

ESTUDOS PROTEÔMICOS DA ABELHA *Apis mellifera* E DOS PRODUTOS DA COLMÉIA

PROTEOMICS STUDIES OF THE HONEYBEE *Apis mellifera* AND THE BEEHIVE PRODUCTS

Renata Roland TEIXEIRA¹; Luciana Karen CALÁBRIA¹; Foued Salmen ESPINDOLA¹

1. Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia

RESUMO: A importância da abelha (*Apis mellifera* L.) devido ao seu papel na polinização e por ser um modelo de comportamento social levaram ao seqüenciamento do seu genoma. Isto proporcionou avanços das análises genômica e proteômica através de estudos comparativos utilizando recursos da bioinformática. A proteômica é uma nova ciência que associa a eletroforese 2D e a espectrometria de massa, permitindo a visualização da expressão de proteínas das células submetidas a diversas condições. Atualmente, existem poucos estudos proteômicos sobre a abelha e os produtos da colméia. O objetivo desta revisão é apresentar os avanços da proteômica em abelha, principalmente em relação às diferenças protéicas existentes nos cérebros de abelhas operárias campeira e nutridora, hemolinfa e veneno, além de abordar alguns dados proteômicos sobre os produtos da colméia, como a geléia real e o pólen. Desta forma, vimos que os estudos que revelam o proteoma da abelha permitem a comparação desses insetos eusociais em relação à diferenciação casta-sexo dependente e ao comportamento social relacionado. Além disso, a análise proteômica dos produtos da colméia pode contribuir para os estudos bioquímicos e farmacológicos que buscam os princípios para aplicação desses produtos na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

PALAVRAS-CHAVE: Abelha. Proteoma. Eletroforese 2D. Espectrometria de massa. Geléia real.

INTRODUÇÃO

A importância da abelha devido ao seu papel na polinização e como modelo de comportamento social foram algumas das razões que levaram ao seqüenciamento do genoma da abelha *Apis mellifera*, sendo que este estudo foi completado e publicado em outubro de 2006 pelo consórcio internacional de seqüenciamento do genoma da abelha (The Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). A análise genômica revelou poucos genes para imunidade inata, proteínas formadoras de cutícula e receptores gustatórios quando comparado com outros insetos. Por outro lado, a abelha possui mais genes para receptores de odor e outros genes relacionados com a utilização do néctar e pólen. Desta forma, o genoma reflete as mudanças biológicas profundas que levaram as abelhas a um estado avançado de organização social. Vários estudos abordam a vida social das abelhas, já que estas possuem uma estrutura social dividida entre o zangão (macho fértil) e as fêmeas, sendo que estas são separadas em duas castas, rainha (fêmea fértil) e operárias (fêmeas estéreis). Porém, existem poucos estudos descrevendo estes e outros aspectos da vida das abelhas a nível molecular. Com a disponibilidade do genoma seqüenciado tem se agora condições de realizar abordagens de bioinformática comparativa com o objetivo de se identificar fenômenos

exclusivos das abelhas, tanto nos níveis da genômica como da proteômica.

O proteoma

Uma das novas ciências que vem conquistando espaço é a proteômica, que se conceitua como um complemento protéico do genoma (*PROTEin genOMA complement*) e que veio para esclarecer melhor os mecanismos bioquímicos e fisiológicos ao nível molecular (DUTT; LEE, 2000). A proteômica compreende um conjunto de ferramentas que permite visualizar alterações das proteínas. A história dos estudos proteômicos começou a muitos anos atrás com um protocolo básico de eletroforese bidimensional (2-DE), descrito por O'Farrell (1975), sendo que este protocolo ainda é utilizado. Este procedimento tornou-se a base tecnológica para visualizar a mudança global de expressão de proteínas pela análise proteômica (BJELLQVIST et al., 1982; HENZEL et al., 1993), permitindo alta resolução (KAMO et al., 1995) e melhor reprodutibilidade (CORBETT et al., 1994; KLOSE; KOBALZ, 1995).

Nos anos recentes, a proteômica se desenvolveu com o avanço da tecnologia de espectrometria de massa seqüencial e a identificação sensível de proteínas separadas no gel 2-DE. Técnicas de *Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS) e *liquid chromatography*

electrospray ionization tandem-MS (LC-ESI-MS) foram fundamentais para a alta fidelidade na análise proteômica de *high-throughput*, tornando-se as preferidas para ionização de peptídeos e proteínas (FENN et al., 1989; KARAS et al., 1989; LINK et al., 1999; NYMAN, 2001; PORUBLEVA et al., 2001; LISKA et al., 2004).

Nesta vertente, a espectrometria de massa é a tecnologia que viabilizou a proteômica, permitindo a análise de um grande número de proteínas ao mesmo tempo. Além disso, os recursos da bioinformática também tiveram papel fundamental para armazenar e administrar os dados experimentais obtidos das análises proteômicas, sendo apoiados pelos bancos de dados e softwares específicos para proteínas, espécie- e tecido-específicos.

Análise proteômica da abelha *Apis mellifera*

Com as informações advindas dos estudos proteômicos, pode-se analisar qualquer fenômeno que implique modificações no conteúdo proteico de uma célula ou tecido; afinal, o proteoma é o equivalente ao genoma decodificado, tendo todas as proteínas expressas pela célula detentora deste genoma. Neste sentido, a abelha *A. mellifera*, entre os himenópteros, tem sido alvo de estudos com abordagem proteômica. Existem hoje estudos abordando a proteômica de fluidos como hemolinfa (CHAN et al., 2006), e de tecidos como o cérebro em função de castas, comportamento e desenvolvimento (ROAT et al., 2007), além de estudos sobre veneno (PEIREN et al., 2005; SANTOS et al., 2007) e os produtos da colméia, como geléia real.

KAPLAN; LINIAL (2006), usaram um método computacional de agrupamento não supervisionado, denominado por eles de *ProtoBee*, para extrair informações biológicas das 10.157 seqüências de proteínas previstas a partir do genoma de *A. mellifera*. No *ProtoBee* cerca de 200.000 seqüências consistem de proteínas da abelha previstas no banco de dados de proteína SWISS-PROT, no conjunto completo de proteínas de camundongo (*Mus musculus*) e de mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*), sendo que a utilização dessa abordagem computacional permitiu organizar as proteínas em 18.936 árvores hierárquicas separadas, cada uma representando uma família de proteína funcional.

Análises dos proteomas completos de camundongo e *D. melanogaster* foram capazes de evidenciar grupos funcionais de possíveis eventos de perda de genes, proteínas de funcionalidade exclusiva e parálogos específicos de abelha

(KAPLAN; LINIAL, 2006). Entre as descobertas com relevância biológica, incluem novos genes de *opsina* e os genes nucleares de seqüência similar aos mitocondriais, sendo denominados de NUMTs. Estes autores foram capazes de fornecer uma assinatura funcional para mais de 70% das seqüências. Portanto, esta habilidade de dividir as proteínas do proteoma de abelha em grupos funcionais a luz de dois proteomas de metazoários, possibilitou evidenciar grupos de proteínas que podem ser responsáveis por características biológicas exclusivas para as abelhas.

A análise bioquímica da hemolinfa da abelha nos últimos 40 anos focalizou-se em aminoácidos, metabolismo do açúcar, hormônio juvenil e vitelogenina. Entretanto, havia um conhecimento muito limitado sobre o índice de proteínas neste fluido. Chan e colaboradores (2006) realizaram um estudo proteômico quantitativo e qualitativo da hemolinfa utilizando Q-TOF e encontraram diferenças significativas na sua composição protéica, especialmente nos estágios larval e adulto de zangão, rainha e operária.

Por outro lado, com o objetivo de identificar novos componentes com potencial alergênico, a composição protéica do veneno de *A. mellifera* foi analisada em eletroforese bidimensional e um total de 49 *spots* foi excisado e submetido à espectrometria de massa. Trinta e nove *spots* resultaram na identificação de seis diferentes proteínas de abelha e três ainda não descritas, sendo a melitina e a PLA2 as mais predominantes (PEIREN et al., 2005).

Aspectos da análise proteômica do cérebro de *Apis mellifera*

A abelha tem sido considerada um importante organismo modelo para estudos neurobiológicos envolvendo aprendizagem e memória comportamental nos níveis celular e molecular. Essas considerações são possíveis porque a *A. mellifera* possui riqueza comportamental (MENZEL; GIURFA, 2001); fácil acesso experimental em termos de se controlar o treinamento do indivíduo com poucas variáveis (TAKEDA, 1961; BITTERMAN et al., 1983); além de acessibilidade ao sistema nervoso central em experimentos que sejam necessários apenas a exposição do cérebro para estudos *in vivo* (MENZEL, 2001).

As tarefas entre as operárias são divididas em cinco categorias: limpeza e construção das células, cuidado e alimentação da rainha, manipulação do alimento, ventilação, guarda e forrageamento (SEELEY, 1982). A relação da idade com a divisão

de trabalho é baseada nos padrões do desenvolvimento comportamental de cada indivíduo (ROBINSON, 1992). Em colônia, a operária nutridora de 6-11 dias alimenta e cuida da abelha rainha, fazendo a manutenção da colméia; enquanto a operária campeira, com aproximadamente 2-3 semanas, trabalha fora da colônia buscando néctar e pólen. O forrageamento envolve aprendizagem e memorização do local onde se encontra o alimento, capacidade de navegação e comunicação; e por outro lado, o cuidado dentro da colméia necessita de olfato aguçado, principalmente na percepção de feromônios (FAHRBACH et al., 1995; MENZEL; MULLER, 1996; MENZEL; GIURFA, 2001).

Neste contexto, os estudos proteômicos do cérebro de abelhas *A. mellifera* (HERNANDEZ et al., 2007; ROAT et al., 2007; HUMMON et al., 2006) revelaram proteínas diferencialmente expressas como resultado de mudanças no comportamento, e na memória e aprendizagem. Em *A. mellifera* foram identificadas várias proteínas no cérebro de abelhas nutridoras e campeiras, sendo cerca de 50 proteínas diferencialmente expressas. Entre estas se incluem as principais proteínas da geléia real (MRJPs), as mais abundantes, também imunodetectadas no cérebro (PEIXOTO et al., 2007).

A alteração comportamental é acompanhada por mudanças na estrutura e no volume de regiões específicas do cérebro da abelha (WHITERS et al., 1993; SIGG et al., 1997), na morfologia da glândula hipofaríngeal (OHASHI et al., 1999), na expressão de alguns genes (WHITFIELD et al., 2003; TSUCHIMOTO et al., 2004) e na diversidade de proteínas ligantes de calmodulina (CaMBPs) no cérebro, recentemente revelada (CALÁBRIA et al., 2007). A partir da associação de cromatografia de afinidade e espectrometria de massa, um total de 17 CaMBPs consideradas comportamento-específico foram identificadas em cérebro de operárias *A. mellifera*, sendo uma em campeira, doze em nutridora e quatro em ambas operárias.

Outros estudos têm buscado a identificação de proteínas que se expressam diferencialmente em regiões específicas do cérebro da abelha. Uno e colaboradores (2007) identificaram cinco *spots* nos corpos de cogumelo e três *spots* no lobo óptico. Por hibridização *in situ* revelaram que a expressão do hormônio juvenil diol kinase é *upregulated*, enquanto o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é *downregulated*, indicando que nos corpos de cogumelo existem distintos perfis de gene e proteínas. Além disso, combinando MALDI-TOF e HPLC/Q-Tof, Takeuchi e colaboradores (2003) identificaram a seqüência de aminoácidos de um

neuropeptídeo no cérebro da abelha *A. mellifera*, chamado AmTRP, que ainda não teve sua função revelada.

Abordagem proteômica dos produtos da colméia: um enfoque na Geléia Real

A geléia real (GR) é secretada pelas glândulas hipofaríngeais e mandibulares das abelhas operárias jovens, principalmente entre a sexta e décima segunda semana de vida (NAGAI; INOUE, 2004). Esse produto da colméia é o principal alimento da rainha durante toda a sua vida e das operárias nos primeiros três dias de vida (SCHMITZOVÁ et al., 1998). A dieta larval possui uma importante função no polifenismo da abelha *A. mellifera*, sendo importante para a diferenciação das castas e pelas características exclusivas da rainha como o aumento da massa corporal, longevidade e desenvolvimento de estruturas relacionadas à reprodução (KUBO et al., 1996; OHASHI et al., 1997).

A GR tem sido utilizada como suplemento alimentar associado à longevidade e está presente na composição de cosméticos em vários países (KAMAKURA et al., 2001). Além disso, apresenta diversas atividades biológicas e farmacológicas, dentre as quais se destacam a atividade vasodilatadora e hipotensora (SHIMODA et al., 1978; TOKUNAGA et al., 2004), regulatória no controle do desenvolvimento da abelha (MALEKOVA et al., 2003), na modulação de respostas imunes (OKAMOTO et al., 2003), atividade anti-hipercolesterolêmica (NAKAJIN et al., 1982), atividade antiinflamatória podendo atuar na inibição da produção de citocinas proinflamatórias (KOHNO et al., 2004), atividade bactericida (KLAUDINY et al., 2005), antitumoral (TAMURA et al., 1987), antifadiga (KAMAKURA et al., 2001b) e antioxidante (TAKESHI et al., 2001).

A GR possui de 9 a 15% do seu peso total em proteínas e, nos últimos anos, vários estudos têm identificado e caracterizado essas proteínas. Dentre elas destacam-se a família das principais proteínas da GR, MRJPs ou apalbuminas. Essas proteínas representam 82% do total das proteínas hidrossolúveis e cerca de 90% do total de proteínas da GR (SCHMITZOVÁ et al., 1998), consistindo de cinco membros principais: MRJP-1, -2, -3, -4 e -5 (OHASHI et al., 1997; SCHMITZOVÁ et al., 1998; SIMÚTH, 2001). ALBERT; KLAUDINY (2004) e SANTOS et al. (2005) relataram a presença de outras três MRJPs (MRJP-6 a -8) em bibliotecas de cDNA de cérebro de *A. mellifera* e na secreção da glândula hipofaríngeal, respectivamente.

A composição da GR pode variar de acordo com o estado fisiológico e metabólico da abelha nutridora, a idade da larva, a espécie da abelha, as condições sazonais e regionais (ALBERT et al., 1999; SCARSELLI et al., 2005). Estudos envolvendo a análise proteômica da GR podem revelar as variações protéicas existentes entre amostras diferentes, possibilitando a investigação de novas funções relacionadas à GR, favorecendo o mercado de consumo deste produto da colméia e incentivando os apicultores.

Teixeira et al. (2007) analisando amostras de GR provenientes de origem e condições distintas, verificaram um perfil protéico característico e, utilizando cromatografia de afinidade e espectrometria de massa, identificaram 16 polipeptídeos *N*-glicosilados, sendo todos diferentes isoformas das MRJPs. Outros estudos comparando a composição protéica da GR produzida por abelhas européia e africanizada, a partir de abordagem proteômica em gel bidimensional e análise da seqüência N-terminal, identificaram diferentes isoformas de MRJP-2 a -5, essas apresentaram heterogeneidade em termos de massa molecular e ponto isoeletrico (SANO et al., 2004). Esses resultados implicam que as diferenças protéicas observadas correspondem a diferenças genéticas entre as abelhas européias e africanizadas, além de processos distintos e específicos de modificações pós-traducionais.

Outro estudo utilizando eletroforese 2D e espectrometria de massa (SANTOS et al. 2005), relatou 61 diferentes polipeptídeos na glândula hipofaríngea de nutridora *A. mellifera* e identificou 34 proteínas, das quais 27 são isoformas das MRJP-1 a -8, cinco são proteínas relacionadas com o metabolismo, uma proteína relacionada com o acúmulo de ferro no corpo da abelha e outra reguladora do processo de oligomerização da MRJP-1. Deste modo, comparando-se o perfil protéico da secreção da glândula hipofaríngea de abelhas operárias nutridoras e da GR observou-se que as MRJPs são produzidas pela glândula e secretadas como componentes da GR, onde sofrem proteólise e outras modificações, gerando novas isoformas observadas somente nas amostras de GR (SANTOS et al., 2005).

Scarselli et al. (2005) verificaram 21 *spots* em gel bidimensional da GR de *A. mellifera*, e a partir da identificação do perfil de massas dos peptídeos

obtidos por MALDI-TOF e análise em banco de dados identificaram-se nove isoformas da MRJP-3, duas isoformas da MRJP-2 e dez isoformas da MRJP-1. Sendo que algumas dessas isoformas foram também identificadas como produtos de degradação das MRJP-1 e -3 com massa molecular relativa menor que 30 kDa.

Além disso, Scarselli et al. (2005), utilizando pólen apícola, identificaram sete proteínas, das quais quatro são isoformas da MRJP-1 e possuem pI variando de 4.7 a 5.2, e três são isoformas da MRJP-2, com pI variando de 7.0 a 7.4. Esses dados confirmam os dados de Simúth et al. (2004) que imunodetectaram a MRJP-1 no pólen apícola, e sugerem que as MRJPs apresentam outras funções além da nutricional.

CONCLUSÃO

A revelação dos proteomas permite que pesquisadores trabalhem em locais diferentes, abordando diversos assuntos que envolvam a expressão de proteínas em diversas situações, tais como sob o efeito de fármacos, condições patológicas, nos processos de diferenciação celular, comparação de variedades da mesma espécie e resposta celulares a estímulos externos diversos, e possam identificar mais facilmente e especificamente as proteínas expressas.

A análise proteômica possui muitas outras aplicações além das que trazemos aqui, e a demanda de trabalhos nesta área tem crescido no Brasil e no mundo nos últimos anos. O atendimento dessa demanda vai depender do apoio continuado a grupos de pesquisa em proteínas e proteomas. Assim, consideramos que o avanço da proteômica comparativa pode estabelecer novas abordagens e responder questões sobre a análise do sistema nervoso e de processos como memória, aprendizagem e comportamento social das abelhas, assim como de outros invertebrados e vertebrados. O interesse em desvendar o proteoma da abelha e de seus produtos, juntamente com informações do seqüenciamento completo do genoma, poderão fornecer grandes contribuições à ciência, relacionadas ao comportamento social e casta-sexo dependentes, além de auxiliar os estudos bioquímicos e farmacológicos para aplicação dos produtos da colméia na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

ABSTRACT: The relevance of honeybee *Apis mellifera* due to its role in the polynization and as a model organism of social behavior studies were some of the reasons that motivates the sequence of its complete genome allowing comparative bioinformatics studies. Proteomics is a new science that's merge the

technologies of bidimensional electrophoresis and mass spectrometry to visualize at once the whole protein expression of a cell upon a specific condition. There are up to date few proteomics studies targeting the honeybee and the beehive products such as royal jelly, venom, honey and pollen. This review intend to comments some of theses studies in special of those about the brain protein sets in the nurse and foragers works honeybee and the beehive products. In this way, studies revealing the honeybee proteome allow comparative biology of this eusocial insect concerning cast and sex differentiation and social behavior associated to that. Moreover, proteomics of the beehive products may contribute to its application in the food, cosmetic and pharmaceutical industry.

KEYWORDS: Brain. Electrophoresis 2D. Honeybee. Mass spectrometry. Proteomics. Royal jelly.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, S. AND KLAUDINY, J. The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: identification of new members in the EST library. **J. Insect Physiol.** v. 50, p. 51-59, 2004.
- ALBERT, S.; KLAUDINY, J.; SIMÚTH, J. Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 29, p. 427-434, 1999.
- BITTERMAN, M. E.; MENZEL, R.; FIETZ, A.; SCHÄFER, S. Classical conditioning of proboscis extension in honeybee (*Apis mellifera*). **J. Comp. Psychol.** v. 97, p. 107-119, 1983.
- BJELLQVIST, B.; EK, K.; RICETTI, P. G.; GIANAZZA, E.; GORG, A.; WESTERMEIR, R.; POSTEL, W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. **J. Biochem. Biophys. Methods.** v. 6, n. 4, p. 317-339, setembro 1982.
- CALABRIA, L. K.; HERNANDEZ, L. G.; TEIXEIRA, R. R.; SOUSA, M. V.; ESPINDOLA, F. S. Identification of calmodulin-binding proteins in the forager and nurse workers honeybee brain *Apis mellifera* L. **Insect Biochem. Mol. Biol.** submetido, 2007.
- CHAN, Q. W.; HOWES, C. G.; FOSTER, L. J. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. **Mol. Cell Proteomics.** v. 5, n. 12, p. 2252-2262, dezembro 2006.
- CORBETT, J. M.; DUNN, M. J.; POSCH, A.; GORG, A. Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilized pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. **Electrophoresis.** v. 15, n. 8-9, p. 1205-1211, agosto-setembro 1994.
- DUTT, M. J.; LEE, K. H. Proteomic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* v. 11, n. 2, p. 176-179, abril 2000.
- FAHRBACH, S. E.; GIRAY, T.; ROBINSON, G. E. Volume changes in the mushroom bodies of adult honey bee queens. **Neurobiol. Learn. Mem.** v. 63, n. 2, p. 181-191, março 1995.
- FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science.** v. 246, n. 4926, p. 64-71, outubro 1989.
- HENZEL, W. J.; BILLECI, T. M.; STULTS, J. T.; WONG, S. C.; GRIMLEY, C.; WATANABE, C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 90, n. 11, p. 5011-5015, junho 1993.
- HERNANDEZ, L. G.; GARCIA, C. H. S.; CALÁBRIA, L. K.; ESPINDOLA, F. S.; CRUZ, G. C. N.; PUENTES, A. S.; FONTES, W.; RICART, C. A.; SOUSA, M. V. Proteome analysis of honeybee brain from worker subcastes with distinct social roles. In: XXXVI ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2007, Salvador. **Annals of the XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology,** 2007.

HUMMON, A. B.; RICHMOND, T. A.; VERLEYEN, P.; BAGGERMAN, G.; HUYBRECHTS, J.; EWING, M. A.; VIERSTRAETE, E.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; SCHOOF, L.; ROBINSON, G. E.; SWEEDLER, J. V. From the Genome to the Proteome: Uncovering Peptides in the *Apis* Brain. **Science**. v. 314, n. 5799, p. 647-649, outubro 2006.

KAMAKURA, M.; MITANI, N.; FUKUDA, T.; FUKUSHIMA, M. Antifatigue effect of fresh royal jelly in mice. **J Nutri. Sci. Vitaminol.** v. 47, p. 394-401, 2001b.

KAMO, M.; KAWAKAMI, T.; MIYATAKE, N.; TSUGITA, A. Separation and characterization of *Arabidopsis thaliana* proteins by two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis**. v. 16, n. 3, p. 423-430, março 1995.

KAPLAN, N.; LINIAL, M. ProtoBee: hierarchical classification and annotation of the honey bee proteome. **Genome Res.** v. 16, n. 11, p. 1431-1438, novembro, 2006.

KARAS, M.; BAHR, U.; INGENDO, A.; HILLENKAMP, F. Laser desorption-ionization mass spectrometric of proteins with masses 100,000 to 250,000 dalton. **Angew Chem. Int. Ed. Eng.** v. 28, p.760-761, 1989.

KLAUDINY, J.; ALBERT, S.; BACHANOVA, K.; KOPERNICKY, J.; SIMÚTH, J. Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 35, p. 11-22, 2005.

KLOSE, J.; KOBALZ, U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. **Electrophoresis**. v. 16, n. 6, p. 1034-1059, junho 1995.

KOHNO, K.; OKAMOTO, I.; SANO, O.; ARAI, N.; IWAKI, K.; IKEDA, K.; KURIMOTO, M. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 68, p. 138-145, 2004.

KUBO, T.; SAKANI, M.; NAKANURA, J.; SASAGAWA, H.; OHASHI, H.T.; NATORI, S. Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. **J Biochem.** v. 119, p. 291-295, 1996.

LINK, A.; ENG, J.; SCHIELTZ, D.; CARMACK, E.; MIZE, G.; MORRIS, D.; GARVIK, B.; YATES, J. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. **Nat. Biotechnol.** v. 17, n. 7, p. 676-682, julho 1999.

LISKA, A. J.; POPOV, A. V.; SUNYAEV, S.; COUGHLIN, P.; HABERMANN, B.; SHEVCHENKO, A.; BORK, P.; KARSENTI, E.; SHEVCHENKO, A. Homology-based functional proteomics by mass spectrometry: application to the *Xenopus* microtubule-associated proteome. **Proteomics**. v. 4, n. 9, p. 2707-2721, setembro 2004.

MALEKOVA, B.; RAMSER, J.; O'BRIEN, J. K.; JANITZ, M.; JUDOVA, J.; LEHRACH, H.; SIMÚTH, J. Honeybee (*Apis mellifera* L.) mrjp gene family: computational analysis of putative promoters and genomic structure of mrjp1, the gene coding for the most abundant protein of larval food. **Gene**. v. 16, p. 165-175, 2003.

MENZEL, R. Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. **Learn. Mem.** v. 8, n. 2, p. 53-62, abril 2001.

MENZEL, R.; GIURFA, M. Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. **Trends Cogn. Sci.** v. 5, n. 2, p. 62-71, fevereiro 2001.

MENZEL, R.; MULLER, U. Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 19, p. 379-404, 1996.

NAGAI, T. AND INOUE, R. Preparation and functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. **Food Chem.** v. 84, p. 181-186, 2004.

NAKAJIN, S.; OKIYAMA, L.; YAMASYITA, S.; AKIYAMA, Y.; SHINODA, M. Effect of royal jelly on experimental hypercholesterolemia in rabbits. **Yakugaku Zasshi.** v. 36, p. 65-69, 1982.

NYMAN, T. A. The role of mass spectrometry in proteome studies. **Biomol. Eng.** v. 18, n. 5, p. 221-227, novembro 2001.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.** v. 250, n. 10, p. 4007-4021, maio 1975.

OHASHI, K.; NATORI, S.; KUBO, T. Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. **Europ. J Biochem.** v. 249, p. 797-802, 1997.

OHASHI, K.; NATORI, S.; KUBO, T. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). **Eur. J. Biochem.** v. 265, n. 1, p. 127-133, outubro 1999.

OKAMOTO, I.; TANIGUCHI, Y.; KUNIKATA, T.; KOHNO, K.; IWAKI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. **Life Sci.** v. 73, p. 2029-2045, 2003.

PEIREN, N.; VANROBAEYS, F.; DE GRAAF, D. C.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J.; JACOBS, F. J. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1752, n. 1, p. 1-5, agosto 2005.

PEIXOTO, L. G.; CALABRIA, L. K.; ESPINDOLA, F. S. Immunodetection and immunohistochemistry of proteins related to the MRJPs in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. **J. Neurobiol.** submetido, 2007.

PORUBLEVA, L.; VANDER, V. K.; KOTHARI, S.; LIVIER, D. J.; CHITNIS, P. R. The proteome of maize: use of gene sequence and expressed sequence tag data for identification of proteins with mass fingerprints. **Electrophoresis.** v. 22, n. 9, p. 1724-1738, maio 2001.

ROAT, T. C.; SANTOS, L. D.; SANTOS, K. S.; PINTO, J. R. A. S.; DIAS, N. B.; PALMA, M. S.; LANDIM, C. C. Differential pattern of protein expression in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) brain. In: XXXVI ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2007, Salvador. **Annals of the XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology**, 2007.

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

SANO, O.; KUNIKATA, T.; KOHNO, K.; IWAKI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by two-dimensional gel electrophoresis. **J Agric Food Chem.** v. 52, p. 15-20, 2004.

SANTOS, K. S.; SANTOS, L. D.; STEPHANO, M. A.; HIGASHI, H. G.; CARICATI, C.; KALIL, J. E.; PALMA, M. S. Profiling the venomics of the africanized honeybees (*Apis mellifera*). In: XXXVI ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2007, Salvador. **Annals of the XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology**, 2007.

- SANTOS, K. S.; DOS SANTOS, L. D.; MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 35, p. 85-91, 2005.
- SCARSELLI, R.; DONADIO, E.; GIUFFRIDA, M.G.; FORTUNATO, D.; CONTI, A.; BALESTRERI, E.; FELICIOLO, R.; PINZAUTI, M.; SABATINI, A.G.; FELICIOLO, A. Towards royal jelly proteome. **Proteomics.** v. 5, p. 769-776, 2005.
- SCHMITZOVÁ, J.; KLAUDINY, J.; ALBERT, S.; HANES, J.; SCHRODER W.; SCHROCKENGOST, V. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. **Cell Mol. Life Sci.** v. 54, p. 1020-1030, 1998.
- SEELEY, T. D. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. **Behav. Ecol. Sociobiol.** v. 11, n. 4, p. 287-293, dezembro 1982.
- SHIMODA, M.; NAKAJIN, S.; OIKAWA, T.; SATO, K.; KAMOGAWA, A.; AKIVAMA, Y. Biochemical studies on vasodilative factor in royal jelly. **Yakugaku Zasshi**, v. 2, p. 139-145, 1978.
- SIGG, D.; THOMPSON, C. M.; MERCER, A. R. Activity-dependent changes to the brain and behavior of the honeybee, *Apis mellifera*. **J. Neurosci.** v. 17, n. 18, p. 7148-7156, setembro 1997.
- SIMÚTH, J.; BÍLIKOVÁ, K.; KOVÁCOVÁ, E.; KUZMOVÁ, Z.; SCHRODER, W. Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF- α is a regular component of honey. **J Agric Food Chem.** v. 52, p. 2154-2158, 2004.
- SIMÚTH, U. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. **Apidologie.** v. 32, p. 69-80, 2001.
- TAKEDA, K. Classical conditioned response in the honeybee. **J. Insect Physiol.** v. 6, n. 3, p. 163-241, julho 1961.
- TAKESHI, N.; MIZUHO, S.; REIJI, I.; HACHIRO, I.; NOBUTAKA, S. Antioxidative activities of some commercially honeys, RJ and propolis. **Food Chem.** v. 75, p. 237-40, 2001.
- TAKEUCHI, H.; YASUDA, A.; YASUDA-KAMATANI, Y.; KUBO, T.; NAKAJIMA, T. Identification of a tachykinin-related neuropeptide from the honeybee. **Insect Mol. Biol.** v. 12, n. 3, p. 291-298, junho 2003.
- TAMURA, T.; FUJII, A.; KUBOYAMA, N. Antitumor effects of royal jelly. **Folia pharmacologica Japonica.** v. 89, p. 73-80, 1987.
- TEIXEIRA, R. R.; HERNANDEZ, L. G.; CALÁBRIA, R. R.; SOUSA, M. V.; ESPINDOLA, F. S. MALDI-TOF MS identification of glycoproteins from royal jelly of *Apis mellifera* L. **J Agric. Food Chem.** submetido, 2007.
- THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature.** v. 443, n. 7114, p. 931-949, outubro 2006.
- TOKUNAGA, K.H.; YOSHIDA, C.; SUZUKI, K.M.; MARUYAMA, H.; FUTAMURA, Y.; ARAKI, Y.; MISHIMA, S. Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats. **Biol. Pharm. Bull.** v. 27, p. 189-192, 2004.
- TSUCHIMOTO, M.; AOKI, M.; TAKADA, M.; KANOU, Y.; SASAGAWA, H.; KITAGAWA, Y.; KADOWAKI, T. The changes of gene expression in honeybee (*Apis mellifera*) brains associated with ages. **Zoolog. Sci.** v. 21, n. 1, p. 23-28, janeiro 2004.

UNO, Y.; FUJIYUKI, T.; MORIOKA, M.; TAKEUCHI, H.; KUBO, T. Identification of proteins whose expression is up- or down- regulated in the mushroom bodies in the honeybee brain using proteomics. **FEBS Letters**. v. 581, n. 1, p. 97-101, janeiro 2007.

WHITFIELDS, C. W.; CZIKO, A. M.; ROBINSON, G. E. Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. **Science**. v. 302, n. 5643, p. 296-299, outubro 2003.

WITHERS, G. S.; FAHRBACH, S. E.; ROBINSON, G. E. Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. **Nature**. v. 364, n. 6434, p. 238-240, julho 1993.