleotide sequences (GB13613-RA and GB14361-RA) were annotated in the Artemis 7.0 platform [22] and used to design primers for experimental determination of the complete *hex 70c* and *hex 110* CDSs (a short *hex 110* cDNA fragment of 180 bp had been previously cloned and sequenced by our research group, [20]). The primers [*hex 70c* (PIR and 3F; 2R and PIF), and *hex 110* (5R and 2F; 2R and 0F)] (see Additional file 13) were combined for PCR amplification from first-strand cDNAs obtained by reverse transcription (see RT-PCR analysis below) of total RNA from 5th instar worker larvae.

Amplicons were purified and subcloned using the TOPO TA-cloning kit (Invitrogen). Insert-containing plasmids were subjected to sequencing reactions using the primers described in Additional file 1 and M13-forward and reverse universal primers. Dideoxy sequencing was performed in an automatic sequencer (ABI Prism 310, Applied Biosystems) using BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Reaction (Applied Biosystems). Sequences were analyzed using Sequencher (version 4.7, Gene Codes Corporation), Artemis software and BLAST algorithms.

For purposes of data comparison, we used the *hex 70b* CDS, and the *hex 70a* CDS plus part of its 5' and 3' UTRs

previously cloned and sequenced by our research group ([19,21]; see Additional file 14 for the accession numbers).

Characterization of potential regulatory sequences in UCRs

A pipeline for motif discovery was designed based on reliable strategies previously proposed by MacIsaac et al [70], and adapted to analyze the honey bee genome [71,72]. This pipeline integrates three motif-detection programs: AlignAce [73], MEME [74] and MDscan [75]. Honey bee intergenic databases were constructed for 1.5, 3 and 6 kb sequence sizes that were trimmed whenever another open reading frame (ORF) was found to be flanking these regions. These databases were exploited for score calculations using group specificity scores (Church scores) [76], ROC-AUC scores [77] and Enrichment scores [78]. Two additional specific score metrics, the MAP score from AlignAce and MDscan and the E-value from MEME, were also used as a first filter for selecting the most significant motifs (MAP > 5 and E-value ≤ 1e-05). The second filter was set up to decrease the amount of spurious hits among the identified DNA motifs (Church ≤ 1e-04, ROC-AUC ≥ 0.7 and P-value for enrichment ≤ 1e-04). The main criterion for identifying known regulatory sites among the six overrepresented motifs was the alignment of the PSSM (Position-Specific Scoring Matrix) for each hexamerin motif with the *D. melanogaster* sites as described in the TRANSFAC database, version 2008.2 [79]. Only the alignments passing a threshold of 80% identity for each PSSM were considered as significant matches. The correlation among hexamerin transcription profiles in developing queens, workers and drones, and the occurrence of DNA motifs in hexamerin gene UCRs were represented as networks based on concepts from graph theory [80] and complex networks [81,82].

Molecular phylogenetic analysis

Hexamerins and hemocyanins were searched for in public databases of protein sequences (Additional file 14) by using HMMER [83] for identifying the hemocyanin C (PF03723.5), N (PF03722.5) and M (PF00372.10) domains as described in the Pfam database [84]. A multiple alignment was performed using Muscle [85] with default parameters (Additional file 15). The phylogenetic tree was reconstructed by bayesian inference (MrBayes v3.1.2) using the Blossum model and gamma distribution of substitution rates. Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo sampling was performed (with one cold and three heated chains) setting the number of generations to 300,000 and trees were sampled every 100th generations. The average standard deviation of split frequency was 0.005 after 300,000 generations. The posterior probabilities were estimated by discarding the first 30% samples.

RT-PCR analysis

The expression of hexamerin genes was evaluated in the fat body and gonads of developing queens, workers and drones by semi-quantitative RT-PCR using specific primers (*hex 110*: 2F and 2R; *hex 70b*: RT-PCR-F and RT-PCR-R; *hex 70c*: JUF and JUR, see Additional file 13) to generate 659, 456 and 171 bp cDNA fragments, respectively. Total RNA was extracted from fat body, ovaries and testes using Trizol reagent (Invitrogen). The RNA concentration of each extracted sample was measured using a GeneQuant spectrophotometer (Pharmacia). Purity was determined by the 260/280 nm ratio considering values between 1.8 and 2. RNA integrity was verified using denaturing agarose gel (1.2%) electrophoresis and ethidium bromide staining. RNA samples were incubated at 37°C in the presence of 3 units of RNase-free DNase (Promega) for 40 min to eliminate contaminant DNA, followed by 15 min at 70°C to inactivate the enzyme. First-strand cDNA was synthesized by reverse transcription using 2.5 µg of total RNA, SuperScript II reverse transcriptase and an oligo dT(12-18) primer (Invitrogen). Negative control reactions without the enzyme were also prepared in parallel. After establishing the adequate number of cycles to avoid saturation, aliquots of cDNAs diluted 1:5 (v/v) in water were subjected to PCR (27 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 58°C and 1 min at 72°C). The amplified products were analyzed by electrophoresis in 1.2% agarose gels containing ethidium bromide. An *A. mellifera actin* gene (GenBank accession number [AB023025](#)), which is constitutively expressed during development [86], was used to control for cDNA loading. The primers used for *actin* gene amplification were ACT - F and ACT - R (Additional file 13), and the thermal cycling program was the same as described above. Primer pairs used in RT-PCR analysis (as well as those specified in Additional file 13) were designed to span at least one intron. Therefore, possible contamination by genomic DNA in RT-PCRs could be easily identified by the detection of a distinct, larger, band following electrophoresis in ethidium bromide-stained agarose gels.

Real-time RT-PCR analysis

In order to quantitatively compare the levels of hexamerin transcripts in queens, workers and drones during the larval-pupal transition and in adults, we used the $\Delta\Delta C_T$ method where the relative amount of transcripts is given by $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Applied Biosystems User bulletin #2; [87]). We previously performed validation experiments to verify the efficiencies of amplification of the targets and the endogenous reference. The *rp 49* gene [GenBank:[AF441189](#)], which is expressed in similar levels during honey bee development [86] was used as the endogenous reference. Amplification of *rp 49* was done with the primers R and F (Additional file 13). Specific

primers were used to amplify hexamerin genes (*hex 70a*: RTR and RTF; *hex 70c*: 2F and 1R; *hex 110*: 3R and 4F; *hex 70b*: RTR and RTF; Additional file 13). Using serial cDNA dilutions, the efficiency (E) of the reactions was calculated ($E = 10^{(-1/\text{slope})}$) for each gene and showed to be approximately equal. Amplifications were conducted in a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) using 20 µL reaction volumes containing 10 µL SYBR Green Master Mix 2× (Applied Biosystems), 1 µL first-strand cDNA (0.25 µg/µL, prepared from total RNA extracted from the fat body as described above for RT-PCR analysis), 7.4 µL water and 1 pmol of each specific primer. Reactions not including the SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen), or cDNA template, were prepared as negative controls. We used an initial cycle of 50°C for 2 min, a denaturation step of 95°C for 10 min, followed by a two-step cycling condition (40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min). Each run was followed by a melting curve analysis to confirm the specificity of amplification and absence of primer dimers. To check reproducibility, each SYBR green assay was done in duplicate and repeated with three independent samples. Baseline and threshold were correctly set to obtain accurate C_T values, which were exported into an MS Excel spreadsheet (Microsoft Inc.) for $2^{-\Delta\Delta C_T}$ calculations.

Pearson's Correlation Coefficient R was used to verify a possible association among the expression profiles of the four honey bee hexamerin genes in queens, workers and drones during the larval-pupal transition. The statistical significance of the R values was evaluated using a t-test, with $R > 0.81$ indicating 95% confidence that the variables are truly correlated.

Additional material

Additional file 1 Complete coding sequence of the *hex110* gene. Exons are separated by asterisks. Primer sequences used for expression studies and gene sequencing are underlined. *hex110* complete coding sequence.

Additional file 2 Complete coding sequence of the *hex70a* gene. Exons are separated by asterisks. Primer sequences used for expression studies and gene sequencing are underlined. Dashed lines indicate 5' and 3' UTR regions. *hex70a* complete coding sequence.

Additional file 3 Complete coding sequence of the *hex70b* gene. Exons are separated by asterisks. Primer sequences used for expression studies and gene sequencing are underlined. *hex70b* complete coding sequence.

Additional file 4 Complete coding sequence of the *hex70c* gene. Exons are separated by asterisks. Primer sequences used for expression studies and gene sequencing are underlined. Dashed lines indicate 5' and 3' UTR regions. *hex70c* complete coding sequence.

Additional file 5 HEX110 deduced amino acid sequence. Signal peptide is indicated by a dotted line, and a dashed line shows Danty's hexamerin motif [23]. Asterisks indicate glycosylation sites. The conserved histidine is double underlined. HEX110 deduced amino acid sequence.

Additional file 6 HEX70a deduced amino acid sequence. Signal peptide is indicated by a dotted line, and a dashed line shows Danty's hexamerin motif [23]. Asterisks indicate glycosylation sites. The conserved histidine is double underlined. LSP signature-1 motif is indicated (+++). LSP signature-2 motif is in bold. Protease cleavage site is underlined. The exopterygote and endopterygote conserved glycine-14 is indicated (#). HEX70a deduced amino acid sequence.

Additional file 7 HEX70b deduced amino acid sequence. Signal peptide is indicated by a dotted line, and a dashed line shows Danty's hexamerin motif [23]. Asterisks indicate glycosylation sites. The conserved histidine is double underlined. LSP signature-1 motif is indicated (+++). LSP signature-2 motif is in bold. Protease cleavage site is underlined. The exopterygote and endopterygote conserved glycine-14 is indicated (#). HEX70b deduced amino acid sequence.

Additional file 8 HEX70c deduced amino acid sequence. Signal peptide is indicated by a dotted line, and a dashed line shows Danty's hexamerin motif [23]. Asterisks indicate glycosylation sites. The conserved histidine is double underlined. LSP signature-1 motif is indicated (+++). LSP signature-2 motif is in bold. The exopterygote and endopterygote conserved glycine-14 is indicated (#). HEX70c deduced amino acid sequence.

Additional file 9 Hydropathy profiles produced for HEX70a, HEX70b, HEX70c and HEX110 sequences using Phobius <http://phobius.sbc.su.se>. Hydropathy profiles of the deduced hexamerin sequences of the honey bee.

Additional file 10 Multiple alignment including HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c and HEX110 using ClustalW 1.83. Multiple alignment of the deduced hexamerin sequences of the honey bee.

Additional file 11 Expression of hexamerin genes in the fat body of developing and adult workers, queens and drones. The abundance of *hex110*, *hex70a*, *hex70b* and *hex70c* transcripts as detected by semi-quantitative RT-PCR followed by electrophoresis of the amplified cDNA on ethidium bromide-stained agarose gel using an *A. mellifera* actin as a loading control. L5F and L5S: feeding and spinning phases of the 5th larval instar. PP: pharate pupae. Pw, Pp, Pdp, Pb, Pbl, Pbm and Pbd: successive phases of the worker and queen pupal stage. P1 to P13: successive phases of the drone pupal stage. NE: newly-emerged adults. Numbers indicate adult age in days. Expression of hexamerin genes in the fat body of developing and adult workers, queens and drones.

Additional file 12 Expression of hexamerin genes in the gonads of developing and adult workers, queens and drones. The abundance of *hex110*, *hex70a*, *hex70b* and *hex70c* transcripts as detected by semi-quantitative RT-PCR followed by electrophoresis of the amplified cDNA on ethidium bromide-stained agarose gel using an *A. mellifera* actin as a housekeeping gene. L5F and L5S: feeding and spinning phases of the 5th larval instar. PP: pharate pupae. Pw, Pp, Pb, Pbl, Pbm and Pbd: successive phases of the worker and queen pupal stage. P1 to P13: successive phases of the drone pupal stage. NE: newly-emerged adults. EL: egg-laying queens. Numbers indicate adult age in days. Expression of hexamerin genes in the gonads of developing and adult workers, queens and drones.

Additional file 13 Specific primers used for sequencing and expression analyses. as title.

Additional file 14 Accession numbers and references concerning to hexamerins and hemocyanins included in molecular phylogeny analysis. as title.

Additional file 15 Multiple alignment used for phylogenetic tree reconstruction. as title.

Abbreviations

cDNA: complementary DNA; RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction; UCR: upstream control region; CDS: coding sequence; UTR: untranslated region; *hex*, hexamerin gene; HEX: hexamerin subunit; JH: juvenile hormone; DNase: deoxyribonuclease; Glx: glutamine/glutamic acid; Usp: ultraspiracle.

Authors' contributions

JRM conducted the bioinformatic analyses, directed laboratory activities, undertook statistical analyses, interpretation of results and assisted with preparation of this manuscript. FMFN assisted with primers design, bioinformatic analyses, and manuscript edits. ASC conducted the bioinformatic and phylogenetic analyses and authored the corresponding Method and Result sections. ZLPS assisted with project design and development. MMGB conducted project design with considerable input into direction of research, interpretation of results and preparation of this manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Luiz Roberto Aguiar for expert assistance in the apiary. Financial support was provided to ZLP Simões (05/03926-5) by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, which also provided a fellowship to JR Martins (08/00541-3).

Author Details

¹Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, ²Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil and ³The Queensland Brain Institute, The University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia

Received: 15 May 2009 Accepted: 26 March 2010

Published: 26 March 2010

References

1. Burmester T, Scheller K: Ligands and receptors: common theme in insect storage protein transport. *Naturwissenschaften* 1999, **86**:468-474.
2. Ismail SM, Gillott C: Identification, characterization, and developmental profile of a high molecular weight, juvenile hormone-binding protein in the hemolymph of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Arch Insect Biochem Physiol* 1995, **29**:415-430.
3. Braun RP, Wyatt GR: Sequence of the hexameric juvenile hormone-binding protein from the hemolymph of *Locusta migratoria*. *J Biol Chem* 1996, **271**:31756-31762.
4. Pan ML, Telfer WH: Methionine-rich hexamerin and arylphorin as precursor reservoirs for reproduction and metamorphosis in female luna moths. *Arch Insect Biochem Physiol* 1996, **33**:149-162.
5. Wheeler DE, Tuchinskaya II, Buck NA, Tabashnik BE: Hexameric storage proteins during metamorphosis and egg production in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera). *J Insect Physiol* 2000, **46**:951-958.
6. Wheeler DE, Buck NA: A role for storage proteins in autogenous reproduction in *Aedes atropalpus*. *J Insect Physiol* 1996, **42**:961-966.
7. Zakharkin SO, Headley VV, Kumar NK, Buck NA, Wheeler DE, Benés H: Female-specific expression of a hexamerin gene in larvae of an autogenous mosquito. *Eur J Biochem* 2001, **268**:5713-5722.
8. Hahn DA, Wheeler DE: Presence of a single abundant storage hexamerin in both larvae and adults of the grasshopper, *Schistocerca americana*. *J Insect Physiol* 2003, **49**:1189-1197.
9. Kanost MR, Kawooya JK, Law JH, Ryan RO, Van Heusden MC, Ziegler R: Insect hemolymph proteins. *Adv Insect Physiol* 1990, **22**:299-396.
10. Telfer WH, Kunkel JG: The function and evolution of insect storage hexamers. *Annu Rev Entomol* 1991, **36**:205-228.
11. Martinez T, Wheeler DE: Identification of two storage hexamers in the ant, *Camponotus festinatus*: accumulation in adult queen-less workers. *Insect Biochem Mol Biol* 1993, **23**:309-317.
12. Martinez T, Wheeler DE: Storage proteins in adult ants (*Camponotus festinatus*): roles in colony founding by queens and in larval rearing by workers. *J Insect Physiol* 1994, **40**:723-729.
13. Johnston ML, Wheeler DE: The role of storage proteins in colony-founding in termites. *Insect Soc* 2007, **54**:383-387.
14. Zhou X, Oi FM, Scharf ME: Social exploitation of hexamerin, RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:4499-4504.
15. Zhou X, Tarver MR, Bennett GW, Oi FM, Scharf ME: Two hexamerin genes from the termite *Reticulitermes flavipes*, sequence, expression, and proposed functions in caste regulation. *Gene* 2006, **376**:47-58.

16. Haydák MH: **The food of the drone larvae.** *Ann Entomol Soc Am* 1957, **50**:73-75.
17. Jay SC: **The development of honeybees in their cells.** *J Apic Res* 1963, **2**:117-134.
18. Winston ML: *The biology of the honeybee* Cambridge: Harvard University Press; 1987.
19. Cunha AD, Nascimento AM, Guidugli KR, Simões ZL, Bitondi MM: **Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera*.** *J Insect Physiol* 2005, **51**:1135-1147.
20. Bitondi MM, Nascimento AM, Cunha AD, Guidugli KR, Nunes FM, Simões ZL: **Characterization and expression of the Hex 110 gene encoding a glutamine-rich hexamerin in the honey bee, *Apis mellifera*.** *Arch Insect Biochem Physiol* 2006, **63**:57-72.
21. Martins JR, Nunes FMF, Simões ZLP, Bitondi MMG: **A honeybee storage protein gene, hex 70a, expressed in developing gonads and nutritionally regulated in adult fat body.** *J Insect Physiol* 2008, **54**:867-877.
22. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B: **Artemis: sequence visualization and annotation.** *Bioinformatics* 2000, **16**:944-945.
23. Danty E, Arnold G, Burmester T, Huet JC, Huet D, Pernollet JC, Masson C: **Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*.** *Insect Biochem Mol Biol* 1998, **28**:387-397.
24. Telfer WH, Keim PS, Law JH: **Arylphorin, a new protein from *Hyalophora cecropia*: comparisons with calliphorin and manducin.** *Insect Biochem* 1983, **13**:601-613.
25. Christianson AMK, King DL, Hatzivassiliou E, Casas JE, Hallenbeck PL, Nikodem VM, Mitsialis SA, Kafatos FC: **DNA binding and heteromerization of the *Drosophila* transcription factor chorion factor 1/ultraspiracle.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89**:11503-11507.
26. Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K: **Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae.** *Gen Comp Endocrinol* 1990, **79**:31-38.
27. Burmester T: **Evolution and function of the insect hexamerins.** *Eur J Entomol* 1999, **96**:213-225.
28. Wheeler DE, Buck NA: **Storage proteins in ants during development and colony founding.** *J Insect Physiol* 1995, **41**:885-894.
29. Hunt JH, Buck NA, Wheeler DE: **Storage proteins in vespid wasps: characterization, developmental pattern, and occurrence in adults.** *J Insect Physiol* 2003, **49**:785-794.
30. Burmester T, Antoniewski C, Lepesant JA: **Ecdysone-regulation of synthesis and processing of fat body protein 1, the larval serum protein receptor of *Drosophila melanogaster*.** *Eur J Biochem* 1999, **262**:49-55.
31. Beintema JJ, Stam WT, Hazes B, Smidt MP: **Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (hexamerins).** *Mol Biol Evol* 1994, **11**:493-503.
32. Yao TP, Segreaves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM: ***Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation.** *Cell* 1992, **71**:63-72.
33. Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM: **Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes.** *Nature* 1993, **366**:476-479.
34. Jones G, Jones D, Teal P, Sapa A, Wozniak M: **The retinoid-X receptor ortholog, ultraspiracle, binds with nanomolar affinity to an endogenous morphogenetic ligand.** *FEBS J* 2006, **273**:4983-4996.
35. Burmester T: **Origin an evolution of arthropod hemocyanins and related proteins.** *J Comp Physiol B* 2002, **172**:95-117.
36. Burmester T, Hankeln T: **The respiratory proteins of insects.** *J Insect Physiol* 2007, **53**:285-294.
37. Burmester T, Massey HC Jr, Zakharkin SO, Benes H: **The Evolution of Hexamerins and the Phylogeny of Insects.** *J Mol Evol* 1998, **47**:93-108.
38. Hagner-Holler S, Pick C, Girgenrath S, Marden JH, Burmester T: **Diversity of stonefly hexamerins and implication for the evolution of insect storage proteins.** *Insect Biochem Mol Biol* 2007, **37**:1064-1074.
39. Theißen G: **Secret life of genes.** *Nature* 2002, **415**:741.
40. Rembold H: **Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*.** *Insect Biochem* 1987, **17**:1003-1006.
41. Wirtz P, Beetsma J: **Induction of caste differentiation in the honeybee (*Apis mellifera* L.) by juvenile hormone.** *Entomol Exp Appl* 1972, **15**:517-520.
42. Rembold H, Czoppelt C, Rao PJ: **Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in the honeybee, *Apis mellifera*.** *J Insect Physiol* 1974, **20**:1193-1203.
43. Zhou X, Tarver MR, Scharf ME: **Hexamerin-based regulation of juvenile hormone-dependent gene expression underlies phenotypic plasticity in a social insect.** *Development* 2007, **134**:601-610.
44. Scharf ME, Buckspan CE, Grzymala TL, Zhou X: **Regulation of polyphonic caste differentiation in the termite *Reticulitermes flavipes* by interaction of intrinsic and extrinsic factors.** *J Exp Biol* 2007, **210**:4390-4398.
45. Tawfik AI, Kellner L, Hoffman KH, Lorenz MW: **Purification, characterization and titre of the haemolymph juvenile hormone binding proteins from *Schistocerca gregaria* and *Gryllus bimaculatus*.** *J Insect Physiol* 2006, **52**:255-268.
46. Zalewska M, Kochman A, Estève JP, Lopez F, Chaoui K, Susini C, Ozyhar A, Kochman M: **Juvenile hormone binding protein traffic - interaction with ATP synthase and lipid transfer proteins.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1788**:1695-1705.
47. Chan QWT, Howes CG, Foster LJ: **Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph.** *Mol Cell Proteomics* 2006, **5**:2252-2262.
48. Currie RW: **The biology and behaviour of drones.** *Bee World* 1987, **68**:129-143.
49. Page RE Jr, Peng CYS: **Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L.** *Exp Gerontol* 2001, **36**:695-711.
50. Capurro ML, Moreira-Ferro CK, Marinotti O, James AA, de Bianchi AG: **Expression patterns of the larval and adult hexamerin genes of *Musca domestica*.** *Insect Mol Biol* 2000, **9**:169-177.
51. Haydák MH: **Honey bee nutrition.** *Annu Rev Entomol* 1970, **14**:143-156.
52. Hrasnigg N, Crailsheim K: **The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*Apis mellifera* L.).** *J Insect Physiol* 1998, **44**:393-404.
53. Bitondi MMG, Simões ZLP: **The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin, and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers.** *J Apic Res* 1996, **35**:27-36.
54. Rutz W, Gerig L, Wille H, Lüscher M: **The function of juvenile hormone in adult worker honeybees, *Apis mellifera*.** *J Insect Physiol* 1976, **22**:1485-1491.
55. Engels W, Kaatz H, Zillikens A, Simões ZLP, Trube A, Braun R, Dittrich F: **Honeybee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility.** In *Advanced Invertebrates Reproduction* Edited by: Hoshi M, Yamashita O. Elsevier, Oxford; 1990.
56. Hartfelder K, Engels W: **Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee.** *Curr Top Dev Biol* 1998, **40**:45-77.
57. Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuck AR, Cruz J, Simões ZLP, Bellés X: **The vitellogenin cDNA of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis and expression studies.** *Insect Biochem Mol Biol* 2003, **33**:459-465.
58. Crailsheim K, Schneider LHW, Hrasnigg N, Buhlmann G, Brosch U, Gmeinbauer R, Schoffmann B: **Pollen consumption and utilization in worker honey bees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function.** *J Insect Physiol* 1992, **38**:409-419.
59. Slansky JR, Scriber JM: **Food consumption and utilization.** In *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology* Edited by: Kerkut GA, Gilbert LI. New York: Oxford Pergamon Press; 1985.
60. Crailsheim K: **Dependence on protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifera carnica* Pollm.).** *J Insect Physiol* 1986, **32**:629-634.
61. Guidugli KR, Nascimento AM, Amdam GV, Barchuck AR, Omholt S, Simões ZLP, Hartfelder K: **Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect.** *FEBS Letters* 2005, **579**:4961-4965.
62. Hoffman DR: **Hymenoptera Venom Allergens.** *Clin Rev Allergy Immunol* 2006, **30**:109-128.
63. McGraw LA, Gibson G, Clark AG, Wolfner MF: **Genes regulated by mating, sperm, or seminal proteins in mated female *Drosophila melanogaster*.** *Curr Biol* 2004, **14**:1509-1514.
64. Kocher SD, Richard FJ, Tarpy DR, Grozinger CM: **Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen.** *BMC Genomics* 2008, **9**:232.

65. Rembold H, Kremer JP, Ulrich GM: **Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honeybee, *Apis mellifera* L.** *Apidologie* 1980, **11**:29-38.
66. Michelette ERF, Soares AEE: **Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honeybee workers (*Apis mellifera* L.).** *Apidologie* 1993, **24**:431-440.
67. Tozetto SO, Bitondi MMG, Dallacqua RP, Simões ZLP: **Protein profiles of testes, seminal vesicles and accessory glands of honeybee pupae and their relation to the ecdysteroid titer.** *Apidologie* 2006, **38**:1-11.
68. Elsik CG, Mackey AJ, Reese JT, Milshina NV, Roos DS, Weinstock GM: **Creating a honey bee consensus gene set.** *Genome Biol* 2007, **8**:R13.
69. The Honey Bee Genome Sequencing Consortium: **Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*.** *Nature* 2006, **443**:919-920.
70. MacIsaac KD, Fraenkel E: **Practical strategies for discovering regulatory DNA sequences motifs.** *PLoS Comput Biol* 2006, **2**:e36.
71. Cristino ADS, Nunes FMF, Lobo CH, Bitondi MMG, Simões ZLP, Costa LDF, Lattorff HMG, Moritz RFA, Evans JD, Hartfelder K: **Caste development and reproduction - a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality.** *Insect Mol Biol* 2006, **15**:703-714.
72. Barchuk AR, Cristino AS, Kucharski R, Costa LF, Simões ZLP, Maleszka R: **Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*.** *BMC Dev Biol* 2007, **7**:70.
73. Roth FP, Hughes JD, Estep PW, Church GM: **Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantification.** *Nature Biotechnol* 1998, **16**:939-945.
74. Bailey TL, Elkan D: **Unsupervised learning of multiple motifs in biopolymers using expectation maximization.** *Mach Learn* 1995, **21**:58-83.
75. Liu XS, Brutlag DL, Liu JS: **An algorithm for finding protein-DNA binding sites with applications to chromatin-immunoprecipitation microarray experiments.** *Nature Biotechnol* 2002, **20**:835-839.
76. Hughes JD, Estep PW, Tavazole S, Church GM: **Computational identification of cis-regulatory elements associated with groups of functionally related genes in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Mol Biol* 2000, **296**:1205-1214.
77. Clarke ND, Granek JA: **Rank order metrics for quantifying the association of sequence features with gene regulation.** *Bioinformatics* 2003, **19**:212-218.
78. Harbison CT, Gordon DB, Lee TI, Rinaldi NJ, MacIsaac KD, Danford TW, Hannett NM, Tagne JB, Reynolds DB, Yoo J, Jennings EG, Zeitlinger J, Pokholok DK, Kellis M, Rolfe PA, Takusagawa KT, Lander ES, Gifford DK, Fraenkel E, Young RA: **Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome.** *Nature* 2004, **431**:99-104.
79. Wingender E, Chen X, Hehl R, Karas H, Liebich I, Matys V, Meinhardt T, Prüb M, Reuter I, Schacherer F: **TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation.** *Nucl Acids Res* 2000, **28**:316-319.
80. Chartrand G, Lesniak L: *Graphs and Digraphs* 3rd edition. Chapman and Hall/CRC; 1996.
81. Newman MEJ: **Structure and function of complex networks.** *SIAM Review* 2003, **45**:167-256.
82. Costa LF, Rodrigues FA, Cristino AS: **Complex networks: The key to systems biology.** *Genet Mol Biol* 2008, **31**:591-601.
83. Eddy SR: **Profile hidden Markov models.** *Bioinformatics* 1998, **14**:755-763.
84. Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeasts C, Eddy SR: **The Pfam protein families database.** *Nucleic Acid Res* 2004, **32**:D138-141.
85. Edgar RC: **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:1792-1797.
86. Lourenço AP, Mackert A, Cristino AS, Simões ZLP: **Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR.** *Apidologie* 2008, **39**:372-385.
87. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.

doi: 10.1186/1471-2199-11-23

Cite this article as: Martins *et al.*, The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones *BMC Molecular Biology* 2010, **11**:23

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



A Honey Bee Hexamerin, HEX 70a, Is Likely to Play an Intranuclear Role in Developing and Mature Ovarioles and Testioles

Juliana R. Martins¹, Lucas Anhezini², Rodrigo P. Dallacqua³, Zilá L. P. Simões³, Márcia M. G. Bitondi^{3*}

1 Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, **2** Departamento de Biologia Molecular e Celular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, **3** Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

Abstract

Insect hexamerins have long been known as storage proteins that are massively synthesized by the larval fat body and secreted into hemolymph. Following the larval-to-pupal molt, hexamerins are sequestered by the fat body via receptor-mediated endocytosis, broken up, and used as amino acid resources for metamorphosis. In the honey bee, the transcript and protein subunit of a hexamerin, HEX 70a, were also detected in ovaries and testes. Aiming to identify the subcellular localization of HEX 70a in the female and male gonads, we used a specific antibody in whole mount preparations of ovaries and testes for analysis by confocal laser-scanning microscopy. Intranuclear HEX 70a foci were evidenced in germ and somatic cells of ovarioles and testioles of pharate-adult workers and drones, suggesting a regulatory or structural role. Following injection of the thymidine analog EdU we observed co-labeling with HEX 70a in ovariole cell nuclei, inferring possible HEX 70a involvement in cell proliferation. Further support to this hypothesis came from an injection of anti-HEX 70a into newly ecdysed queen pupae where it had a negative effect on ovariole thickening. HEX 70a foci were also detected in ovarioles of egg laying queens, particularly in the nuclei of the highly polyploid nurse cells and in proliferating follicle cells. Additional roles for this storage protein are indicated by the detection of nuclear HEX 70a foci in post-meiotic spermatids and spermatozoa. Taken together, these results imply undescribed roles for HEX 70a in the developing gonads of the honey bee and raise the possibility that other hexamerins may also have tissue specific functions.

Citation: Martins JR, Anhezini L, Dallacqua RP, Simões ZLP, Bitondi MMG (2011) A Honey Bee Hexamerin, HEX 70a, Is Likely to Play an Intranuclear Role in Developing and Mature Ovarioles and Testioles. PLoS ONE 6(12): e29006. doi:10.1371/journal.pone.0029006

Editor: Peter K. Dearden, University of Otago, New Zealand

Received: August 22, 2011; **Accepted:** November 18, 2011; **Published:** December 19, 2011

Copyright: © 2011 Martins et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Financial support was provided by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grants 05/03926-5 and 10/16380-9), which also provided a fellowship to JRM (08/00541-3). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mmgbit@usp.br

Introduction

The larvae of holometabolous insects accumulate a large quantity of proteins, carbohydrates and lipids which serve as energy and structural compounds for sustaining metamorphosis up to the adult stage [1]. The most abundant proteins in larval hemolymph are the hexamerins, also known as larval serum proteins, or simply, as storage proteins. Hexamerins are high molecular mass molecules composed, by definition, of six subunits, which can be either homo- or heteromers. Evolutionarily they are derived from hemocyanins, but in contrast to the ancestral molecule, they have lost the capacity of binding copper ions for oxygen transport, and mainly have a role as storage proteins [2].

Hexamerins are massively synthesized by the larval fat body and secreted in hemolymph. Following cessation of larval feeding in preparation to the larval-to-pupal molt, these proteins are sequestered from hemolymph by the fat body cells, via endocytosis mediated by membrane receptors [3], and stored in the cytoplasm in the form of granules [4]. As such, they can be processed and used as amino acid source for development completion. In line with the idea that the sole function of most hexamerins is to act as amino acid reserves when feeding is no longer occurring, as during

the pupal and pharate-adult stages, Roberts and Brock (1981) [5] considered that hexamerins are the essential proteins for metamorphosis, as vitellogenins are to embryogenesis.

The importance of hexamerins as amino acid storage proteins during metamorphosis was initially demonstrated by injecting larvae of the dipteran *Calliphora vicina* with [¹⁴C]-phenylalanine that was metabolically incorporated into hexamerin molecules (then called calliphorins), and following the fate of the radioactive carbon isotope. Using this strategy, Levenbook and Bauer (1984) [6] verified that most of the soluble proteins from practically all tissues of the developing pharate-adults became labeled. In a similar experiment, labeled proteins were recorded not only in adult somatic tissues (integument, thoracic muscle), but also in the egg (chorion, yolk) of *Actias luna*, a moth that produces its eggs during pharate adult development [7]. A correlation between egg production and depletion of the larval reserve of hexamerins was established in adult lepidopterans unable to eat (without mouth parts) or that feed basically on nectar, a poor protein diet [7–10] despite containing amino acids of supplemental nutritional value [11]. There is also circumstantial evidence that amino acids held in hexamerins are used for provisioning eggs of non-lepidopteran species, such as, the mosquito *Aedes atropalpus*, which produces the

first batch of eggs without a feeding [12,13], the cockroach *Blaberus discoidalis* [14], the house fly *Musca domestica* [15], and the grasshopper *Schistocerca americana* [16]. The high level of hexamerins stored by *Camponotus festinatus* queen ants and by certain species of termites was also related to the production of the first batch of brood without access to food during colony founding [17–19]. Together, these results indicate that hexamerin residues are recycled to make other proteins needed for tissues reconstruction during metamorphosis and, in some insect species, for egg production. Thus, after hexamerin breakdown in the fat body, the released amino acid residues are reutilized and incorporated into new proteins, although there is also evidence of incorporation of hexamerins into tissues after partial degradation [20] or even without degradation [4,21].

In general, hexamerins disappear from hemolymph within a few days after adult eclosion. Nevertheless, in some insect species they may persist in hemolymph up to the adult stage [14,22]. There is also evidence of synthesis reinduction and even *de novo* synthesis in adults, although at a lower rate [13,23].

A special class of hexamerins, the arylphorins, has received special attention in view of their high content of aromatic amino acids. In fact, arylphorins have long been presumed to be a source of aromatic amino acids for exoskeleton sclerotization in lepidopterans [7,24–27]. Hexamerins from *Locusta migratoria* [28,29] and *Melanoplus sanguinipes* [30] also play a role as hemolymph juvenile hormone transporters, and the Larval Hemolymph Protein-1 of *Calliphora vicina* has been confirmed as a low affinity carrier protein for ecdysteroids [4]. Recently, Zalewska *et al.* (2009) [31] demonstrated that hexamerins interact with other proteins (juvenile hormone binding protein and apolipoprotein) in a multiprotein complex engaged in sequestration and transport of juvenile hormone, thus inferring the involvement of hexamerins in regulating juvenile hormone levels and action, even when they do not directly bind to the hormone.

Based on the purported ability of binding and controlling juvenile hormone levels, hexamerins have been linked to important facets of social insect life histories. In the termite *Reticulitermes flavipes*, the role of hexamerins has been associated to the regulation of the juvenile hormone-dependent soldier caste phenotype [32–35]. Also in honey bee larval development, the inverse relationship between the levels of hexamerin transcripts in the fat body and the juvenile hormone titer suggests that hexamerins may act as players in the juvenile hormone-dependent differentiation of the bipotent female larva towards a queen or a worker phenotype [36]. In the social wasp *Polistes metricus*, one hexamerin may be involved in caste-specific behaviors and in the regulation of diapause, which is also conditional on a low titer of juvenile hormone [37].

Except for the termite *R. flavipes*, most of the above mentioned considerations on the roles of hexamerins in social insect life histories are based on correlational or other circumstantial evidence, still requiring experimental confirmation and in-depth analysis at the cellular level.

In the highly eusocial honey bee, Ryan *et al.* (1984) [38] were the first to characterize a hexamerin subunit in the range of 75–80 kDa. Later, four hexamerin subunits (including the one previously described by Ryan [38]) were distinguished in honey bee hemolymph samples by SDS-PAGE and N-terminal sequencing [39]. Since three of these subunits presented molecular mass in the 70 kDa range, they were named HEX 70a, HEX 70b, and HEX 70c. The other subunit migrated at a rate consistent with a higher molecular mass and was named HEX 110. Studies undertaken in our laboratory led to the characterization of the full-length cDNAs encoding the four honey bee hexamerin

subunits. These studies enabled the characterization of the structure of these genes and the prospection of overrepresented sequence motifs indicative of mutual co-regulation in the respective upstream control regions. It was also investigated the evolutionary relationship between the honey bee hexamerins and homologous proteins from other insect species. Furthermore, we characterized the expression patterns of the four hexamerin genes in the fat body and gonads of developing and adult workers, queens and drones, as well as the hormonal- and nutritional-dependent expression of these genes [23,36,40,41].

A honey bee arylphorin, HEX 70a, is the focus of the current work. Through RT-PCR (semiquantitative and quantitative) and western blot analyses using a specific antibody we had previously demonstrated that, besides being strongly expressed in the larval fat body, the HEX 70a transcript and protein subunit were also present in the male and female gonads [23]. In the search for a role of this hexamerin in ovaries and testes we designed experiments for its immunofluorescence detection by confocal laser-scanning microscopy. In parallel, a nucleoside analog of thymidine coupled to a dye was used for prospection of dividing cells in developing ovaries. To highlight structural aspects of the gonads at the developmental stages here approached we used rhodamine-phalloidin labeling for F-actin and DAPI-labeling for cell nuclei, in addition to conventional histology.

Results

HEX 70a detection in ovarian cell nuclei in pharate-adult workers

Ovary sections of a pharate-adult worker show the basic structure of an ovariole stained with methylene blue and basic fuchsin (Figure 1A), the actin array visualized through rhodamine/phalloidin staining (Figures 1B, C), and foci of HEX 70a immunodetected with anti-HEX70a/Cy3 (Figures E, F). DAPI was used to highlight ovarian cell nuclei and to make ovariole visualization easier (Figures 1B, C, D, F). At this initial stage of pharate-adult development (~1 day after pupal ecdysis), each ovariole consists of a distal terminal filament (not shown) and a proximal germarium. In the germarium the germline cells, or cystocytes, are beginning to be arranged in rosette-like structures (circle in Figure 1A). Each rosette is a cystocyte clone derived from a single cystoblast (oogonium) and will give rise to a single oocyte and the accompanying trophocytes, or nurse cells. To better visualize the structure of the ovariole at this developmental stage (early pharate-adult) we used rhodamine/phalloidin for detection of F-actin, and DAPI to stain the ovarian cell nuclei. In the upper region of the germarium (upper part of Figure 1B) we could visualize the dense actin complex typical of the polyfusomal region in the center of each cystocyte rosette (arrowheads in Figure 1B). In the lower region of the germarium (lower part of Figure 1B and Figure 1C) the polyfusomes were converted into ring canals (arrows in Figures 1B, C) that allow communication among the germline cells, i.e., among the cell destined to be the oocyte and its associated nurse cells. Ovarioles characterized by such structural arrangements, as detailed in Figures 1A–C, were prepared for HEX 70a detection with anti-HEX 70a/Cy3. Figure 1D shows the upper region of the germarium of an ovariole stained with DAPI. Figure 1E illustrates the same ovariole region where foci of HEX 70a can be seen (merged image is shown in Figure 1F). The insert in Figure 1F represents a control ovariole incubated with pre-immune serum and stained with DAPI and Cy3. Comparison among Figures 1D–F reveals that HEX 70a is localized in the nuclei of the germline cells (cystocytes), in close association with chromatin (arrowheads in Figures 1D–F). Presumptive follicle

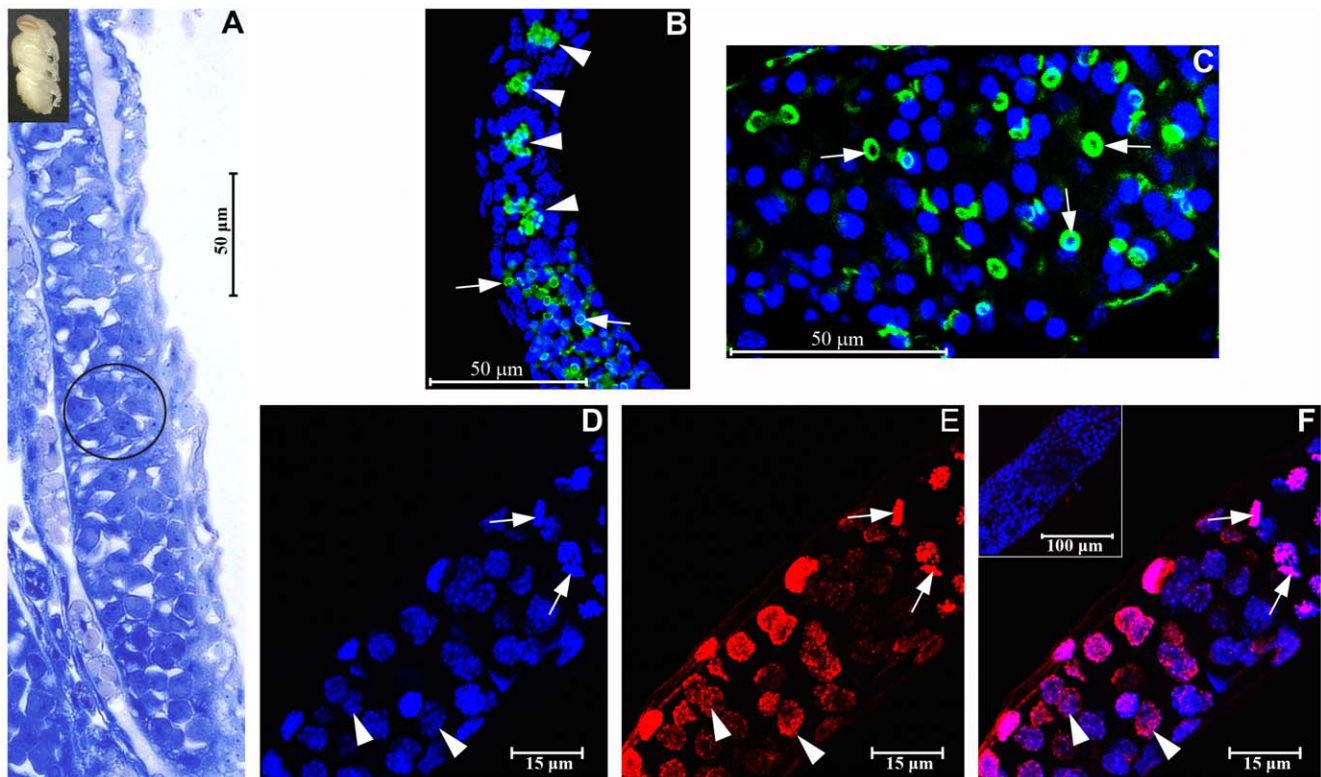


Figure 1. Detection of HEX 70a in ovarioles of workers at the beginning of the pharate-adult development (~1 day after pupal ecdysis) (the developmental stage is illustrated at the upper left corner of the figure). (A) Light microscopy of ovarioles (covered by their respective peritoneal sheath) stained with methylene blue/basic fuchsin. Only the germarium is focused in this figure (the most anterior region of the ovariole, or terminal filament, is not shown). A rosette formed by germline cells (oocyte and nurse cell precursors) is distinguishable (circle) in the germarium. (B, C) Confocal microscopy image of rhodamine/phalloidin labeled F-actin (green) and DAPI-labeled cell nuclei (blue) showing aspects of the structure of the ovarioles (peritoneal sheath removed) at the time they were used for HEX 70a detection. The actin-rich polyfusomes (arrowheads in B) are seen in the center of the cystocyte rosettes in the upper region of the germarium. Ring canals derived from polyfusomes (arrows in B and C) are apparent in the lower region of the germarium shown in B and in higher magnification in C. (D) Confocal microscopy of an ovariole (upper portion of the germarium) stained with DAPI. (E) The same ovariole showing foci of HEX 70a detected with anti-HEX 70a/Cy3 (red). (F) The merged D and E images. The insert in F shows a “control” ovariole (upper portion of the germarium) incubated with the pre-immune serum and subsequently stained with Cy3/DAPI. Arrowheads in D–F show nuclei of germline cells. Arrows in D–F point to nuclei of follicle cell precursors. In all figures, the upper portion of the germarium is oriented upward.
doi:10.1371/journal.pone.0029006.g001

cells (somatic cells) are not clearly evident at this stage, but were tentatively indicated by arrows in Figures 1D–F. Like the germline cell nuclei, the somatic cell nuclei show HEX 70a foci.

Colocalization of EdU and HEX 70a in the ovarian cell nuclei of pharate-adult workers

EdU is a nucleoside analog of thymidine that incorporates into DNA during the S-phase of the cell cycle, thus allowing the detection of DNA replication for cell division when coupled to a dye (Alexa Fluor 594). EdU was injected in early pharate adults (~1 day after pupal ecdysis). The ovaries were dissected after 24 h and prepared for confocal microscopy. Figures 2A–D show confocal images of one of these ovaries. In Figure 2A the DAPI-staining highlighted the cell nuclei in the base of the ovary and in its constituent ovarioles. Only the germarium region is shown in each ovariole. Figure 2B revealed intranuclear HEX 70a/Cy3 foci spread throughout the ovary. By comparing Figures 2A and 2B we identified regions of DAPI-stained nuclei in the ovarioles (germarium) without HEX 70a/Cy3 foci. Therefore, HEX 70a is not present in every ovarian nuclei. Figure 2C revealed EdU incorporation in S-phase nuclei. In a comparative analysis, the Figures 2B, C and the merged image seen in Figure 2D revealed

that the nuclei labeled with EdU/Alexa Fluor also show HEX 70a/Cy3 labels, suggesting that HEX 70a may be somehow involved in the S-phase events leading to cell proliferation in ovarioles. However, HEX 70a has a nuclear localization even in cells outside the S-phase, since the overlap between HEX 70a/Cy3 and EdU/Alexa Fluor labels is not complete: for example, the nuclei showing HEX 70a immunofluorescence at the right margin of the ovary in Figure 2B do not show EdU fluorescence (Figures 2C, D).

Expression of HEX 70a in ovarioles of egg laying queens

HEX 70a foci were also detected in ovarioles dissected from adult queens. Figure 3A shows a schematic representation of an ovariole of an egg-laying queen. The ovariole consists of a narrow distal region, the terminal filament, an intermediate region, or germarium, and a proximal region, the vitellarium. The terminal filament contains typical coin-shaped somatic cells and putative germline stem cells [42]. Cystocyte clusters are observed in the upper region of the germarium, and in the lower region there are growing oocytes associated with the polyploid nurse cells. In the upper region of the vitellarium (Figure 3A), nurse cell and oocyte chambers forming the pre-vitellogenic follicles are visible. The

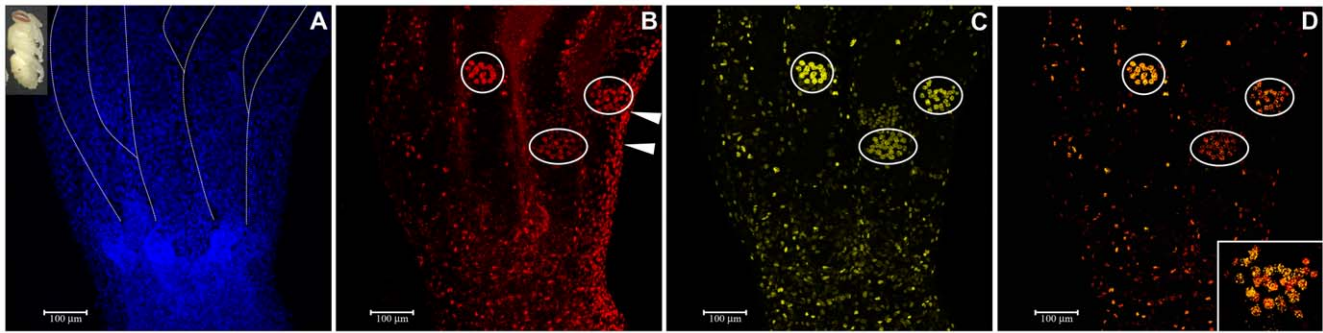


Figure 2. Colocalization of anti-HEX 70a/Cy3 and EdU/Alexa Fluor in the ovary of a pharate-adult worker (~2 days after pupal ecdysis: seen at the upper left corner of the figure). (A) DAPI-stained ovarian cell nuclei (shown in blue). For clarity, the ovarioles are delineated by dashed lines above the basal portion of the ovary. Only the germarium region is seen in each ovariole. (B) HEX 70a foci detected with anti-HEX 70a/Cy3 (red). (C) EdU/Alexa Fluor foci in S-phase ovarian nuclei (yellow). (D) Merged B and C images. Circles in B–D emphasize groups of cystocytes (in the germarium region) showing double labeling (anti-HEX 70a/Cy3 and EdU/Alexa Fluor). The group of cystocytes encircled at the most right position in D is shown in higher magnification in the insert. Cell nuclei on the right margin of the ovary in B (arrowheads) show HEX 70a/Cy3 but not EdU/Alexa Fluor labels.

doi:10.1371/journal.pone.0029006.g002

lower region of vitellarium is the largest region of the ovariole (shown in Figure 3B) and consists of a sequence of growing oocytes involved by a layer of follicle cells (arrowheads) interspersed with nurse cell chambers (arrows). In this region, the oocyte reaches its maximum size, the nurse cells collapse, the chorion is formed and the egg is finally released into the oviduct.

Figures 3C–E shows the lower region of the terminal filament. In this region, HEX 70a is strongly associated with cell nuclei, but foci of HEX 70a in the cytoplasm of filament cells were also noticed (Figure 3D, E, arrows). HEX 70a was also localized in the nuclei of the nurse cells (Figures 3F–H), as well as in the nuclei of the somatic follicle cells (Figures 3I–K), which cover the oocyte. In both cell types, HEX 70a has exclusively an intranuclear localization, but with a very distinct pattern of foci size and distribution. HEX 70a foci are small and scattered all over the nuclei of the polyploid nurse cells and are larger and concentrated in defined nuclear areas in the proliferating follicle cells.

Effect of anti-HEX 70a injection on ovariole width and cuticle sclerotization

To strengthen the hypothesis that HEX 70a is involved in ovariole cell proliferation we injected 24 h-queen pupae with anti-HEX 70a (diluted in 0.9% NaCl) and measured the width of the ovarioles soon after the adult ecdysis, under the expectation that the specific antibody would reduce HEX 70a activity and, thus, result in smaller ovarioles. Figure 4A shows that the antibody injection significantly hampered ovariole growth ($p = 0.002$) in comparison with control queens injected with the vehicle only.

In parallel, 24 h-worker pupae were also injected with anti-HEX 70a and the effect of this antibody on the hemolymph HEX 70a levels was examined. Western blots revealed a reduction of 54% (estimated by densitometric assessment in arbitrary units obtained from HEX 70a bands normalized to the ~200 kDa lipophorin loading control) in the levels of HEX 70a 4 h after injection of the antibody, followed by recovery to normal levels within 72 h (Figure 4B). Given that HEX 70a is an arylphorin, and as such, it may represent a source of aromatic amino acids for cuticle formation, we also checked the progress of pigmentation and sclerotization in anti-HEX 70a-injected workers, comparing them to two control groups, injected with mouse IgG or only with the antibody vehicle. Anti-HEX 70a injection produced a drastic effect on cuticle formation. This effect was more evident in the

cuticle of the hind legs that were not fully pigmented and sclerotized. In anti-HEX 70a-treated bees, the hind leg cuticle is clearer and softer than in the control groups (Figure 4C). Taken together, the data shown in Figure 4 are consistent with the proposed participation of HEX 70a in ovariole cell proliferation, confirmed that the antibody is effective in reducing HEX 70a levels, and furthermore, confirmed that HEX 70a is a genuine arylphorin with a role in cuticle formation (in addition to being a nuclear protein in the gonads).

Expression of HEX 70a in the testes

HEX 70a was also detected in the germ and somatic cells of developing testes. Figure 5A shows a cross section of the upper portion of a testiole dissected from a drone pupa (1 day after pupal ecdysis). In this region we could observe cysts, i.e., groups of germ cells (cystocytes or spermatogonia: arrows in Figure 5A) housed within a somatic cell envelope (somatic cell nuclei pointed by arrowheads in Figure 5A). Confocal microscopy on rhodamine/phalloidin-labeled F-actin (green) and DAPI-labeled cell nuclei (blue) (Figure 5B) highlighted the structure of this region of the testiole. F-actin is an abundant component of the somatic cell cytoplasm, and is also present in the ring canals (asterisks in Figure 5B) that enable mutual communication for the germ cells. Comparison of Figures 5C–E revealed foci of HEX 70a mainly in the nuclei of the germ cells (thick arrows in Figure 5E) and somatic cells (arrowheads in Figure 5E), but also dispersed in the cytoplasm of the germ cells (thin arrows in Figure 5E). The small volume of cytoplasm in the somatic cells impairs the accuracy in identifying possible cytoplasmic HEX 70a foci in the confocal images.

Sections of the lower region of testioles dissected from drones at an intermediate phase of the pharate adult development (~6 days after pupal ecdysis) showed syncytial clusters of elongating spermatids (Figures 6A, C, arrows). Actin cones were seen assembled around the tip of the spermatid nuclei (Figures 6B, D, arrows). Figure 6E shows DAPI-stained nuclei of spermatids in syncytial clusters (arrows) and of somatic cells (arrowheads). In Figure 6F, which is a preparation stained with anti-HEX 70a/Cy3, and in the merged image (Figure 6G) we could verify that HEX 70a was strongly localized to the posterior extremity of the spermatid nuclei (Figures 6F, G inserts), as well as in the nuclei of individualized spermatozoa (arrows in Figures 6F, G) and somatic cells (arrowheads in Figures 6F, G).

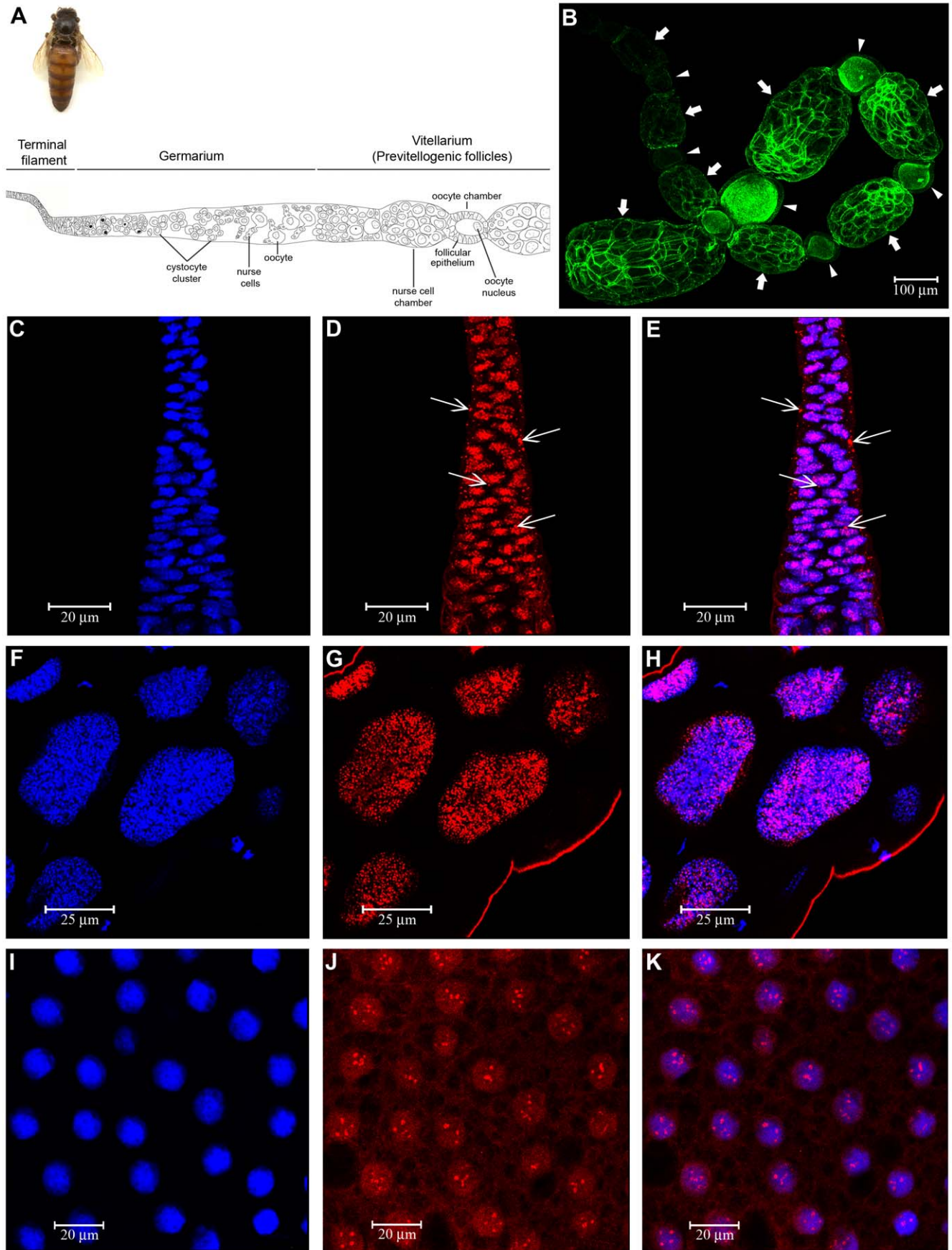


Figure 3. Immunolocalization of HEX 70a in the queen ovariole. (A) Schematic representation of an ovariole of an egg laying queen (seen at the upper left corner): only the terminal filament, the germarium and early follicles initiating previtellogenic growth in the upper region of the vitellarium are shown in A. Confocal microscopy images: (B) Part of an ovariole showing the middle and lower regions of the vitellarium labeled with rhodamin/phalloidin (green) to highlight F-actin. The arrows and arrowheads show developing nurse cell- and oocyte- chambers, respectively. (C–E) the terminal filament (the lower region is oriented downward) shows HEX 70a foci in the nuclei (D, E) and in cytoplasm (arrows in D, E). (F–H) Nurse cell nuclei in the nurse cell chamber (lower region of the vitellarium as indicated by arrows in B). (I–K) Follicle cell nuclei covering an oocyte at the lower region of the vitellarium (as indicated by arrowheads in B). (C, F, I) DAPI-stained cell nuclei (blue); (D, G, J) anti-HEX 70a/Cy3-staining for HEX 70a detection (red) and (E, H, K) merged images.
doi:10.1371/journal.pone.0029006.g003

Discussion

HEX 70a in oogenesis and spermatogenesis of the honey bee

Herein we show that the honey bee HEX 70a is localized in the nuclei of ovarian and testis cells, thus implying in a yet undescribed role for this hexamerin. In its native structure, HEX 70a is an oligomer (data not shown). Similar to other proteins, HEX 70a may be acting in the nucleus in the monomeric form, as recently reported for royalactin, a 57 kDa monomer that functions as a caste determining factor in the honey bee. Royalactin forms the oligomere MRJP1, a member of the Major Royal Jelly Protein family, which is present not only in royal jelly secreted by the worker hypopharyngeal glands, but also in hemolymph and other tissues of the honey bee [43].

HEX 70a fulfills all the criteria established for classification as a storage hexamerin. It has the three canonical hemocyanin domains (N: PF03722.5, M: PF00372.10 and C: PF03723.5 - Pfam database, [44]), which are typical of all hexamerins. It is massively synthesized by the fat body during the larval feeding stage and abundantly stored into larval hemolymph, remains in high quantity in pupal and early pharate-adult hemolymph, and

subsequently becomes less abundant [23,39]. This feature is in conformity with the role in providing amino acids for pupal and pharate adult development, just like the other hexamerins. Furthermore, it contains a high proportion (18.2%) of aromatic amino acids, which makes it a member of a subclass of hexamerins, the arylphorins. HEX 70a is likely used for adult cuticle construction. As demonstrated herein, the inactivation of HEX 70a *in vivo* by injecting anti-HEX 70a into worker pupae visibly hampered the process of adult cuticle formation. Interestingly, the experimental decrease in HEX 70a in hemolymph provoked through antibody-injection was sufficient to affect cuticle formation, despite the presence of another arylphorin, HEX 70b, in hemolymph at this stage [40]. This indicates that HEX 70a, or the amino acids derived from its hydrolysis, have essential participation in cuticle formation.

Previous experimental evidence in our laboratory had already indicated that HEX 70a is a multifunctional protein. By means of semiquantitative and quantitative RT-PCR and Western blot analysis using anti-HEX 70a, we could show that the fat body is not the only site of HEX 70a production, as the transcript and the corresponding protein subunit were also detected in developing gonads of workers, queens and drones, suggesting roles in ovary

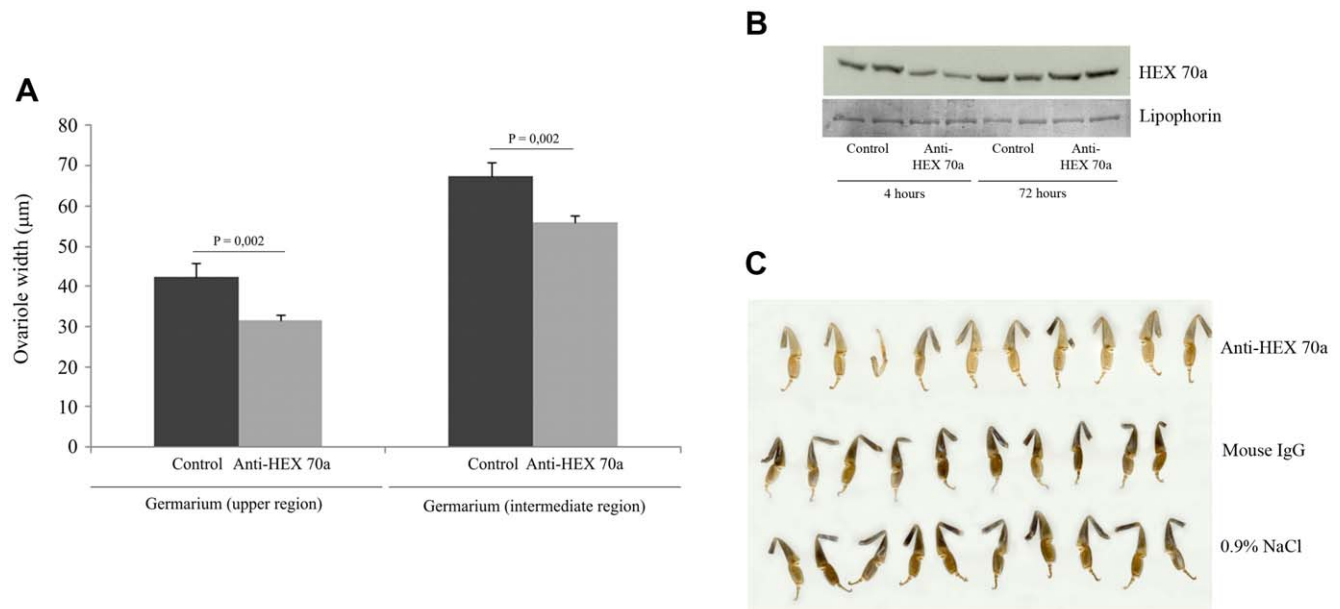


Figure 4. Effect of HEX 70a depletion on queen ovary growth and worker cuticle formation. (A) Width of the ovarioles of queens injected with anti-HEX 70a in 0.9% NaCl or saline vehicle only. Measurements were made in two regions of the germarium of 120 ovarioles, 60 of them dissected from 3 anti-HEX 70a injected queens (20 ovarioles per queen), and 60 from 3 control queens. Measurements obtained from bees injected with the antibody, or the antibody vehicle only, were compared using Two-Way ANOVA and the post-hoc Holm-Sidak multiple comparison test (Jandel SigmaStat 3.1 software, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). (B) Western blot levels of HEX 70a in the hemolymph samples of workers at 4 and 72 h after injection with anti-HEX 70a or saline vehicle only (control). The levels of the ~200 kDa lipophorin in the same samples were used as loading control. (C) Hind legs of workers injected with anti-HEX 70a in 0.9% NaCl, in comparison to workers injected with mouse IgG in 0.9% NaCl, or those of the 0.9% NaCl injected group.
doi:10.1371/journal.pone.0029006.g004

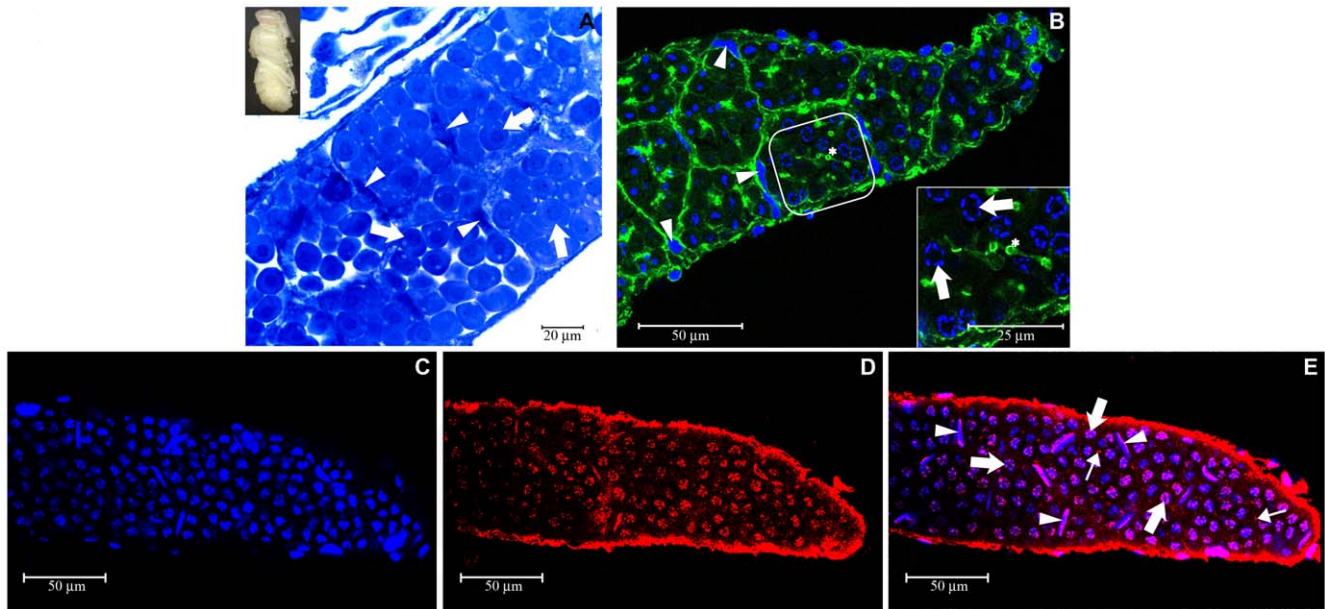


Figure 5. Immunolocalization of HEX 70a in the testioles of drone pupae (1 day after pupal ecdysis; developmental stage shown at the upper left corner). (A) Light microscopy section of a testiole stained with methylene blue/basic fuchsin showing a region containing groups of cystocytes (spermatogonia) (arrows) involved by somatic cells (somatic cell nuclei pointed by arrowheads). (B) Confocal microscopy image showing rhodamine/phalloidin labeled F-actin (green) and DAPI-labeled cell nuclei (blue); somatic cell nuclei are pointed by arrowheads; insert shows a magnified image of a cyst containing cystocytes (cystocyte nuclei pointed by arrows) and ring canals (asterisks). (C–E) Confocal microscopy images of a testiole from a drone taken at the same developmental phase, showing (C) DAPI-stained cell nuclei, (D) foci of HEX 70a detected with anti-HEX 70a/Cy3 (red), and (E) the merged C and D images. In Figure 1E the thick arrows show germ cell nuclei, the thin arrows show HEX 70a foci in the cytoplasm and the arrowheads show somatic cell nuclei.
doi:10.1371/journal.pone.0029006.g005

differentiation and testes maturation. HEX 70a transcripts and protein subunits were also detected in the ovaries of adult queens (but not in the worker bee hypopharyngeal glands) [23].

Following up on this question, the immunodetection of HEX 70a in the gonads now evidenced an association of this protein with nuclei of germline and somatic cells. Such localization was completely unexpected for a storage protein, implying regulatory or structural roles in the nuclei. The nuclear colocalization of HEX 70a with the S-phase marker EdU furthermore indicated that HEX 70a may play a role in DNA replication for cell proliferation or polyploidization. However, there are also ovariole cell nuclei showing HEX 70a immunofluorescence, but not EdU fluorescence (the reverse was not observed). This does not exclude a possible HEX 70a role in cell proliferation, but may indicate that HEX 70a does not have an exclusive role in the S-phase of the cell cycle, or that the stability of the protein within the nuclei is not restricted to the S-phase.

The hypothesis that HEX 70a is involved in cell proliferation received support from experiments where anti-HEX 70a antibody was injected into queen pupae, revealing negative effects on ovariole enlargement, which likely occurs via cell proliferation. Consistent with this hypothesis, HEX 70a was localized in the nuclei of the cystocytes in the ovaries of early pharate-adult workers. Cystocytes are mitotically active, as shown here by EdU labeling, and through BrdU (5-bromo-2'-deoxy-uridine) labeling [42]. Each cystocyte proliferates to form a clone of about 48 or more cells [45,46] which is arranged as a rosette and contains a germline-specific organelle, the polyfusome [47]. Actin was shown to be a prominent fusome marker in the center of the rosettes [48,49]. Only later in development will one cystocyte in each rosette enter meiosis and begin to grow and then become morphologically distinguishable from the nurse cell-destined

cystocytes. As the oocyte differentiates, the rosettes are gradually transformed into initial follicles, with the fusomes being converted into the ring canals that connect the developing oocyte with the nurse cells, and the nurse cells with each other. Each growing oocyte/nurse cell cluster becomes surrounded by somatic follicle cells and will be partitioned into an egg chamber, where oogenesis and vitellogenesis proceed, and a trophic chamber (or nurse cell chamber) [42,46,50]. Whilst this is the common pattern in queens, progressive oogenesis in workers it will only take place if they are released from the repressor effect of queen pheromone [51].

Different from the oocyte, which enter meiosis and remains transcriptionally silent, nurse cells undergo a series of endomitotic cycles [46,52]. This characteristic, typical of the meroistic ovary, is an evolutionary strategy to increase the synthesis of material and organelles at a high rate during oogenesis, and export them to the growing oocyte through the ring canals [53,54]. During oogenesis of the honey bee, the somatic follicle cells become a thick epithelium around the growing oocyte and a flattened cell layer around the joined nurse cells [55]. To account for the intense oocyte growth during oogenesis and vitellogenesis, the follicle cells that surround the oocyte must undergo several rounds of mitotic divisions. Unpublished data from our laboratory (Macedo LMF, personal communication) documented the significant increase in follicle cell number in the growing follicles of the honey bee. Consistent with a role in DNA replication, HEX 70a was localized in the polyploid nuclei of nurse cells and in the proliferating follicle cells covering the growing follicle in queen ovarioles. The pattern of HEX 70a foci in the nucleus, however, is distinct for nurse and follicle cells, perchance reflecting their respective physiological status. HEX 70a was also localized in the terminal filament cells where mitotically active BrdU labeled nuclei, probably stem germline cell nuclei, were demonstrated by Tanaka and Hartfelder

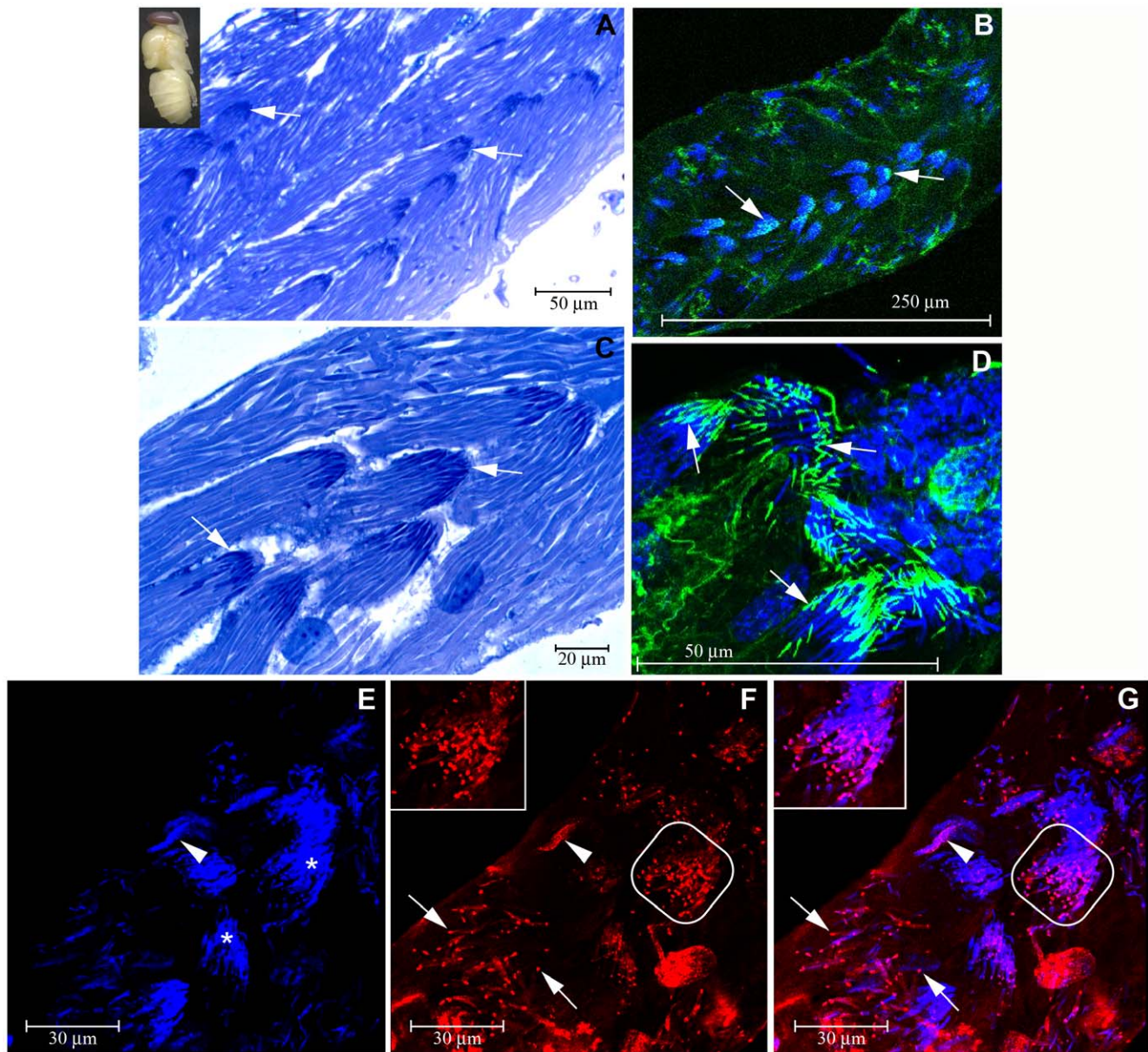


Figure 6. Immunolocalization of HEX 70a in the testioles of pharate-adult drones (~6 days after pupal ecdysis; developmental stage shown at the upper left corner). (A, C) Light microscopy of the testiole stained with methylene blue/basic fuchsin. Syncytial cluster of spermatids are evident (arrows). (B, D) Confocal microscopy images showing rhodamine/phalloidin labeled F-actin (green) and DAPI-labeled cell nuclei (blue). The association of actin with spermatid heads in the syncytial clusters is evidenced in B (arrows) and in the similar and amplified D image (arrows). (E–G) Confocal microscopy showing (E) DAPI-stained nuclei in the syncytial cluster of spermatids (asterisks) and in a cyst somatic cell nuclei (arrowhead); (F) HEX 70a foci detected with anti-HEX 70a/Cy3 (red) at the posterior end of the spermatid nuclei in the syncytial cluster (shown in higher magnification at the upper left side): arrows point to individualized spermatozoa and the arrowhead points to a cyst somatic cell nuclei. (G) The merged E–F images showing the amplified syncytial cluster of spermatids (insert), individualized spermatozoa (arrows) and a cyst somatic cell nuclei (arrowhead).

doi:10.1371/journal.pone.0029006.g006

(2004) [42]. Interestingly, only in this ovariole region we were able to distinguish HEX 70a foci in the cytoplasm in addition to the nuclear focal spots. We were unable to localize HEX 70a in the nuclei of meiotic oocytes.

Intranuclear foci of HEX 70a were also detected in the germ and somatic cells of the male gonad during its early and late development. Unambiguous cytoplasmic foci of HEX 70a were observed only in the earlier stages of testis development and in the terminal filament of the ovarioles. As spermatogenesis and

oogenesis progresses the foci of HEX 70a become exclusively intranuclear.

In newly-ecdysed drone pupae, the clusters of dividing secondary spermatogonia, also termed cystocytes, become enveloped by actin-rich somatic cells and in the interior of these cyst capsules they develop in spermatocytes, which then initiate the meiotic division [52,56]. Within the cyst, the germ cells remain connected by cytoplasmic bridges, the ring canals, similar to what is seen in the ovarioles. Thus, the presence of HEX 70a in the

male cystocyte and somatic nuclei may also be tentatively associated to cell proliferation. However, as discussed below, HEX 70a was in addition detected in the nucleus of the non-proliferating spermatids and individualized spermatozoa.

In the honey bee drone, the entire process of spermatogenesis, from the undifferentiated male germ cell to the formation of the motile sperm occurs during postembryonic development and is essentially concluded before emergence of the drone from the brood cell. The spermatozoa then migrate from the testioles to the seminal vesicles where they are stored for a few days before copulation during the nuptial flight [45]. Spermatogenesis in the honey bee is distinguished by (1) an atypical meiosis (drones are originated from haploid eggs) during which the spermatocytes remain interconnected by cytoplasm bridges, (2) formation and subsequent elimination of supernumerary centrioles in association with the first meiotic division, and (3) unequal division of the secondary spermatocyte [57].

During spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*, a cyst of 64 syncytial spermatids derived from a single germ cell precursor elongates as the axonemes of the sperm tails are formed. These syncytial spermatids become finally separated into individual sperm in a process named individualization, which occurs simultaneously for all 64 spermatids. Actin polymerization is important for individualization, and this process is mediated by cones of actin that assemble around each sperm nucleus. Actin cones acquire triangular shape and move away from the sperm nucleus, causing the formation of the cystic bulge, the residual body which contains cytoplasm and organelles that will be discarded. This process ultimately leads to the transition from syncytial spermatids to individualized spermatozoa [58].

During spermiogenesis of the honey bee, we could detect foci of HEX 70a at the syncytial spermatid nuclei, posteriorly to the assembled actin cones, and also in the nuclei of individualized spermatozoa. The presence of HEX 70a in the nuclei of differentiating spermatids and in the spermatozoa certainly cannot be associated to cell proliferation, but suggests a novel, distinct role for this protein also during the spermiogenesis. This is a completely novel finding concerning a hexamerin function that requires further investigation.

Hexamerins – more than just storage proteins for metamorphosis

Almost 20 years ago it was demonstrated that fat body tissue or fat body extracts (from lepidopteran species) were efficient in stimulating *in vitro* proliferation of larval midgut stem cells of some lepidopterans [59–61]. Curiously, the fat body factor that induced cell proliferation was later identified as being a 77 kDa arylphorin subunit (α -arylphorin) [62]. Purified α -arylphorin stimulated midgut stem cell proliferation at a very low concentration, which excludes a simple nutritional effect. Experiments using BrdU labeling confirmed that arylphorin induces DNA synthesis. The mitogenic-stimulating activity of arylphorin was also observed *in vivo* in insects that showed increased growth rates after being fed on artificial diets containing arylphorin [62–64]. Therefore, experimental approaches very distinct from those utilized herein, have led to the same conclusion, i.e., that arylphorins have a role in cell proliferation.

Our results brought to light entirely unsuspected roles for a storage protein. The presence of HEX 70a in the nuclei of germline and somatic cells in ovaries and testes suggests function in regulation, structural nuclear organization and/or cell proliferation. These gonadal functions of a larval storage protein are novelties that clearly deserve further investigation.

Materials and Methods

Bee sampling

Africanized honey bee workers and drones in different developmental stages (pupal, pharate-adult and adult) were collected from hives maintained at the apiary of the University of São Paulo in Ribeirão Preto, Brazil. Queens were reared according to standard apicultural methods. Some queens were collected soon after pupal ecdysis and some were collected later, after mating and the onset of egg laying activity. Pupae and pharate-adults were staged according to the criteria established by Michelette and Soares (1993) [65] (workers), Tozetto *et al.* (2007) [66] (drones) and Rembold *et al.* 1980 [67] (queens), which are based on the progress of eye coloration, from white to dark-brown, and absence or presence and grade of exoskeleton tanning. Before dissection, adult bees were anesthetized with gaseous nitrogen.

Conventional light microscopy

Gonads were dissected and briefly rinsed in Ringer saline (NaCl 0.17 M, KCl 0.01 M, CaCl₂ 0.003 M) and kept for 24 hours in cold (4°C) fixative (4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3), dehydrated in a graded ethanol series and then embedded in methacrylate resin (Historesin, Leica). Sections of 4 μ m thickness were stained with methylene blue and basic fuchsin and mounted in Entellan (Merck) to be examined and photographed using an Axioskop II photomicroscope (Zeiss).

Confocal microscopy

F-actin and nuclei staining. After dissection in phosphate buffered saline (PBS₁:137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄, pH 7.4), ovaries and testes were cleaned as much as possible of trachea and immersed in a honey bee-specific tissue culture medium [68] for separating individual ovarioles and testioles and removal of the peritoneal sheath. Ovarioles and testioles were then fixed for 30 min in 240 μ L PBS₁, 200 μ L 37% formaldehyde (Merck), 8 μ L Triton X-100 (Sigma) and 2 μ L rhodamine-phalloidin 1:100 v/v (Invitrogen). After being washed twice in 0.2% Triton X-100 in PBS₁ (0.2% TPBS) and 0.1% rhodamine-phalloidin for 20 min each, a third 20 min-wash was done in 0.2% TPBS without rhodamine-phalloidin. Ovaries and testioles were then incubated for 5 min in DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 1:8000 v/v (Sigma) in 0.2% TPBS and then rinsed five times in 0.2% TPBS. Slides were mounted in glycerol 80% (Merck) and examined under a Leica TCS-SP5 confocal microscope (Leica Microsystems).

HEX 70a immunolocalization. A custom-made polyclonal anti-HEX 70a specific antibody (Affinity BioReagents, Golden, CO, USA) was produced from the sequence SYKMHQKPYNKD of the HEX 70a subunit predicted from the fully sequenced cDNA [23]. This antibody was used in whole mount preparations of ovarioles and testioles from bees in different developmental stages. The pre-immune serum was used as negative control.

Ovarioles and testioles were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde in PBS₁, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS₁ (0.1% TPBS) for 15 min (five washes), blocked with 1% BSA for 30 min and incubated in 5% normal goat serum for 30 min. Ovarioles and testioles were incubated with anti-HEX 70a at a concentration of 1:50 in 0.1% TPBS, 1% BSA and 5% normal goat serum for 16 h at 4°C. This was followed by five washes of 20 min in 0.1% TPBS, blocking with 1% BSA for 20 min (two washes) and incubation in 5% normal goat serum for 30 min. A Cy3-conjugated goat anti-rabbit antibody (Sigma, 1:200 dilution) was added to the preparations, which were incubated for 2 h at

room temperature. Ovaries and testioles were then incubated in DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 1:8000 v/v (Sigma) in 0.1% TPBS for 5 min and then rinsed five times in 0.1% TPBS. Slides were mounted in glycerol 80% (Merck) and examined under a Leica TCS-SP5 confocal microscope (Leica Microsystems).

EdU and HEX 70a colocalization. Newly ecdysed worker pupae (Pw phase) collected from hives and kept in an incubator at 34°C and 80% relative humidity for 24 h were injected with 1 µl of a 40 µM 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, Click-iT™ EdU Imaging Kits – Invitrogen) solution in Ringer saline. The injection was administered into the abdominal hemocoel. After 24 h the injected bees were dissected for extraction of the ovaries. The ovaries were fixed in 3.7% formaldehyde in PBS₁ for 30 min and subsequently transferred to the Click-iT™ EdU Imaging Kits reaction mixture (43 µl 10X reaction buffer; 38 µl distilled water; 20 µl copper sulphate; 1.2 µl Alexa Fluor 594; 50 µl reaction buffer additive) where they remained for 30 min. The permeabilization and HEX 70a localization were performed as described above.

Effect of anti-HEX 70a on hemolymph levels of HEX 70a and on cuticle sclerotization

Treatment of workers and queens with anti-HEX 70a. Newly ecdysed queen and worker pupae (Pw phase) were collected from hives and maintained in an incubator at 34°C and 80% relative humidity for 24 h before receiving an injection of 1 µl (1 µg) of the anti-HEX 70a antibody, diluted in 0.9% NaCl, into the abdominal hemocoel. Controls received 1 µl of 0.9% NaCl or 1 µl (1 µg) of mouse IgG (ECL™ Western Blotting Analysis System, Amersham Biosciences) in 0.9% NaCl. The injected queens and workers, and their respective control groups, were maintained in the incubator until the adult ecdysis. Since HEX 70a is an arylphorin, and as such it may be implicated in cuticle formation, the progress of pigmentation and sclerotization was followed daily until adult ecdysis. Following adult ecdysis of the control worker bees, the hemolymph was collected from both worker groups (control and experimental) for Western blot analysis to attest the levels of free HEX 70a. Queens had their ovarioles dissected soon after adult ecdysis and stained with DAPI for measurement of width.

Western blot. The hemolymph samples from the newly ecdysed adult workers injected with anti-HEX 70a or with saline vehicle only were centrifuged at 2000×g for 1 min at 4°C. Total protein was quantified [69] in the supernatants and samples

containing 5 µg of total protein were used for electrophoresis in denaturing conditions [70] carried out at 15 mA and 4°C using 7.5% polyacrylamide gels (100×120×0.9 mm). Following electrophoresis, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes (ImmunBlot™ PVDF Membrane). The membranes were stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB) to check migration of hemolymph proteins and molecular mass markers (205, 116, 97.4, 66, 45 and 29 kDa, Sigma). Non-specific binding sites were blocked by incubating the membranes for 16 h with 10% non-fat dried milk in PBS₂ (50 mM Tris, 80 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.5). HEX 70a subunits were detected by incubating the membranes for 1 h, at room temperature, with anti-HEX 70a antibody diluted 1:5,000 in 10% non-fat dried milk in PBS₂. The membranes were washed thoroughly in 0.05% Tween 20 in PBS₁ (0.05% TwPBS) and subsequently incubated for 1 h in a horseradish peroxidase labeled anti-rabbit IgG secondary antibody (Amersham Biosciences), diluted 1:12,000 in 0.05% TwPBS. After washing in 0.05% TwPBS, the detection was carried out by using the ECL System (ECL™ Western Blotting Analysis System, Amersham Biosciences). The constitutively expressed ~200 kDa hemolymph lipophorin identified in the CBB-stained nitrocellulose membranes was used as a loading control.

Measurements of ovary width. Ovaries from HEX 70a antibody-injected queens and from 0.9% NaCl-injected controls were fixed in 3.7% formaldehyde in PBS₁ during 30 min and incubated in DAPI (1:400 dilution) in 0.1% TPBS for 5 min. After rinsing five times in 0.1% TPBS the ovarioles were mounted in 80% glycerol for analysis in a Leica TCS-SP5 confocal microscope system. Ovariole width was measured by using the software LAS AF Lite 2.4.1 (Leica Microsystems).

Acknowledgments

The authors thank Luiz Roberto Aguiar for expert assistance in the apiary, Dr. Ricardo G. Ramos to facilitate access to confocal microscope, and Dr. Klaus Hartfelder for critically reading a previous version of the manuscript. We also thank two anonymous reviewers for their comments that improved the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JRM MMGB. Performed the experiments: JRM LA RPD. Analyzed the data: JRM MMGB. Contributed reagents/materials/analysis tools: MMGB ZLPS. Wrote the paper: JRM MMGB. Edited the manuscript: JRM MMGB RPD ZLPS.

References

- Telfer WH, Kunkel JG (1991) The function and evolution of insect storage hexamers. *Annu Rev Entomol* 36: 205–228.
- Beintema JJ, Stam WT, Hazes B, Smidt MP (1994) Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (hexamerins). *Mol Biol Evol* 11: 493–503.
- Burmester T, Scheller K (1999) Ligands and receptors: common theme in insect storage protein transport. *Naturwissenschaften* 86: 468–474.
- Levenbook L (1985) Insect storage proteins. In: Kerkut GA, Gilbert LI, eds. *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Vol 9. New York: Oxford Pergamon Press. pp 307–346.
- Roberts DB, Brock HW (1981) The major serum proteins of Dipteran larvae. *Experientia* 37: 103–212.
- Levenbook L, Bauer AC (1984) The fate of the larval storage protein calliphorin during adult development of *Calliphora vicina*. *Insect Biochem* 14: 77–86.
- Pan ML, Telfer WH (1996) Methionine-rich hexamerin and arylphorin as precursor reservoirs for reproduction and metamorphosis in female luna moths. *Arch Insect Biochem Physiol* 33: 149–162.
- Wheeler DE, Tuchinskaya II, Buck NA, Tabashnik BE (2000) Hexameric storage proteins during metamorphosis and egg production in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera). *J Insect Physiol* 46: 951–958.
- Pan ML, Telfer WH (2001) Storage hexamer utilization in two lepidopterans: differences correlated with the timing of egg formation. *J Insect Sci* 1: 1–9.
- Telfer WH, Pan ML (2003) Storage hexamer utilization in *Manduca sexta*. *J Insect Sci* 3: 26.
- Baker HG, Baker I (1973) Amino-acids in nectar and their evolutionary significance. *Nature* 241: 543–545.
- Wheeler DE, Buck NA (1996) A role for storage proteins in autogenous reproduction in *Aedes atropalpus*. *J Insect Physiol* 42: 961–966.
- Zakharkin SO, Headley VV, Kumar NK, Buck NA, Wheeler DE, et al. (2001) Female specific expression of a hexamerin gene in larvae of an autogenous mosquito. *Eur J Biochem* 268: 5713–5722.
- Jamroz RC, Beintema JJ, Stam WT, Bradford JY (1996) Aromatic hexamerin subunit from adult female cockroaches (*Blaberus discoidalis*): molecular cloning, suppression by juvenile hormone, and evolutionary perspectives. *J Insect Physiol* 42: 115–124.
- Capurro M deL, Marinotti O, Farah CS, James AA, Bianchi AG (1997) The nonvitellogenic female protein of *Musca domestica* is an adult-specific hexamerin. *Insect Mol Biol* 6: 97–104.
- Hahn DA, Wheeler DE (2003) Presence of a single abundant storage hexamerin in both larvae and adults of the grasshopper, *Schistocerca americana*. *J Insect Physiol* 49: 1189–1197.
- Martinez T, Wheeler DE (1993) Identification of two storage hexamers in the ant, *Camponotus festinator*: accumulation in adult queen-less workers. *Insect Biochem Mol Biol* 23: 309–317.

18. Martínez T, Wheeler DE (1994) Storage proteins in adult ants (*Camponotus festinus*): roles in colony founding by queens and in larval rearing by workers. *J Insect Physiol* 40: 723–729.
19. Johnston ML, Wheeler DE (2007) The role of storage proteins in colony founding in termites. *Insect Soc* 54: 383–387.
20. Ditzel N, Andersen SO, Højrup P (2003) Cuticular proteins from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Comp Biochem Physiol Part B* 134: 489–497.
21. König M, Agrawal OP, Schenkel H, Scheller K (1986) Incorporation of calliphorin into the cuticle of developing blowfly, *Calliphora vicina*. *Roux's Arch Dev Biol* 195: 296–301.
22. Ancsin JB, Wyatt GR (1990) Purification and characterization of two hemolymph proteins from *Locusta migratoria*. In: Hagedorn HH, Hildebrandt JG, Kidwell MG, Law JH, eds. *Mol Insect Sci* Plenum Press, New York. pp 275–276.
23. Martins JR, Nunes FMF, Simões ZLP, Bitondi MMG (2008) A honeybee storage protein gene, *hex 70a*, expressed in developing gonads and nutritionally regulated in adult fat body. *J Insect Physiol* 54: 867–877.
24. Munn EA, Feinstein A, Greville GD (1967) A major protein constituent of pupal of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *Biochem J* 102: 5–6.
25. Webb B, Riddiford LM (1988) Synthesis of two storage proteins during larval development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol* 130: 671–681.
26. Wu M, Tischler ME (1995) Utilization of [¹⁴C]phenylalanine derived from arylphorin or free amino acid in *Manduca sexta* pharate adults. *Arch Insect Biochem Physiol* 28: 257–272.
27. Pan ML, Telfer WH (1999) Equivalence of riboflavin-binding hexamerin and arylphorin as reserves for adult development in two saturniid moths. *Arch Insect Biochem Physiol* 42: 138–146.
28. Koopmanschap AB, deKort CAD (1988) Isolation and characterization of a high molecular weight JH-III transport protein in the hemolymph of *Locusta migratoria*. *Arch Insect Biochem Physiol* 7: 105–118.
29. Braun RP, Wyatt GR (1996) Sequence of the hexameric juvenile hormone-binding protein from the hemolymph of *Locusta migratoria*. *J Biol Chem* 271: 31756–31762.
30. Ismail SM, Gillott C (1995) Identification, characterization, and developmental profile of a high molecular weight, juvenile hormone binding protein in the hemolymph of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Arch Insect Biochem Physiol* 29: 415–430.
31. Zalewska M, Kochman A, Estève JP, Lopez F, Chaoui K, et al. (2009) Juvenile hormone binding protein traffic – interaction with ATP synthase and lipid transfer proteins. *BBA Biomembranes* 1788: 1695–1705.
32. Zhou X, Oi FM, Scharf ME (2006) Social exploitation of hexamerin, RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4499–4504.
33. Zhou X, Tarver MR, Bennett GW, Oi FM, Scharf ME (2006) Two hexamerin genes from the termite *Reticulitermes flavipes*, sequence, expression, and proposed functions in caste regulation. *Gene* 376: 47–58.
34. Zhou X, Tarver MR, Scharf ME (2007) Hexamerin-based regulation of juvenile hormone dependent gene expression underlies phenotypic plasticity in a social insect. *Development* 134: 601–610.
35. Scharf ME, Buckspan CE, Grzymala TL, Zhou X (2007) Regulation of polyphenic caste differentiation in the termite *Reticulitermes flavipes* by interaction of intrinsic and extrinsic factors. *J Exp Biol* 210: 4390–4398.
36. Martins JR, Nunes FMF, Cristiano AS, Simões ZLP, Bitondi MMG (2010) The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. *BMC Mol Biol* 11: 23.
37. Hunt JH, Kensinger BJ, Kossuth JA, Henshaw MT, Norberg K, et al. (2007) Diapause pathway underlies the gynec phenotype in *Polistes* wasps, revealing an evolutionary route to caste-containing insect societies. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 14020–14025.
38. Ryan RO, Schmidt JO, Law JH (1984) Arylphorin from the hemolymph of the larval honeybee. *Insect Biochem* 14: 515–520.
39. Danty E, Arnold G, Burmester T, Huet JC, Huet D, et al. (1998) Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem Mol Biol* 28: 387–397.
40. Cunha AD, Nascimento AM, Guidugli KR, Simões ZL, Bitondi MM (2005) Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honeybee, *Apis mellifera*. *J Insect Physiol* 51: 1135–1147.
41. Bitondi MM, Nascimento AM, Cunha AD, Guidugli KR, Nunes FM, et al. (2006) Characterization and expression of the *Hex 110* gene encoding a glutamine-rich hexamerin in the honeybee, *Apis mellifera*. *Arch Insect Biochem Physiol* 63: 57–72.
42. Tanaka ED, Hartfelder K (2004) The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. *Arthropod Struct Dev* 33: 431–442.
43. Kamakura M (2011) Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* 473: 478–483.
44. Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, et al. (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acid Res* 32: D138–141.
45. Snodgrass RE (1956) *Anatomy of the Honey Bee*. New York: Comstock Publ Assoc Cornell Univ Press Ithaca.
46. Büning J (1994) *The Insect Ovary*. Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution. London: Chapman & Hall.
47. Lin H, Yue L, Spradling AC (1994) *The Drosophila fusome*, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development* 120: 947–956.
48. Gutzeit HO, Zissler D, Fleig R (1993) Oogenesis in the honeybee *Apis mellifera*: cytological observations on the formation and differentiation of previtellogenic ovarian follicles. *Roux's Arch Dev Biol* 202: 181–191.
49. Schmidt Capella IC, Hartfelder K (2002) Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honey bee ovary. *Cell Tissue Res* 307: 265–272.
50. Wilson MJ, Abbott H, Dearden PK (2011) The evolution of oocyte patterning in insects: multiple cell-signaling pathways are active during honeybee oogenesis and are likely to play a role in axis patterning. *Evol Dev* 13: 127–137.
51. Page RE, Erickson EH (1988) Reproduction by worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Behav Ecol Sociobiol* 23: 117–126.
52. Cruz-Landim C (2009) Aparelho reprodutor feminino e ovogênese. In: Abelas - Morfologia e Função de Sistemas, Chapter 1. São Paulo: Editora Unesp. pp 15–57.
53. Engels W (1968) Extraoocytäre Komponenten des Eiwachstums bei *Apis mellifica*. I. Trophocytäre RNS-Zufuhr. *Insect Soc* 15: 271–288.
54. Spradling AC (1993) Developmental genetics of oogenesis. In: Bate M, Martínez-Arias A, eds. *Drosophila Development*. New York: Cold Spring Harbor Press. pp 1–70.
55. Fleig R, Gutzeit HO, Engels W (1991) Structural organization of ovarian follicle cells in the cotton bug (*Dysdercus intermedius*) and the honey bee (*Apis mellifera*). *Cell Tissue Res* 265: 297–305.
56. Louveaux J (1977) Anatomie de l'abeille: X- L'appareil reproducteur du male. *Bull Tech Apic* 4: 43–48.
57. Hoage TR, Kessel RG (1968) An electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera* L.), with special reference to centriole replication and elimination. *J Ultrastruct Res* 24: 6–32.
58. Noguchi T, Miller KG (2003) A role for actin dynamics in individualization during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Development* 130: 1805–1816.
59. Loeb MJ, Hakim RS (1996) Insect midgut epithelium in vitro: an insect stem cell system. *J Insect Physiol* 42: 1103–1111.
60. Sadrud-Din SY, Hakim RS, Loeb M (1994) Proliferation and differentiation of midgut epithelial cells from *Manduca sexta*, in vitro. *Invert Reprod Dev* 26: 197–204.
61. Sadrud-Din SY, Loeb MJ, Hakim RS (1996) In vitro differentiation of isolated stem cells from the midgut of *Manduca sexta* larvae. *J Exp Biol* 199: 319–325.
62. Blackburn MB, Loeb MJ, Clark E, Jaffe H (2004) Stimulation of midgut stem cell proliferation by *Manduca sexta* α -arylphorin. *Arch Insect Biochem Physiol* 55: 26–32.
63. Hakim RS, Blackburn MB, Corti P, Gelman DB, Goodman C, et al. (2007) Growth and mitogenic effects of arylphorin in vivo and in vitro. *Arch Insect Biochem Physiol* 64: 63–73.
64. Cermenati G, Corti P, Caccia S, Giordana B, Casartelli M (2007) A morphological and functional characterization of *Bombyx mori* larval midgut cells in culture. *Invert Suv J* 4: 119–126.
65. Michelette ERF, Soares AEE (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honeybee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 24: 431–440.
66. Tozetto SO, Bitondi MMG, Dallacqua RP, Simões ZLP (2007) Protein profiles of testes, seminal vesicles and accessory glands of honeybee pupae and their relation to the ecdysteroid titer. *Apidologie* 38: 1–11.
67. Rembold H, Kremer JP, Ulrich GM (1980) Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 11: 29–38.
68. Rachinsky A, Hartfelder K (1998) In vitro biosynthesis of juvenile hormone in larval honey bees: comparison of six media. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34: 646–648.
69. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
70. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–682.

6 *Article*

7 **Nuclear immunolocalization of hexamerins in the fat body of**
8 **metamorphosing honey bees**

9 **Juliana Ramos Martins**¹, **Márcia Maria Gentile Bitondi**^{2,*}

10 ¹ Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,
11 Ribeirão Preto, SP, Brasil; E-Mails: julianarmartins@usp.br

12 ² Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto,
13 Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil; E-Mails: mmgbit@usp.br

14 * Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: mmgbit@usp.br;
15 Tel.: +55-016-3602-3805; Fax: +55-016-3633-0069.

16 *Received: / Accepted: / Published:*

17

18 **Abstract:** Hexamerins are storage proteins with primordial functions in insect
19 metamorphosis. They are actively secreted by the larval fat body and stored in the
20 hemolymph. During metamorphosis they return to the fat body to be processed. For
21 decades, these proteins were thought to exclusively function as an amino acid source for
22 tissue reconstruction during the non-feeding pupal and pharate adult stages and, in some
23 species, for egg production. Recently, new findings have linked the hexamerins to caste
24 polyphenism and gonad development in social insects. To explore the roles of hexamerins
25 during the honey bee metamorphosis, we used specific antibodies in expression analysis by
26 western blot, *in situ* immunolocalization by confocal laser-scanning microscopy, and *in vivo*
27 injections to lower their endogenous levels. Our expression analysis highlighted the
28 changing expression patterns in the fat body and hemolymph during development, which is
29 consistent with the temporal dynamics of hexamerin secretion, storage and depletion.
30 Confocal microscopy showed hexamerin expression in the cytoplasm of both types of fat
31 body cells, trophocytes and oenocytes. Notably, hexamerin foci were also found in the
32 nuclei of these cells, thus confirming our western blot analysis of fat body nuclear-enriched
33 fractions. We also observed that the decrease in soluble hexamerins in antibody-treated
34 pharate adults led to a precocious adult ecdysis, perhaps in response to the lack (or decrease)
35 in hexamerin-derived amino acids. Taken together, these findings indicate that hexamerins
36 have other functions in addition to their well-established role as amino acids sources for
37 development.

38 **Keywords:** hexamerin; HEX 70a; HEX 70b; HEX 70c; HEX 110; fat body;
39 metamorphosis; honeybee; *Apis mellifera*
40

41 1. Introduction

42 The fat body is an abundant tissue in the insect abdomen where it is localized subjacent to the
43 epidermis (parietal fat body) and around the gut (visceral fat body). It is also found in association with
44 the gonads, muscles and regions outside the abdomen [1]. The trophocyte, the basic fat body cell type,
45 the oenocyte, another important cell, and other less common cells in some insect species, such as the
46 urocytes and mycetocytes, have long been identified as the structural components of the fat body [2].
47 The fat body is bathed in the hemolymph, which is important for optimizing the secretion and uptake
48 of molecules in spite of the basal lamina that interfaces between the tissue and the circulating fluid [2].

49 The fat body has a primordial role in the intermediary metabolism. During the larval stage, it is
50 actively engaged in the metabolism of lipids and carbohydrates and in the synthesis and secretion of
51 proteins, which are stored in large quantities in the hemolymph [1; 3]. Hemolymph storage proteins
52 were first identified by Munn et al. [4-6] and Munn and Greville [7] in *Calliphora*. Wyatt and Pan [8]
53 later identified these proteins in the hemolymph of several insects, thus confirming their general
54 occurrence. The storage proteins have also been referred to as larval serum proteins in the literature.
55 Some storage proteins have even been named according to the insect genus where they were identified,
56 for example, calliphorin (from *Calliphora*), manducin (from *Manduca*) and others [9; 10]. The name
57 hexamerins, which has been privileged, refers to their hexameric structure.

58 The diverse amino acid compositions of the hexamerins have been used to classify them. For
59 example, arylphorins are named for their high content of aromatic amino acids; there are also
60 methionine-rich hexamerins and other types [10]. Phylogenetically, the hexamerins belong to the
61 hemocyanin family, although they have lost the ability to bind and transport oxygen [11].

62 The hexamerins are mainly synthesized by the larval fat body and are secreted in the
63 hemolymph. In general, the titer of these proteins in the hemolymph is highest at the end of the larval
64 feeding stage, but the titer then progressively decreases, due to their uptake by the fat body during and
65 after metamorphosis. Munn and Greville [7] originally proposed that the hexamerins are the protein
66 reserves in the fat body during the development of the post-metamorphic non-feeding stages (pupae
67 and pharate adults). In *Calpodes* [12] and in *Hyalophora cecropia* [13], hexamerins form membrane-
68 bound protein storage granules in the fat body cell cytoplasm. Storage proteins were also isolated from
69 the fat body of *Bombyx mori* [14], presumably from protein granules, and the uptake of hemolymph
70 proteins into fat body granules was demonstrated in *Drosophila* [15].

71 Hexamerins may have other functions in addition to being storage proteins. In grasshoppers,
72 they may play a role as hemolymph juvenile hormone transporters [16-18]. It was also demonstrated
73 that hexamerins interact with other proteins in a multiprotein complex engaged in sequestration and
74 transport of juvenile hormone, thus regulating its levels and actions [19], including the action on caste
75 determination in social insects. In the termite *Reticulitermes flavipes*, a hexamerin has been associated
76 to the regulation of the juvenile hormone-dependent soldier caste phenotype [20-23].

77 To our knowledge, Ryan et al. [24] were the first to characterize a hexamerin in the honey bee.
78 They identified a 74 kDa hexamerin subunit in the larval hemolymph using an antiserum against a *M.*
79 *sexta* arylphorin. Years later, Danty et al. [25] analyzed the expression of the 74 kDa hexamerin
80 subunit and the other three hexamerin subunits of the honey bee. The respective N-termini were
81 sequenced, and they were named HEX 70a, HEX 70b, HEX 70c and HEX 110, corresponding to the
82 approximate molecular mass determined by SDS-PAGE migration. Our laboratory further
83 characterized the cDNAs encoding all four hexamerin subunits, their transcriptional profiles in the
84 developing fat body, their regulation by morphogenetic hormones, and their expression dependent on
85 nutritional intake. We also looked for potential regulatory motifs shared by the four hexamerin genes
86 in the 5' upstream control regions, which could indicate that they are co-regulated [26-29]. In addition,
87 we investigated the expression of the honey bee hexamerins outside the fat body. Interestingly,
88 transcripts for HEX 110, HEX 70a and HEX 70b were detected by qRT-PCR in the developing female
89 and male gonads [29]. Furthermore, the presence of HEX 70a was confirmed in the developing ovaries
90 and testes by antibody staining and confocal microscopy. Surprisingly, foci of HEX 70a were found
91 not only in the cytoplasm of the gonadal germ and somatic cells but also in their nuclei [30]. These
92 results indicated that at least in the gonads, the hexamerins have alternative roles. The presence of foci
93 of HEX 70a in the nuclei of gonadal cells prompted us to look for the localization of hexamerins in the
94 fat body cells. We also compared the temporal dynamics of hexamerins expression in the fat body and
95 hemolymph. In hopes of highlighting the importance of hexamerins in honey bee post-metamorphic
96 development, we lowered their levels in pharate adults and examined the survival and the timing of
97 adult ecdysis.

98

99 **2. Experimental section**

100

101 *2.1. Bee sampling*

102

103 Honey bee workers (*Apis mellifera*, Africanized) in different developmental stages (5th instar
104 larvae, pharate pupae, pupae and pharate adults) and adults (newly-emerged, nurses and foragers) were
105 collected from hives maintained at the apiary of the University of São Paulo in Ribeirão Preto, SP,
106 Brazil.

107

108 *2.2. Sample preparation for SDS-PAGE and western blot*

109

110 Hemolymph was collected from the 5th instar larvae in the feeding (L5F) and spinning (L5S)
111 phases, pharate pupae (PP), pupae (white-eyed/unpigmented cuticle, Pw phase), pharate adults at the
112 Pb phase (brown-eyed/unpigmented cuticle) and Pbm phase (brown-eyed/intermediarily pigmented
113 cuticle), newly ecdysed adults (Ne), nurse bees (Nu) and forager bees (Fo). Hemolymph from
114 individual bees in each developmental phase was collected from a small lateral incision at the
115 abdominal tergites, using microcapillary tubes previously washed in phenylthiourea solution in water.
116 The hemolymph was mixed with protease inhibitors cocktail (Protease Inhibitor Cocktail Tablets –
117 Roche Applied Science) at the proportion of 10:1 (v/v), and centrifuged at 2,000 x g for 1 min at 4°C.

118 The supernatants were used for protein separation by SDS-PAGE and hexamerin identification by
119 western blot and reaction with the specific anti-hexamerin antibodies.

120 The fat body was quickly dissected from the same bees from which the hemolymph was
121 collected, placed in microtubes, frozen in liquid nitrogen, powdered with the aid of a small glass
122 pestle, and centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C. The supernatants were used for SDS-PAGE
123 followed by western blot and membrane incubation with each anti-hexamerin antibody.

124 Nuclear fractions from the fat body of 5th instar larvae at the spinning phase (L5S) were
125 obtained by using a procedure based on Kirankumar et al. [31]. After being dissected in PBS₁ (137 mM
126 NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄, pH 7.4), the fat body was rinsed 3 times in
127 PBS₁ and gently centrifuged at 250 x g for 15 min at 4°C in 1.5 mL PBS₁ containing 25 µL protease
128 inhibitors cocktail. The pellet was resuspended in 1 mL HEPES buffer (5mM HEPES pH 8.5
129 containing 0.1 mM CaCl₂ and 10 µL protease inhibitors cocktail), homogenized by passing through a
130 13 x 0.45 mm InjexTM needle for 10 times, and centrifuged at 1000 x g for 5 min at 4°C. Once again,
131 the pellet was resuspended in 150 µL urea/Chaps buffer (8 M urea and 2% Chaps) containing 2,5 µL
132 protease inhibitors cocktail, sonicated (ultrasonic equipment T14, 40 kHz, Thorton Eletronica Ltda,
133 Brazil) (3 cycles of 5 min on ice followed by 5 min under vortex), and centrifuged at 20000 x g for 30
134 min at 4°C. The supernatant served as the source of crude nuclear proteins. Total protein was
135 quantified [32] in the supernatants and samples containing 5 µg of total protein were used for SDS-
136 PAGE and western blot.

137 SDS-PAGE [33] was carried out at 15-20 mA and 4°C using 7.5% polyacrylamide gels
138 measuring 100 x 120 x 0.9 mm. Following electrophoresis, the proteins were transferred to
139 nitrocellulose membranes (ImmunBlotTM PVDF Membrane, Bio-Rad). The membranes were stained
140 with 0.5% Ponceau in 1% acetic acid to check the migration of the sample proteins as well as the
141 migration of the molecular mass markers (205, 116, 97.4, 66, 45 and 29 kDa, Sigma). Non-specific
142 binding sites were blocked by incubating the membranes for 16 h in 10% non-fat dried milk in PBS₂
143 (50 mM Tris, 80 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.5). Hexamerins subunits were detected by incubating
144 the membranes for 1 h, at room temperature, with each hexamerin antibody diluted 1:5000 (HEX 70a)
145 or 1:1000 (HEX 110, HEX 70b and HEX 70c) in 10% non-fat dried milk in PBS₂. The membranes
146 were washed thoroughly in 0.05% Tween 20 in PBS₁ (TwPBS) and subsequently incubated for 1 h in a
147 horseradish peroxidase labeled anti-rabbit IgG secondary antibody (GE Healthcare), diluted 1:12000 in
148 TwPBS. After washing in TwPBS, the detection was carried out by using the ECL System (ECLTM
149 Western Blotting Analysis System, GE Healthcare).

150 151 2.3. Immunolocalization of the hexamerins in the fat body cells

152
153 Custom-made polyclonal hexamerins specific antibodies (Affinity BioReagents, Golden, USA;
154 Rheabiotech, Brazil) were produced from the sequences NLYTKYHGQYP, SYKMHQKPYNKD,
155 TFNLVENLDNYNDKEAVNEF, RNYDMESNMDMYKDKNVVQK of the HEX 110, HEX 70a,
156 HEX 70b and HEX 70c subunits, respectively, predicted from the fully sequenced cDNAs [20;21].
157 These antibodies were used in whole mount preparations of the fat body from worker pharate pupae
158 (PP phase) prepared as follows: the fat body was fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde in PBS₁,
159 permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS₁ for 5 min (three washes), and blocked with 0.6%

160 Triton X-100 in PBS₁ containing 5% BSA for 5 min (five washes). This was followed by incubation in
161 this same solution containing 10% goat serum for 1 h. The fat body was then reincubated with each
162 hexamerin antibody at a concentration of 1:50 in 0.6% Triton X-100 in PBS₁ plus 5% BSA and 10%
163 goat serum for 16 h at 4°C. This was followed by three washes of 5 min and five washes of 20 min in
164 0.6% Triton X-100 in PBS₁ plus 5% BSA and subsequent incubation in Alexa Fluor 488 (1:200,
165 Invitrogen) for 2 h at room temperature. The samples were rinsed again (three washes of 5 min and
166 five washes of 20 min in 0.6% Triton X-100 in PBS₁ containing 5% BSA). To stain the cell nuclei, the
167 fat body was subsequently incubated for 15 min in 1 µg propidium iodide (Invitrogen) diluted in 500
168 µL of 0.6% Triton X-100 in PBS₁. Propidium iodide is an intercalating molecule that binds DNA and
169 RNA. After rinsing five times in 0.6% Triton X-100 in PBS₁, the fat body was transferred to glass
170 slides, mounted on glycerol 80% (Merck) and examined under a Leica TCS-SP5 confocal microscope
171 (Leica Microsystems).

172

173 *2.4. Injection of antibodies against hexamerins*

174

175 Pupae (Pw phase) were collected from hives and maintained in an incubator at 34°C and 80%
176 relative humidity for 24 h before receiving an injection of 1 µL of an antibody (1 µg in 0.9% NaCl)
177 against one of the hexamerins into the abdominal hemocoel. Controls received 1 µL of 0.9% NaCl or 1
178 µL of mouse IgG (1 µg in 0.9% NaCl). The injection was ministered soon after apolysis when the bees
179 have initiated the pharate adult development (Pp phase). The injected pharate adults were maintained
180 in the incubator, at the same conditions mentioned above, up to the adult ecdysis. The hemolymph or
181 fat body was collected 4 h and 24 h after the injection for Western blot analysis to attest the levels of
182 soluble hexamerins. Survival as well as the time elapsed to the adult ecdysis were verified.

183 **3. Results**

184 *3.1. Dynamics of hexamerin expression in the hemolymph and fat body during and after* 185 *metamorphosis*

186

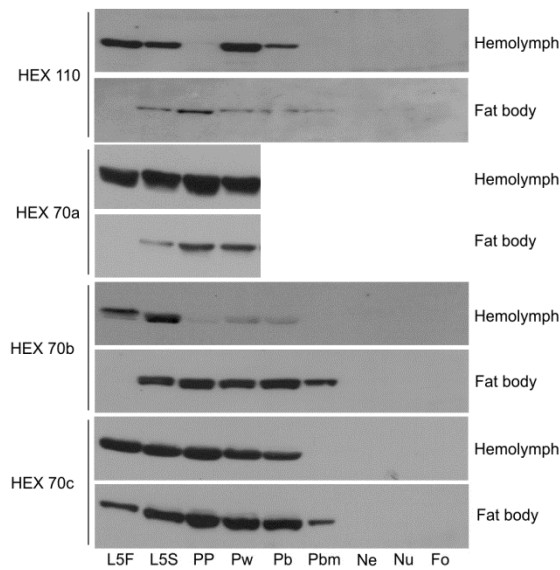
187 We verified the expression of the four hexamerins in the hemolymph and fat body during
188 precise developmental time points by western blotting (Figure 1). In 5th instar feeding larvae (L5F), all
189 hexamerins exist in a larger quantity in the hemolymph than in the fat body, indicating intense
190 secretion to the hemolymph. During the next developmental phase when the 5th instar spinning larvae
191 (L5S) prepare for the metamorphic molt, the abundance of all hexamerins increases in the fat body.
192 Based on what is known about the exchange of hexamerins between the fat body and hemolymph, this
193 increase may denote the resorption of hexamerins into the fat body, via sequestration from the
194 hemolymph. From the L5S time point to the pharate adult phases (Pb, Pbm), the hexamerins still
195 remain relatively abundant in the fat body, although HEX 110 is the least abundant. The abundance of
196 all hexamerins in the fat body decreases to basal levels near the time of adult ecdysis, i.e., at the end of
197 the last pharate adult phase, Pbd (not shown in Figure 1). However, HEX 70a levels increase again in
198 the adults, where this protein persists, even in foragers. The persistence of HEX 70a in the hemolymph
199 of adult workers was first demonstrated by Coomassie Blue stained SDS-PAGE [25]. Since HEX 70a

200 comigrates with the small lipophorin subunit (ApoLp-II) [34], we used the specific antibody to verify
201 and confirm its persistence in adults [28]. This result was reinforced by the detection of HEX 70a
202 transcripts in adult workers, from the emergence up to 30 days of the adult life [28, 29].

203 The depletion rate of HEX 70b, HEX 70c and HEX 110 in the hemolymph is variable; HEX
204 70b is depleted earlier. The depletion of hexamerins is consistent with their function as amino acid
205 sources for pupal and pharate adult development.
206

207

208 **Figure 1.** Western blot analysis of the four hexamerins (HEX 110, HEX 70a, HEX 70b
 209 and HEX 70c) in the hemolymph and fat body of developing *Apis mellifera* workers. L5F
 210 and L5S: feeding and spinning 5th instar larvae. PP: pharate pupae. Pw: pupae. Pb, Pbm:
 211 successive phases of pharate adults. NE: newly ecdysed adults. Nu: nurse bees. Fo: forager
 212 bees. The western blots showing HEX 70a in the fat body and in the hemolymph of pharate
 213 adults (Pb and Pbm phases) and adults (3 days old Nu and 24 days old Fo) were shown
 214 previously (see Fig. 2 in [28]).



215

216

217

3.2. Detection of hexamerins in isolated fat body cell nuclei

218

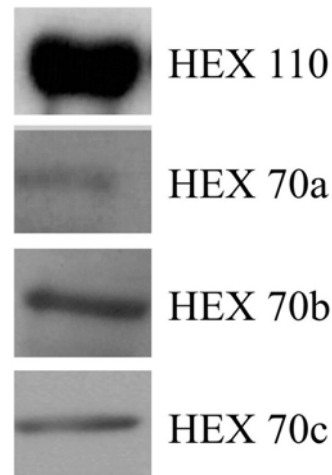
219

220

221

All hexamerins were detected in the nuclear fraction obtained from the fat body, as demonstrated by SDS-PAGE and western blot analysis using specific antibodies (Figure 2).

Figure 2. Hexamerins detected by western blot analysis in isolated fat body nuclei.



3.3. Immunolocalization of hexamerins in the cytoplasm and nucleus of fat body cells

We detected foci of all the honey bee hexamerins in the trophocytes (Figure 3) and oenocytes (Figure 4) in the fat body of pharate pupae (PP) by antibody staining and confocal microscopy. Preparations without the specific (primary) antibodies in Figures 4A-C are the “controls” of the immunolocalization procedures shown in Figures 3 and 4.

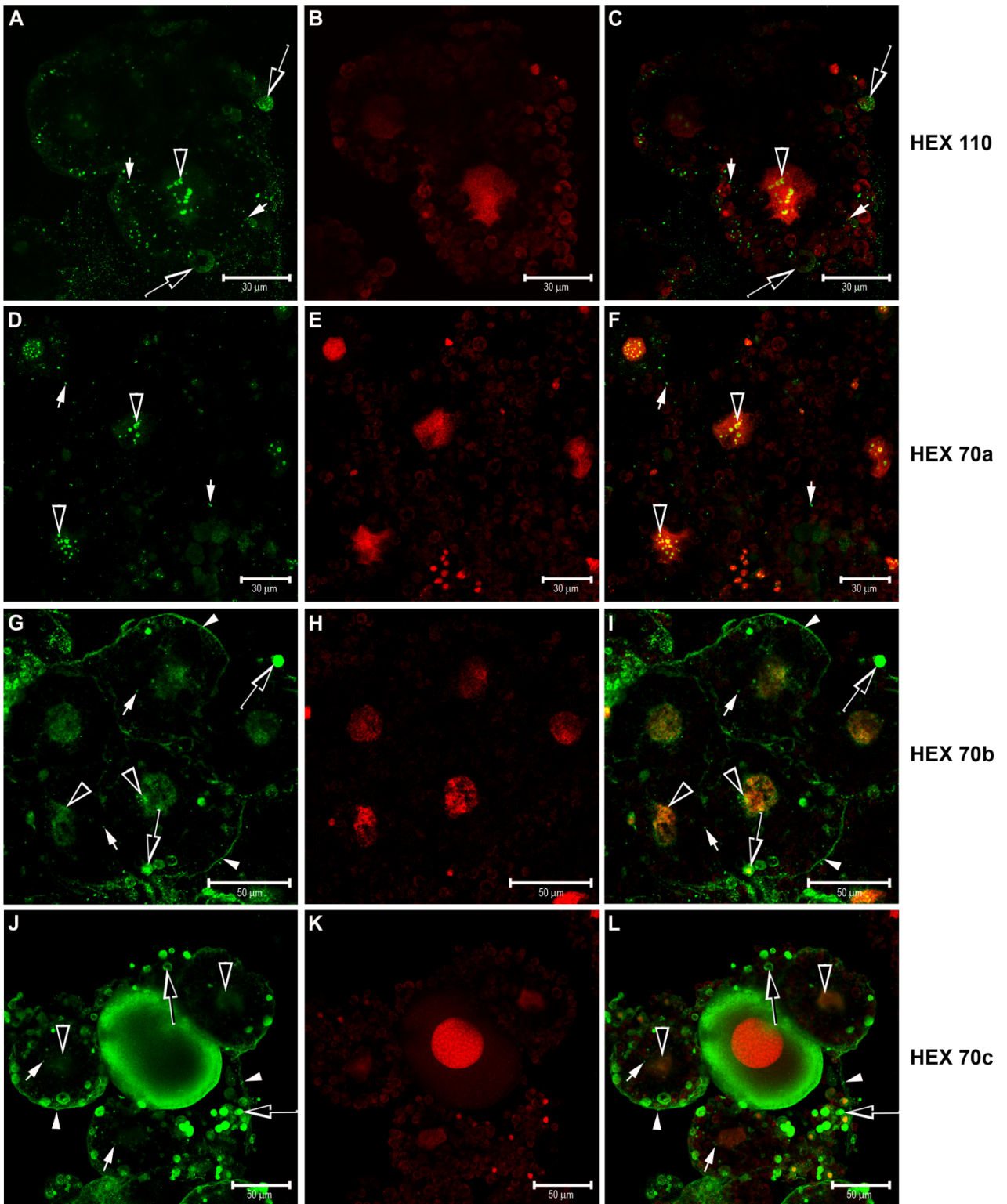
In the trophocytes, foci of HEX 110 (Figure 3A-C), HEX 70a (Figure 3D-F), HEX 70b (Figure 3G-I) and HEX 70c (Figure 3J-L) were evident in the nucleus and in the cytoplasm. The nuclear foci of HEX 110 (Figure 3A, C) and HEX 70a (Figure 3D, F) were more evident than the nuclear foci of HEX 70b (Figure 3G, I) and much more evident than the nuclear foci of HEX 70c (Figure 3J, L). The cytoplasmic foci of all four hexamerins were visualized as dense granules of different sizes or as large cytoplasmic inclusions, similar to the protein granules (heterophagic vacuoles) formed by fusing vesicles containing hemolymph proteins described by a previous study [12]. In the trophocytes shown in Figure 3G, we could see HEX 70b foci regularly localized at the cell surface. Hemolymph proteins have been described to concentrate at the cell surface before endocytosis occurs inside vesicles, which subsequently are separated from the cell membrane to form protein granules [12]. Interestingly, the trophocytes incubated with anti-HEX 70b (Figure 3G) and anti-HEX 70c (Figure 3J) show large granules of different densities near the cell surface, which suggests that they were derived from endocytosis of these hexamerins.

A profusion of red inclusions were revealed in the cytoplasm of the trophocytes stained with propidium iodide (see Figures 3B, E, K and the respective merged images 3C, F, L). Propidium iodide is a dye commonly used to visualize nuclear DNA, but it also binds to RNA. The red inclusions in the trophocyte cytoplasm apparently are autophagic vacuoles containing DNA and ribosomal RNA products remnants of mitochondria and RER recycling. At the time of protein granule formation in the pre-metamorphic fat body of *Calpodex ethlius*, cell organelles are isolated by membranes in

251 autophagic vacuoles. RER-specific autophagic vacuoles may fuse with heterophagic vacuoles
252 containing sequestered hemolymph proteins that form protein/RNA granules [12; 35; 36]. Similar to in
253 *C. ethlius* [35], the red inclusions in the trophocyte cytoplasm (Figure 3B, E, H, K) are also
254 characterized by the presence of an uncolored central region that matches the crystalline material in the
255 center of the granules containing proteins and ribosomal RNA.

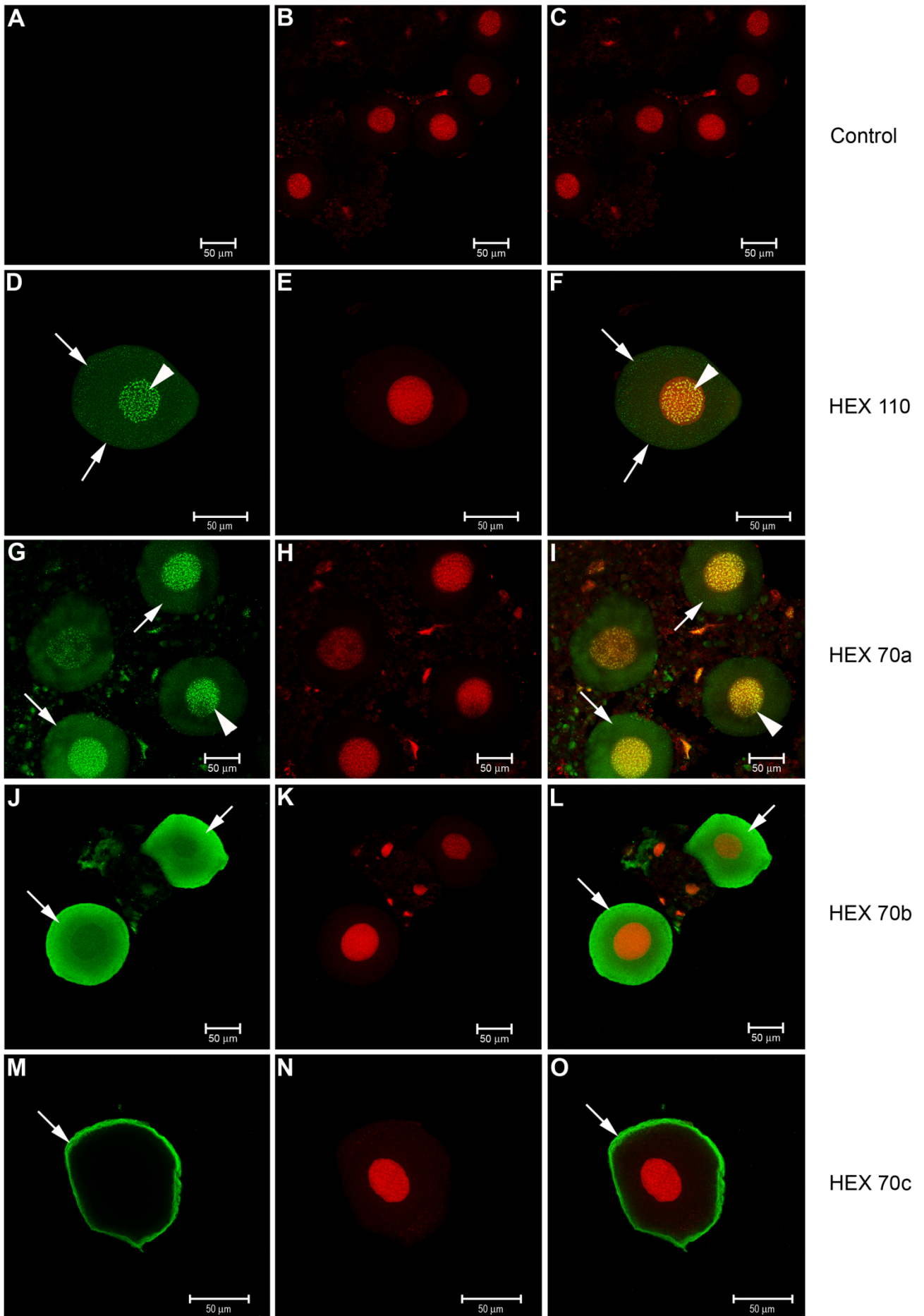
256 Hexamerins were also localized in the oenocytes (Figure 4A-O). The oenocytes prepared
257 without the specific (primary) antibodies in Figures 4A-C are the ‘controls’ of the immunolocalization
258 procedure. The patterns of immunolocalization of HEX 110 (Figure 4D-F) and HEX 70a (Figure 4G-I)
259 are similar, with evident foci of both proteins in the nuclei and smaller scattered foci in the cytoplasm.
260 The other two hexamerins, HEX 70b (Figure 4J-L) and HEX 70c (Figure 4 M-O), were localized
261 exclusively in the oenocyte cytoplasm, and HEX 70c is limited to the peripheral cytoplasm.

262 **Figure 3.** Confocal microscopy for detection of hexamerins in the trophocytes of pharate
263 pupae (PP phase). Alexa Fluor 488-stained trophocytes: preparations with (A) anti-HEX
264 110, (D) anti-HEX 70a, (G) anti-HEX 70b and (J) anti-HEX 70c for detection of the
265 respective hexamerins (green foci). (B, E, H, K) Propidium iodide-stained cell nuclei (red).
266 At the right column the merged images show: (C) HEX 110, (F) HEX 70a, (I) HEX 70b
267 and (L) HEX 70c in the nuclei (yellow foci) and in the cytoplasm (green foci). Large
268 hollowed arrowheads: nuclear foci of hexamerins. Small arrowheads: hexamerins in small
269 granules near the cell surface. Large hollowed arrows: hexamerins in large cytoplasm
270 granules. Small arrows: hexamerins in small cytoplasm granules. The cell in the center of
271 Figures J, K and L is an oenocyte. The profusion of red inclusions in the trophocyte
272 cytoplasm (B, E, K) are propidium iodide stained nucleic acids (DNA/ribosomal RNA),
273 apparently derived from remnants of mitochondria and RER sequestered in autophagic
274 vacuoles.



276

277 **Figure 4.** Confocal microscopy for detection of hexamerins in the fat body oenocytes of
278 pharate pupae (PP phase). Alexa Fluor 488-stained oenocytes: preparations (A) without the
279 specific (primary) antibody (control) or with (D) anti-HEX 110, (G) anti-HEX 70a, (J)
280 anti-HEX 70b or (M) anti-HEX 70c for detection of the respective hexamerins (green
281 foci). (B, E, H, K, N) Propidium iodide-stained cell nuclei (red). At the right column the
282 merged images show: (C) the control without the antibody, (F) HEX 110 and (I) HEX 70a
283 mainly in the nuclei (yellow foci) but also in the cytoplasm (green foci), (L) HEX 70b in
284 the cytoplasm (green foci), (O) HEX 70c at the cytoplasmic periphery (green foci).
285 Arrowheads: nuclear foci of hexamerins. Arrows: hexamerin foci in the cytoplasm.



287

288 3.4. Injection of antibodies against hexamerins in pharate adults: effect on survival and timing to adult
289 ecdysis

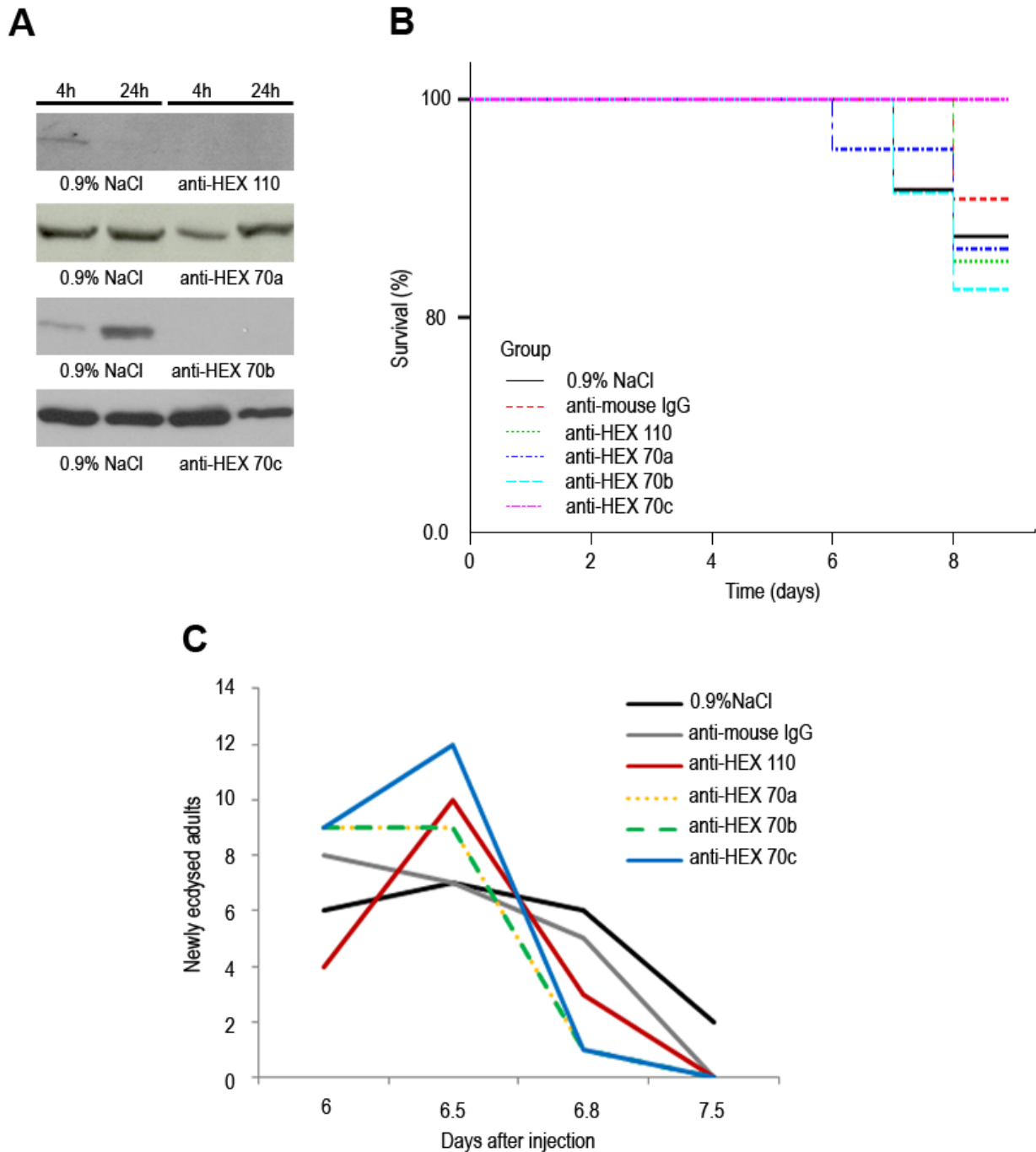
290

291 The injection of each antibody against the hexamerins resulted in decreased levels of these proteins
292 as shown by western blot analysis of the hemolymph or fat body (Figure 5A). At the 24 h post-
293 injection time point, the bees were at the beginning of the Pb pharate adult phase. At this stage, HEX
294 110 decreases in the hemolymph and the levels of HEX 70c will fall somewhat later (before the Pbm
295 phase) (see Figure 1). HEX 70a remains high as previously demonstrated (see Fig. 2 in [28]). We
296 verified that 4 h after the injection of anti-HEX 110 or anti-HEX 70a, the levels of the respective
297 hexamerins decreased in the hemolymph. However, normal levels of HEX 70a were recovered 24 h
298 after the injection. A decrease in the hemolymph levels of HEX 70c was observed 24 h after the
299 injection (Figure 5A). Because the level of HEX 70b is normally very low in the hemolymph during
300 the Pb phase (see Figure 1) and thus impairs the analysis of the effect of anti-HEX 70b, we used the fat
301 body, where the level of this hexamerin is still high (see Figure 1), in the western blot analysis shown
302 in Figure 5A. This figure illustrates that the injection of the antibody caused HEX 70b depletion in the
303 fat body.

304 The injections did not significantly affect survival ($p = 0.524$) up to adult ecdysis (Figure 5B), but
305 the bees injected with the antibodies against hexamerins underwent adult ecdysis significantly earlier
306 than the controls injected with 0.9% NaCl or anti-mouse ($p = 0.019$) (Figure 5C).
307

308

309 **Figure 5.** Effect of the injection of anti-hexamerins in pharate adults. (A) Western blots
310 showing depletion of HEX 110, HEX 70a and HEX 70c in the hemolymph, and depletion
311 of HEX 70b in the fat body of pharate adults, 4 and 24 h after injection with 1 μg of the
312 respective antibodies diluted in 0.9% NaCl. Control groups were injected with 0.9% NaCl
313 or with 1 μg of anti-mouse in 0.9% NaCl. The western blot showing the effect of anti-
314 HEX 70a on HEX 70a depletion was previously shown (see Fig. 4 in [30]). (B) All the bee
315 groups (each containing 22 bees) showed similar survival rates, regardless of anti-
316 hexamerin injection ($p = 0.524$). (C) The injected and control groups significantly differed
317 in the time elapsed to the adult ecdysis ($p = 0.019$). Data were analyzed using Kaplan-
318 Meier survival analysis: Log-Rank followed by multiple comparison procedures (χ^2 test)
319 (R statistical software, version 2.15.0) .



320

321

4. Discussion and Conclusions

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

During the metamorphic molt in holometabolous insects, the fat body changes its typical larval architecture, made of layers or clumps of cells, to dissociated individual cells that lose their adhesion to each other [37]. The fat body cells are mostly free in the hemolymph of the honey bee at the pharate pupae stage [38; 39]. At the following pupal and early pharate adult stages, there is a switch from synthesis and secretion of hexamerins, to their sequestration. Studies establishing the correlation between the depletion of hexamerins from the hemolymph and the appearance of granules in the trophocyte cytoplasm predicted that the sequestered hexamerins are stored in these granules for further utilization [12; 13]. This dynamic swap was apparent when we compared the levels of HEX 70b in the hemolymph and fat body of metamorphosing honey bees. There was a progressive decrease of HEX 70b in the hemolymph of pharate pupae (PP phase), pupae (Pw phase) and early pharate adults (Pb

332 phase) as it increased in the fat body (see Figure 1). HEX 70c also showed a similar dynamic, although
333 not as distinctly. The HEX 110 behavior was somewhat different because we could not see a clear
334 increase of this hexamerin in the fat body. Like the majority of the hexamerins, HEX 70b, HEX 70c
335 and HEX 110 are essentially ‘metamorphosis proteins’, as such, their abundance lowers to basal levels
336 at adult ecdysis. However, as reported previously [25; 28], HEX 70a persists even in adults (see Figure
337 1). Based on the contrasting expression profiles of the fat body and hemolymph, HEX 70b may be
338 considered as the most stereotypical hexamerin in the honey bee.

339 Hexamerin foci were detected in small and large spheroid inclusions, similar to protein
340 granules of different sizes, in the cytoplasm of the trophocytes from pharate pupae. The appearance of
341 protein granules in the fat body of *A. mellifera* shortly before pupation was reported decades ago by
342 Bishop [40; 41]. Using schematic illustrations, Snodgrass [38] referred to the localization of these
343 granules in the periphery of the trophocyte cytoplasm in the honey bee pharate pupae and also
344 commented that the number of these protein granules continues to increase during the early part of the
345 pupal stage and then disappears near the time of adult ecdysis. Poiani and Cruz-Landim [42] also
346 found large amounts of protein granules in the trophocytes from pharate pupae. The spheroid
347 inclusions, or granules, stained with anti-HEX 70c and with anti-HEX 70b in the trophocytes were
348 mainly localized at the cytoplasmic periphery (see Figure 3G, I, J, L), similar to the protein granules
349 described by Snodgrass [38]. Apparently, the observed granules are involved in the storage and
350 recycling of HEX 70b and HEX 70c. Granules stained with anti-HEX 110 and anti-HEX 70a were less
351 abundant in the trophocytes, but this may be due to fat body regionalization. In *D. melanogaster*, the
352 rate of protein granule formation differs among regions of the fat body [43]. Because we used
353 dissociated fat body from pharate pupae whole body, the trophocytes shown in Figure 3 may come
354 from different regions. Small protein granules are initially formed in the trophocytes and grow by
355 fusing with other granules [12]. It is then possible that the fusion of protein granules is just starting in
356 the trophocytes shown in Figures 3A (stained with anti-HEX 110) and 3D (stained with anti-HEX
357 70a).

358 The presence of hexamerins in the cytoplasm of the trophocytes was expected, but we also
359 found small foci of hexamerins in the oenocyte cytoplasm. Oenocytes differ from trophocytes in
360 embryological origin, morphology, and biochemical and physiological functions; they are required for
361 lipid processing, larval growth, the production of pheromone and developmental signaling [37; 44].
362 Because storage proteins were up to now described in the trophocytes, which are the cells that
363 accumulate proteins in granules and cell inclusions, it was surprising to find hexamerins in the
364 oenocytes. Even more remarkable was, however, to detect the four hexamerins in the nuclei of the
365 trophocytes and HEX 110 and HEX 70a in the nuclei of the oenocytes.

366 The immunolocalization of the hexamerins in the fat body cell nuclei confirmed the western
367 blot results (Figure 2), which revealed the presence of the four hexamerins in fat body nuclear-
368 enriched fractions.

369 Previously, our laboratory showed that HEX 70a is localized in the nuclei of ovarian and testis
370 cells, which implied a novel role for this hexamerin in the gonads. The nuclear colocalization of HEX
371 70a with the cell cycle S-phase marker EdU further indicated that HEX 70a may play a role in DNA
372 replication for cell proliferation or polyploidization [30]. This hypothesis is supported by previous
373 experiments demonstrating that a fat body hexamerin (a 77 kDa arylphorin subunit) in lepidopterans

374 was efficient in stimulating the *in vitro* proliferation of larval midgut stem cells. Furthermore,
375 experiments using BrdU labeling confirmed that arylphorin induces DNA synthesis and has mitogenic-
376 stimulating activity *in vivo* [45-50].

377 However, in contrast to the honey bee ovarian cystocytes, which are mitotically active as
378 shown by BrdU (5-bromo-29deoxy-uridine) labeling [51] and also by EdU labeling [30], the
379 trophocytes in the pharate pupae fat body are not engaged in cell division, but rather in cell
380 dissociation for metamorphosis. Therefore, the function of hexamerins in the fat body nucleus of
381 pharate pupae is certainly not related to cell proliferation. Interestingly, a storage protein (SP2) from
382 the hemolymph of *Bombyx mori*, which shows 25-30% similarity with the honey bee hexamerins,
383 suppressed nuclear fragmentation and apoptotic body formation in HeLa cell cultures [52]. This
384 intriguing result may indicate that at the pharate pupae stage, the hexamerins protect the fat body cells
385 from cell death during metamorphosis.

386 This dual function, regulation of cell proliferation and protection against apoptosis, has been
387 demonstrated for a protein kinase, CK2, which has long been linked to cell proliferation, but which
388 also acts as an anti-apoptotic protein in cancer cells [53]. CK2 inactivates proteins involved in
389 promoting apoptosis, and has been associated to cell survival through the regulation of the function of
390 proteins with roles in transcription, cell signaling, cell-cycle control and DNA repair [54, 55]. The
391 same way it was inferred for hexamerins, CK2 translocates from the cell cytoplasm to the nucleus.
392 Putative substrates for CK2 in the nucleus may include growth factors and non-histone proteins,
393 including transcript factors; chromatin as well as the nuclear matrix should be the preferential targets
394 for CK2 association in the nucleus [53].

395 Our previous data [30] strongly suggested a function of hexamerins in gonadal cell
396 proliferation. The current data allow us to suggest a complementary role of nuclear hexamerins in
397 protecting fat body cells from cell death during the metamorphic transition. It is noteworthy that few
398 trophocytes in our histological preparations were labeled with anti-HEX/Alexa fluor, being the
399 encocytes labeled more frequently. Labeled cells may be those that were preserved from apoptosis.

400 Supporting our data indicating the presence of hexamerins in cell nucleus, Begna et al. [56]
401 also detected HEX 110 in the nuclear proteome of worker and queen honey bee larvae in the 4th and
402 5th instars by using nuclear protein enrichment, two-dimensional electrophoresis and mass
403 spectrometry.

404 Here, we have also shown that the injection of each antibody at the working concentration of 1
405 μg in the hemocoel of early pharate adults caused partial or total depletion of hexamerins 4 h and/or
406 24 h post-injection. Depletion of hexamerins did not result in significant mortality in comparison to the
407 control groups. However, the timing of pharate adult development and the ecdysis to the adult stage
408 were significantly accelerated. By cross-reacting with hexamerins and hence inactivating them, the
409 injected antibodies may have disturbed the utilization of these proteins for pharate adult development.
410 Interestingly, a precocious ecdyse was observed independently of the type of the injected anti-
411 hexamerin antibody. In spite of the differences in the effectiveness of the knockdowns, resulting in
412 total or partial depletion of the hexamerins, or even depletion followed by recovery to normal levels,
413 all the anti-hexamerin-treated bees ecdysed earlier than the controls. Though consistent, this result is
414 difficult to explain, and the complexity increases even more when it is considered that in the
415 hemolymph, the subunits may combine to form a heteromeric hexamerin. If so, by cross-reacting with

416 the specific subunit in the heteromer, the antibody indirectly also precipitates non-specific subunits.
417 This would tentatively explain the similar effect of injection of each specific antibody on ecdysis
418 timing. In this context, further studies on the interaction of the subunits and structural organization of
419 hexamerins are relevant.

420 While pupae and pharate adults do not feed, their development is supported by the endogenous
421 stocks of nutrients accumulated during the larval stage. Hexamerins are the main storage proteins in
422 the larval hemolymph and the main source of amino acids for pupal and pharate-adult development.
423 Functioning as nutritional sensors, the natural depletion of hexamerins may play a critical role in
424 signaling the onset of adult ecdysis. It is possible that the decrease in soluble hexamerins in
425 antibody-treated pharate adults induced a precocious adult ecdysis in response to the lack (or decrease)
426 in hexamerin-derived amino acids.

427 It is known that metamorphosis in insects is initiated by an as yet largely unknown size-sensing
428 mechanism [57], where the nutritional status of the larvae has an important role in controlling its final
429 size and the onset of the metamorphic molt. Entry into the metamorphic molt depends on a size
430 threshold, or critical weight, at which endocrine events lead to cessation of feeding and onset of
431 metamorphosis [58; 59]. We hypothesize that a nutrient-sensing signal also functions in pharate adults,
432 thus controlling developmental timing to adult ecdysis, which may be disturbed by the depletion of
433 storage proteins. This hypothesis requires further investigations.

434 Taken together, our results enhance the understanding of the functions of hexamerins. Clearly,
435 the combined use of molecular biology, genetic and biochemical tools are needed to specify the
436 nuclear function of hexamerins in the fat body during insect development.

437 Acknowledgments

438 The authors thank Luiz Roberto Aguiar for expert assistance in the apiary. We also thank
439 Elizabete Rosa Milani by the access to the confocal microscope (FAPESP grants 04/08868-0).
440 Financial support was provided by a grant of the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São
441 Paulo to M.M.G.B. (Process no. 2010/16380-9) that also provided a fellowship to J.R.M. (Process no.
442 2008/00541-3).

443 References and Notes

- 444 1. Keeley, L.L. Physiology and biochemistry of the fat body. In: *Comprehensive insect physiology,*
445 *biochemistry and pharmacology*; Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., Eds.; Pergamon Press: Oxford, **1985**;
446 3, pp. 211-248.
- 447
- 448 2. Dean, R.L.; Locke, M.; Collins, J.V. Structure of the fat body. In: *Comprehensive insect physiology,*
449 *biochemistry and pharmacology*; Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., Eds.; Pergamon Press: Oxford, **1985**;
450 3, pp. 155-210.
- 451
- 452 3. Arrese, E.L.; Soulages, J.L. Insect Fat body: energy, metabolism and regulation. *Annu. Rev.*
453 *Entomol.* **2010**, *55*, 207–225.
- 454
- 455 4. Munn, E.A.; Feinstein, A.; Greville, G.D. A major protein constituent of pupae of the blowfly
456 *Calliphora erythrocephala* (Diptera). *Biochem. J.* **1967**, *102*, 5-6.
- 457

- 458 5. Munn, E.A.; Price, G.M.; Greville G.D. The synthesis *in vitro* of the protein calliphorin by fat body
459 from the larva of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*. *J. Insect Physiol.* **1969**, *15*, 1601-1605.
460
- 461 6. Munn, E.A.; Feinstein, A.; Greville, G.D. The isolation and properties of the protein calliphorin.
462 *Biochem. J.* **1971**, *124*, 367-374.
463
- 464 7. Munn, E.; Greville, G. The soluble proteins of developing *Calliphora erythrocephala*, particularly
465 calliphorin, and similar proteins in other insects. *J. Insect Physiol.* **1969**, *15*, 1935-1950.
466
- 467 8. Wyatt, G.; Pan, M. Insect plasma proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 779-817.
468
- 469 9. Levenbook, L. Insect storage proteins. In: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and*
470 *pharmacology*; Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., Eds.; Pergamon Press: Oxford, **1985**; *9*, pp. 307-346.
471
- 472 10. Kanost, M.R.; Kawooya, J.K.; Law, J.H.; Ryan, R.O.; Van Heusden, M.C.; Ziegler, R. Insect
473 hemolymph proteins. *Adv. Insect Physiol.* **1990**, *22*, 299- 369.
474
- 475 11. Burmester, T. Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J. Comp.*
476 *Physiol.* **2002**, *172*, 95–107.
477
- 478 12. Locke, M.; Collins, J.V. Protein uptake into multivesicular bodies and storage granule in the fat
479 body of an insect. *J. Cell Biol.* **1968**, *36*, 453–483.
480
- 481 13. Tojo, S.; Betchaku, T.; Ziccardi, V.; Wyatt, G. Fat body protein granules and storage proteins in
482 the silkworm, *Hyalophora cecropia*. *J. Cell Biol.* **1978**, *78*, 823-838.
483
- 484 14. Tojo, S.; Nagata, M.; Kobayashi, M. Storage proteins of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect*
485 *Biochem.* **1980**, *10*, 289-303.
486
- 487 15. Butterworth, F.M.; Tysell, B.; Waclawski, I. The effect of 20-hydroxyecdysone and protein on
488 granule formation in the *in vitro* cultured fat body of *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* **1979**, *25*, 855-
489 860.
490
- 491 16. Koopmanschap, A.B.; deKort, C.A.D. Isolation and characterization of a high molecular weight
492 JH-III transport protein in the hemolymph of *Locusta migratoria*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*
493 **1988**, *7*, 105–118.
494
- 495 17. Braun, R.P.; Wyatt, G.R. Sequence of the hexameric juvenile hormone binding protein from the
496 hemolymph of *Locusta migratoria*. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31756–31762.
497
- 498 18. Ismail S.M.; Gillott C. Identification, characterization, and developmental profile of a high
499 molecular weight, juvenile hormone binding protein in the hemolymph of the migratory
500 grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1995**, *29*, 415–430.
501
- 502 19. Zalewska, M.; Kochman, A.; Esteve, J.P.; Lopez, F.; Chaoui, K.; Susini, C.; Ozyhar, A.; Kochman,
503 M. Juvenile hormone binding protein traffic – interaction with ATP synthase and lipid transfer
504 proteins. *BBA Biomembranes* **2009**, *1788*, 1695–1705.
505
- 506 20. Zhou, X.; Oi, F.M.; Scharf, M.E. Social exploitation of hexamerin, RNAi reveals a major caste-
507 regulatory factor in termites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2006**, *103*, 4499–4504.
508

- 509 21. Zhou, X.; Tarver, M.R.; Bennett, G.W.; Oi, F.M.; Scharf, M.E. Two hexamerin genes from the
510 termite *Reticulitermes flavipes*, sequence, expression, and proposed functions in caste regulation.
511 *Gene* **2006**, *376*, 47–58.
- 512
- 513 22. Zhou, X.; Tarver, M.R.; Scharf, M.E. Hexamerin-based regulation of juvenile hormone dependent
514 gene expression underlies phenotypic plasticity in a social insect. *Development* **2007**, *134*, 601–610.
515
- 516 23. Scharf, M.E.; Buckspan, C.E.; Grzymala, T.L.; Zhou, X. Regulation of polyphenic caste
517 differentiation in the termite *Reticulitermes flavipes* by interaction of intrinsic and extrinsic factors.
518 *J. Exp. Biol.* **2007**, *210*, 4390–4398.
519
- 520 24. Ryan, R.O.; Schmidt, J.O.; Law, J.H. Arylphorin from the haemolymph of the larval honey bee.
521 *Insect Biochem.* **1984**, *14*, 515–520.
522
- 523 25. Danty, E.; Arnold, G.; Burmester, T.; Huet, J.C.; Huet, D.; Pernollet, J.C.; Masson, C.
524 Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the
525 honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *28*, 387–397.
526
- 527 26. Cunha, A.D.; Nascimento, A.M.; Guidugli, K.R.; Simões, Z.L.P.; Bitondi, M.M.G. Molecular
528 cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.*
529 **2005**, *51*, 1135–1147.
530
- 531 27. Bitondi, M.M.G.; Nascimento, A.M.; Cunha, A.D.; Guidugli, K.R.; Nunes, F.M.F.; Simões, Z.L.P.
532 Characterization and expression of the *hex 110* gene encoding a glutamine-rich hexamerin in the
533 honey bee, *Apis mellifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2006**, *63*, 57–72 .
534
- 535 28. Martins, J.R.; Nunes, F.M.F.; Simões, Z.L.P.; Bitondi, M.M.G. A honeybee storage protein gene,
536 *hex 70a*, expressed in developing gonads and nutritionally regulated in adult fat body. *J. Insect*
537 *Physiol.* **2008**, *54*, 867– 877.
538
- 539 29. Martins, J.R.; Nunes, F.M.F.; Cristino, A.S.; Simões, Z.L.P.; Bitondi, M.M.G. The four hexamerin
540 genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression
541 patterns in queens, workers and drones. *BMC Mol. Biol.* **2010**, *11*, 23.
542
- 543 30. Martins, J.R.; Anhezini, L.; Dallacqua, R.P.; Simões, Z.L.P.; Bitondi, M.M.G. A honey bee
544 hexamerin, HEX 70a, is likely to play an intranuclear role in developing and mature ovarioles and
545 testioles. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e29006.
546
- 547 31. Kirankumar, N.; Ismail, S.M.; Dutta-Gupta, A. Uptake of storage protein in the Rice Moth *Corcyra*
548 *cephalonica*: Identification of storage protein binding proteins in the fat body cell membranes.
549 *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *27*, 671–679.
550
- 551 32. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of
552 protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
553
- 554 33. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.
555 *Nature* **1970**, *227*, 680–682.
556
- 557 34. Robbs, S.L.; Ryan, R.O.; Schmidt, J.O.; Keim, P.S.; Law, J.H. Lipophorin of the larval honeybee,
558 *Apis mellifera* L. *J. Lipid Res.* **1985**, *26*, 241–247.
559
- 560 35 - 26. Larsen, W.J. Cell remodeling in the fat body of an insect. *Tissue Cell* **1976**, *8*, 73–92.

- 561
562 36. de Priester, W.; van der Molen, L.G. Premetamorphic changes in the ultrastructure of *Calliphora*
563 fat cells. *Cell Tissue Res.* **1979**, *198*, 79-93.
564
- 565 37. Hoshizaki, D.K. Fat cell development. In: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and*
566 *pharmacology*; Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., Eds.; Elsevier: Oxford, **2005**; *2.9*, pp. 315-345.
567
- 568 38. Snodgrass, R.E. The fat body, urate cells and oenocytes. In: *Anatomy of the honey bee*. Cornell
569 University Press: Ithaca, New York, **1956**.
570
- 571 39. Cruz-Landim, C. Abelhas – Morfologia e Função de Sistemas. Editora Unesp: São Paulo, **2009**, pp.
572 159-160.
573
- 574 40. Bishop, G.H. Cell metabolism in the insect fat body. I. Cytological changes accompanying growth
575 and histolysis of the fat body of *Apis mellifica*. *J. Morphol.* **1922**, *36*, 567-601.
576
- 577 41. Bishop, G.H. Cell metabolism in the insect fat body. II. A functional interpretation of the changes
578 in structure in the fat body cells of the honey bee. *J. Morphol.* **1923**, *37*, 533-553.
579
- 580 42. Poiani, S.B.; Cruz-Landim, C. Stored products and presence of acid phosphatase in fat body
581 cells at pre-pupal worker stage of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae). *Micron*
582 **2012**, *43*, 475–478.
583
- 584 43. Tysell, B.; Butterworth, F.M. Different rate of protein granule formation in the larval fat body of
585 *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **1978**, *24*, 201-206.
586
- 587 44. Burns, K.A.; Gutzwiller, L.M.; Tomoyasu, Y.; Gebelein, B. Oenocyte development in the red flour
588 beetle *Tribolium castaneum*. *Dev. Gene Evol.* **2012**, *222*, 77-88.
589
- 590 45. Loeb, M.J.; Hakim, R.S. Insect midgut epithelium *in vitro*: an insect stem cell system. *J. Insect*
591 *Physiol.* **1996**, *42*, 1103–1111.
592
- 593 46. Sadrud-Din, S.Y.; Hakim, R.S.; Loeb, M. Proliferation and differentiation of midgut epithelial cells
594 from *Manduca sexta*, *in vitro*. *Invert. Reprod. Dev.* **1994**, *26*, 197–204.
595
- 596 47. Sadrud-Din, S.Y.; Loeb, M.J.; Hakim, R.S. In vitro differentiation of isolated stem cells from the
597 midgut of *Manduca sexta* larvae. *J. Exp. Biol.* **1996**, *199*, 319–325.
598
- 599 48. Blackburn, M.B.; Loeb, M.J.; Clark, E.; Jaffe, H. Stimulation of midgut stem cell proliferation by
600 *Manduca sexta* α -arylphorin. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2004**, *55*, 26–32.
601
- 602 49. Hakim, R.S.; Blackburn, M.B.; Corti, P.; Gelman, D.B.; Goodman, C.; Elsen, K.; Loeb, M.J.;
603 Lynn, D.; Sojn, T.; Smagghe, G. Growth and mitogenic effects of arylphorin *in vivo* and *in vitro*.
604 *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2007**, *64*, 63–73.
605
- 606 50. Cermenati, G.; Corti, P.; Caccia, S.; Giordana, B.; Casartelli, M. A morphological and functional
607 characterization of *Bombyx mori* larval midgut cells in culture. *Invert. Surv. J.* **2007**, *4*, 119–126.
608
- 609 51. Tanaka, E.D.; Hartfelder, K. The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility
610 in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. *Arthropod Struct. Dev.* **2004**, *33*, 431-442.
611

- 612 52. Rhee, W.J.; Lee, E.H.; Park, J.H.; Lee, J.E.; Park, T.H. Inhibition of HeLa Cell apoptosis by
613 storage-protein 2. *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 1441-1446.
- 614
- 615 53. Guo, C.; Yu, S.; Davis, A.T.; Wang, H.; Green, J.E.; Ahmed, K. A potential role of nuclear matrix-
616 associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells. *J. Biol.*
617 *Chem.* **2001**, *276*, 5992–5999.
- 618
- 619 54. Litchfield, D.W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and
620 death. *Biochem. J.* **2003**, *369*, 1–15.
- 621
- 622 55. Trembley, J.H.; Wang, G.; Unger, G.; Slaton, J; Ahmed, K. Protein kinase CK2 in health and
623 disease: CK2: a key player in cancer biology. *Cell Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1858–1867.
- 624
- 625 56. Begna, D.; Han, B.; Feng, M.; Fang, Y.; Li, J. Differential expressions of nuclear proteomes
626 between honeybee (*Apis mellifera* L.) queen and worker larvae: a deep insight into caste pathway
627 decisions. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 1317–1329.
- 628
- 629 57. Callier, V.; Nijhout, H.F. Control of body size by oxygen supply reveals size-dependent and size-
630 independent mechanisms of molting and metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*,
631 14664-14669.
- 632
- 633 58. Davidowitz, G.; D’Amico, L.J.; Nijhout, H.F. Critical weight in the development of insect body
634 size. *Evol. Dev.* **2003**, *5*, 188-197.
- 635
- 636 59. Nijhout, H.F.; Davidowitz, G.; Roff, D.A. A quantitative analysis of the mechanism that controls
637 body size in *Manduca sexta*. *J. Biol.* **2006**, *5*, 16.
- 638
- 639
- 640
- 641
- 642
- 643
- 644
- 645
- 646
- 647
- 648
- 649
- 650
- 651
- 652
- 653
- 654
- 655