

# ELETOFEROGRAMA DE PROTEÍNAS DE HEMOLINFA DE ABELHAS *Apis mellifera* L. SUBMETIDAS À PRODUÇÃO DE GELÉIA REAL<sup>1</sup>

HÉLIO CARLOS ROCHA<sup>2\*</sup>, PAULO ROBERTO RODRIGUES RAMOS<sup>3</sup>, SILVIA REGINA CUNHA FUNARI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, apresentada no Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Produção Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP. Recebido para publicação em 25/03/02. Aceito para publicação em 17/12/03.

<sup>2</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, CEP 99170-000, Passo Fundo, RS.

E-mail: [helio@upf.tche.br](mailto:helio@upf.tche.br)

<sup>3</sup>Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, CEP 18618-000, Botucatu, SP.

<sup>4</sup>Departamento de Produção e Exploração Animal, FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu, CEP 18618-000, Botucatu, SP.

**RESUMO:** O objetivo do presente trabalho foi estudar o eletroferograma de proteínas da hemolinfa de operárias de *Apis mellifera* L., através de eletroforese em gel de poliacrilamida. As amostras de hemolinfa foram obtidas de 18 colônias de abelhas africanizadas e suas híbridas, italianas e cárnicas, submetidas à produção de geléia real, com e sem acesso a 20% de proteína proveniente de pólen. As amostras de hemolinfa de abelhas adultas recém-emergidas, de 12, 18 e 24 dias de idade foram obtidas pela introdução de uma ponteira de aplicação de polietileno de 50 µL no coração dorsal, através da membrana intrasegmental, entre o terceiro e o quarto segmentos abdominais de cada abelha. A hemolinfa extraída foi misturada com três gotas de feniltio-uréia, para inibir a atividade da tirosinase. A dosagem de proteínas foi determinada em espectrofotômetro pelo método bioquímico de biureto. A absorvância foi medida em 540 nm, e após calculada a quantidade de proteína de cada amostra. No fracionamento eletroforético das proteínas foram empregados o PhastSystem e mini géis de poliacrilamida em gradiente 8-25% na técnica de SDS-PAGE. Foram aplicados 500 ng de proteína em cada ponto de aplicação. Após a corrida, os géis foram corados com prata, de acordo com as especificações do fabricante. Na hemolinfa das abelhas adultas recém emergidas, o padrão eletroforético está distribuído uniformemente entre bandas de proteínas de baixo (60 - 80 Kd), médio (100 - 150 Kd) e alto (200 - 250 Kd) peso molecular, com um total de 27 bandas. Com o avanço da idade, os padrões eletroforéticos da hemolinfa se estabilizam em proteínas de alto e médio peso molecular, com um total de 15 a 17 bandas. Os tratamentos nos níveis utilizados neste trabalho, não evidenciaram diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade.

Palavras-chave: hemolinfa; abelha (*Apis mellifera* L.); pólen; eletroferograma; SDS-PAGE.

## PROTEIN ELECTROPHEROGAM OF HAEMOLYMPH FROM *Apis mellifera* L. BEES SUBMITTED TO ROYAL JELLY PRODUCTION

**ABSTRACTS:** The objective of this research was to study the eletropherogram of the proteins of the haemolymph in *Apis mellifera* L. worker bees by utilizing eletroforese in polyacrylamide gel. Haemolymph samples were obtained from 18 beehives of africanized honey bees and their hybrids, italian and carniolas, which were submitted to royal jelly production, either with or without access to 20% pollen protein. Haemolymph sample from recently emerged adult bees aged, 12, 18 and 24 days was obtained. These samples were extracted by introducing a 50 µL micropipette tip into the dorsal heart of each bee, through the intrasegmental membrane, between the third and the fourth abdomen segments. In order to inhibit the tirosinase activity, haemolymph samples were treated with three drops of fenyltio-ureia. The dosage absorbance rate of protein for each sample

were determined by the use of the spectrophotometer and the biochemical biureto method. The absorbance rate was measured at 540 nm. The PhastSystem and 8-25% gradient mini polyacrylamide gels were used in the sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) technique. Five hundred ng of protein were applied to each well. After one run of the electrophoresis, the gels were stained with silver according to the manufacturer's specifications. In the haemolymph of newly emerged adult bees, the electrophoresis pattern is evenly distributed among protein bands of low (60 - 80 Kd), medium (100 - 150 Kd), and high (200 - 250 Kd) molecular weight, with a total of 27 bands. With the advance of age, the haemolymph electrophoretic pattern stabilizes in protein bands of high and medium molecular weight, with a total of 15 to 17 bands. No differences among treatments were observed ( $P > 0.05$ ).

Key words: haemolymph; honeybee (*Apis mellifera* L.); pollen; electropherogram; SDS-PAGE

## INTRODUÇÃO

De acordo com SNODGRASS e ERICKSON (1992), os espaços do corpo da abelha não ocupados por órgãos ou outros tecidos são preenchidos com um líquido semelhante ao sangue dos vertebrados, chamado de hemolinfa. Flutuando na hemolinfa estão numerosas células, os hemócitos, de vários tipos, células estas que não servem para o transporte de oxigênio e que se assemelham-se aos glóbulos brancos dos animais vertebrados. A hemolinfa também transporta pequenas quantidades de oxigênio, no entanto, suas principais funções conhecidas são: a distribuição de material alimentício digerido e absorvido através do tubo digestivo; a recepção de produtos do desperdício do metabolismo, que são removidos pelos órgãos excretores; e o transporte de gás carbônico, que é eliminado pelos órgãos respiratórios e cutícula. A hemolinfa possui uma cor âmbar pálida, é mantida em circulação pelo corpo através de um vaso tubular, chamado de coração, e de membranas vibratórias.

Em estudos comparativos da hemolinfa de abelhas (*Apis mellifera* L.), vários autores (FOTI *et al.*, 1969; MESTRINER, 1970) encontraram diferenças quantitativas e qualitativas em padrões de proteínas na hemolinfa de indivíduos em diferentes fases do desenvolvimento, castas e raças. Diferenças também foram observadas entre indivíduos saudáveis, abelhas campeiras e algumas abelhas invernais (BOUNIAS, 1975).

As proteínas da hemolinfa de abelhas em desenvolvimento foram investigadas por LENSKY (1971) por eletroforese de disco, dupla difusão e imuno-eletroforese, usando antisoro contra hemolinfa de larvas e adultos. Três padrões princi-

pais de proteínas na hemolinfa - larval, adulto e comum para todas as fases - foram determinados durante o desenvolvimento de abelhas operárias de ovo até adulto.

Também as proteínas da hemolinfa de abelhas em diferentes estágios e idades foram estudadas por GILLIAM e JACKSON (1972) por meio de eletroforese de disco. Os padrões das proteínas da hemolinfa de abelhas operárias em desenvolvimento mudaram durante o curso de maturação e envelhecimento. Porém, não foi observada qualquer diferença em eletroferogramas de operárias adultas, indicando que aquelas proteínas da hemolinfa devem ser estabilizadas nos adultos.

As situações de estresse também revelam uma redução do conteúdo de proteínas totais na hemolinfa, como mostram os estudos de GLINSKI e JAROSZ (1984) em crias de zangão parasitadas por *Varroa jacobsoni*. O parasitismo altera os padrões eletroforéticos e densidades das proteínas da hemolinfa, especialmente as frações de proteínas de baixo peso molecular.

Comparando o número de frações de proteínas na hemolinfa de larvas jovens e pré-pupas, GLINSKI e JAROSZ (1986) encontraram apenas seis bandas de proteínas em gel de poliacrilamida. Os estádios larvais são caracterizados por 14 proteínas reativas e sorologicamente idênticas e uma proteína única que só ocorre em larvas.

Utilizando hemolinfa de abelhas operárias adultas saudáveis em eletroforese em gel de poliacrilamida, GLINSKI e JAROSZ (1986) obtiveram dez ou mais frações de proteínas migrando para o cátodo. Nenhuma diferença essencial foi encontra-

da no número e tipos de frações protéicas na hemolinfa de abelhas operárias injetadas com vários materiais estranhos, como cultura de células de *Candida albican*, esporos de *Asperglus flavus* e soro fisiológico.

Utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e técnica imunoquímica OTANI *et al.*, (1985) estimaram os pesos moleculares aparentes das proteínas, que variaram de 24.000 a 76.000 daltons em SDS-PAGE.

O objetivo do presente trabalho foi estudar o perfil protéico da hemolinfa em abelhas *Apis mellifera* L., por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, em colônias submetidas à produção de geléia real, com e sem acesso a pólen.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 18 colônias de abelhas com 5 quadros, distribuídas em Africanizadas e suas híbridas Italianas e Cárnicas. Todas as colônias foram conduzidas com um coletor de pólen de alvado durante toda a fase experimental, para melhor avaliar o efeito da alimentação sobre a produção de geléia real, reduzindo a entrada de pólen pelas campeiras. Os tratamentos utilizados foram: 10g de ração, composta de açúcar de confeitiro com 20% de proteína proveniente de pólen; e 10g de açúcar de confeitiro, oferecidos a cada três dias, por meio de um alimentador interno, mantido junto aos quadros.

As abelhas adultas nasceram de quadros de cria das colônias experimentais, transferidos para estufas com temperatura de 30 °C e umidade de 60% U.R. Assim que emergiram das células dos favos, aproximadamente 200 abelhas de cada colônia foram marcadas no tórax com tinta esmalte, e após a sua secagem, devolvidas para as respectivas colônias. As amostragens das abelhas foram realizadas por ocasião das transferências (DOOLITTLE, 1899), ou seja, a cada três dias, quando foram retiradas 5 abelhas adultas marcadas por colônia.

As amostras de hemolinfa de abelhas adultas foram obtidas pela introdução de uma ponteira de aplicação de polietileno de 50 mL no coração dorsal, através da membrana intrasegmental, entre o terceiro e o quarto segmentos abdominais da abelha adulta. A cabeça e o tórax foram pressionados con-

tra uma almofada de espuma (4 cm X 4 cm X 1 cm) pelo dedo indicador da mão esquerda, permitindo assim a introdução da ponteira, contida na mão direita, enquanto evitava-se o ferrão da abelha. A hemolinfa extraída foi misturada com três gotas de feniltio-uréia, substância que inibe a atividade da tirosinase do sangue, na presença do oxigênio atmosférico (LENSKY, 1968).

A dosagem de proteínas foi determinada em espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia), pelo método bioquímico de biureto segundo VILLELA *et al.*, (1973), com modificações. Foram tomados 5 mL de amostra, misturados com 2,5 mL de um solução estoque de Biureto (Weichselbaum), sendo diluídos 20 mL de solução estoque para 100 mL de NaOH 0,2N, contendo 5 g de iodeto de potássio.

O aparelho foi zerado com o próprio biureto, usado como branco, medindo-se 2,5 mL de reagente mais 5 mL de água destilada. O soro padrão de proteínas totais utilizado foi o da Labtest-Brasil, para uso *in vitro*, contendo 5,3 g/dL de proteínas totais. As soluções foram homogeneizadas e os tubos colocados em banho-maria a 37 °C, durante 15 minutos.

A absorvância foi medida em 540 nm, sendo posteriormente calculada a quantidade de proteína de cada amostra de soro a partir da seguinte fórmula:

$$\text{g de proteína em 100 mL} = A_d \times C / A_p,$$

sendo:

$$A_d = \text{absorvância da solução desconhecida}$$

$$A_p = \text{absorvância do padrão}$$

$$C = \text{concentração do padrão (g de proteína/100 mL)}$$

Para o fracionamento eletroforético das proteínas, foram empregados o PhastSystem e mini géis de poliacrilamida em gradiente 8-25% (PhastGel - Pharmacia) na técnica de SDS-PAGE. As amostras passaram por tratamento térmico (100 °C em 1 minuto) em presença de b-Mercaptoetanol e Dodecil-Sulfato de Sódio (SDS). Foram aplicados 500 ng de proteína em cada ponto de aplicação. No ponto de aplicação lateral esquerdo aplicou-se o padrão de

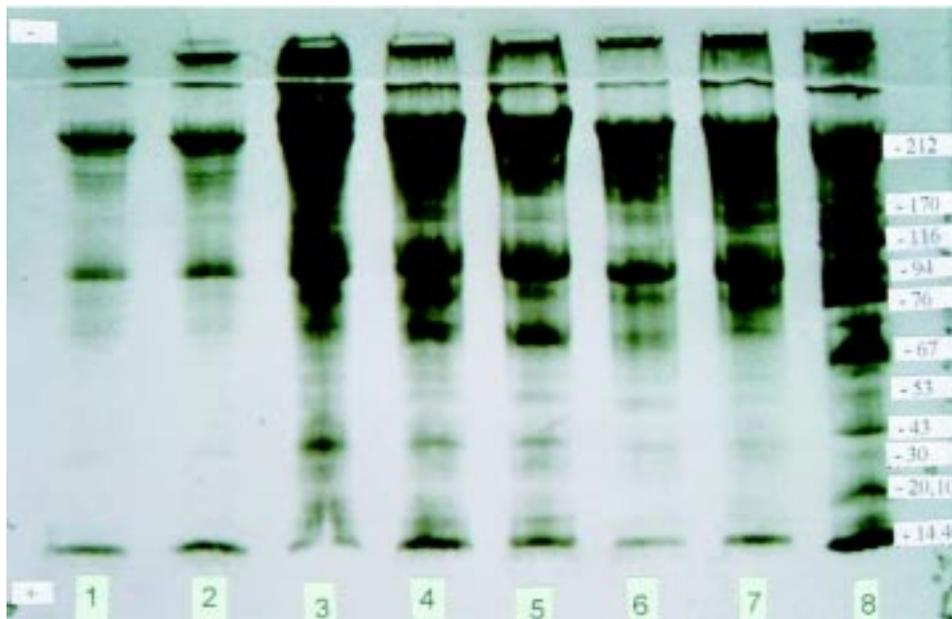
calibração de pesos moleculares, composto das seguintes proteínas: miosina (212 Kd),  $\alpha_2$ -macroglobulina (170 Kd), b-galactosidase (116 Kd), fosforilase (94 Kd), transferrina (76 Kd), desidrogenase glutâmica (53 Kd), albumina sérica bovina (67 Kd), ovoalbumina (43 Kd), anidrase carbônica (30 Kd), inibidor de tripsina (20 Kd) e a-lactoalbumina (14,4 Kd). Após a corrida, os géis foram corados com prata, de acordo com as especificações do fabricante. Após a coloração de fixação, os géis foram digitalizados e escaneados no sistema de fotodocumentação VDS-Pharmacia.

Na análise estatística utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com os tratamentos em esquema fatorial, formados pelas combinações de 3 níveis de subespécie (africanizadas e suas híbridas, italianas e cárnicas), 2 tratamentos (com e sem pólen) e 4 períodos (recém-emergidas, 12, 18 e 24 dias de idade), com uma repetição, de modo que o resí-

duo utilizado para a anova, foi a interação de 3ª ordem entre os fatores. A comparação das médias foi realizada pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância (COCHRAN e COX, 1957; SOKAL e ROHLF, 1985).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise dos géis contendo a hemolinfa de abelhas recém-emergidas, observou-se um total de 27 bandas, distribuídas em proteínas de alto, médio e baixo pesos moleculares. A maior concentração de proteínas de alto peso molecular localiza-se acima de 200 Kd. Estas bandas são mais evidentes, principalmente, nas cárnicas e africanizadas. Com valores entre 100 e 150 Kd, as bandas estão distribuídas nos três tipos de abelhas, e com valores entre 60 e 80 Kd, as maiores concentrações estão nas italianas (Figura 1).



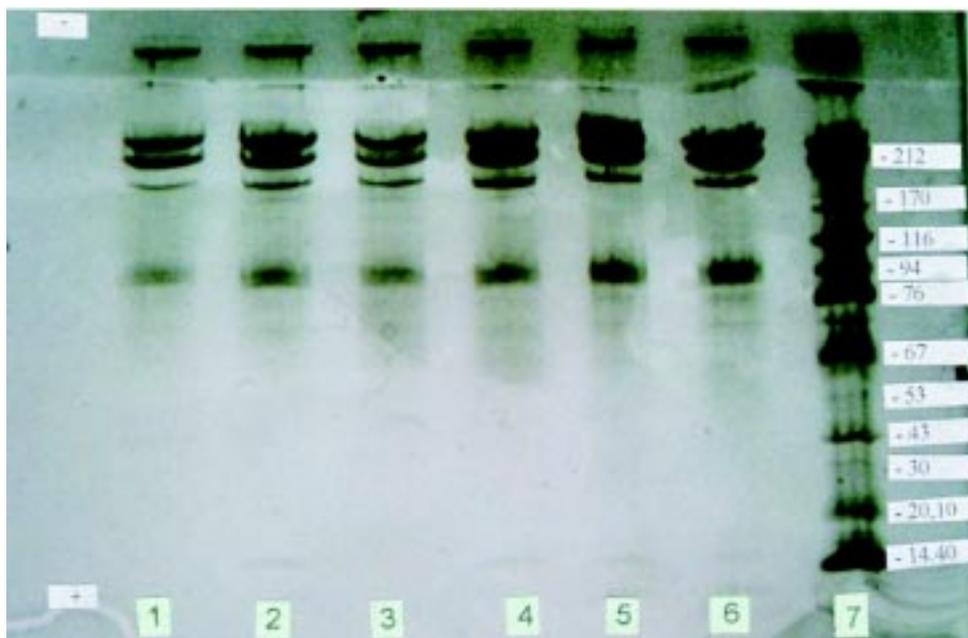
**Figura 1.** Eletroferograma de hemolinfa de abelhas operárias recém-emergidas (*Apis mellifera* L.) com zero dia de idade, obtido em eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS, gradiente 8 a 25% de concentração (PhastGel 8-25, Pharmacia), corada com prata. Aplicações: 1 e 2 = africanizadas sem pólen (s/p); 3 = africanizadas com pólen (c/p); 4 e 5 = cárnicas s/p e c/p; 6 e 7 = italianas s/p e c/p; 8 = padrão de peso molecular

Aos doze dias de idade, o número de bandas diminui para 15, concentrando-se nas bandas de proteínas de alto peso molecular, para todos os tratamentos, correspondendo, a valores entre 170 e 200 Kd. Também como característica deste período, aparecem bandas ao redor de 75 Kd, e praticamente não aparecem proteínas de baixo peso molecular, como na fase mais juvenil da abelha adulta (Figura 2).

Já aos dezoito de idade, o número de bandas passa para 17 e mantém-se a concentração das bandas de proteínas de alto peso para todos os tratamen-

tos, enquanto que as bandas de proteínas de baixo peso molecular desaparecem.

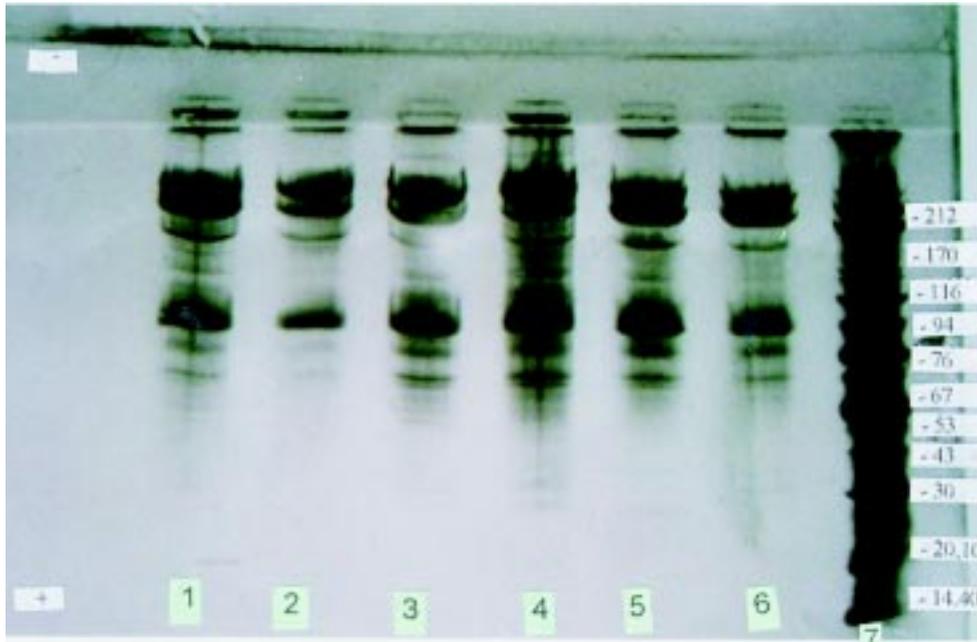
Aos vinte e quatro dias de idade, já com abelhas mais velhas, o número de bandas mantém-se em 17 e com valores de proteínas de alto peso molecular (Figura 3). Estes valores não concordam com os de GLINSKI e JAROSZ (1985) e OTANI *et al.*, (1985), que encontraram pesos moleculares variando entre 14 e 94 Kd e 24 e 76 Kd respectivamente para proteínas da hemolinfa. No entanto, quanto ao número de frações na hemolinfa, GLINSKI e JAROSZ (1985), relatam 27 bandas em pupas jovens, concordando com os presentes dados.



**Figura 2.** Eletroferograma de hemolinfa de abelhas operárias adultas (*Apis mellifera* L.) aos doze dias de idade, obtido em eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS, gradiente 8 a 25% de concentração (PhastGel 8-25, Pharmacia), corado com prata. Aplicações: 1 e 2 = africanizadas (s/p) e (c/p); 3 e 4 = cárnicas (s/p) e (c/p); 5 e 6 = italianas (s/p) e (c/p); 7 = padrão de peso molecular

Quanto à concentração total de proteínas, ocorre uma diminuição com o decorrer da idade das abelhas, de recém-emergida aos dezoito dias de vida, e volta a subir em abelhas de vinte quatro dias. Algumas proteínas se alteram e outras são semelhantes

ao longo do período. Este fato pode ser explicado pelo aumento na concentração das bandas de médio peso molecular. Dados semelhantes são descritos por ARBUTHNOT *et al.*, (1983) trabalhando com lipoproteínas em abelhas africanas (*Apis mellifera*



**Figura 3.** Eletroferograma de hemolinfa de abelhas operárias adultas (*Apis mellifera* L.) aos vinte e quatro dias de idade, obtido em eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS, gradiente 8 a 25% de concentração (PhastGel 8-25, Pharmacia), corado com prata. Aplicações: 1 e 2 = africanizadas (s/p) e (c/p); 3 e 4 = cárnicas (s/p) e (c/p); 5 e 6 = italianas (s/p) e (c/p); 7 = padrão de peso molecular

*adansonii*), não encontrando, no entanto, este aumento em abelhas mais velhas.

Pela análise estatística, observa-se que não houve influência dos tratamentos sobre a hemolinfa de abelhas de diferentes idades. Em relação aos tratamentos é possível, que mesmo com a restrição ao acesso ao pólen, foi praticamente impossível impedir plenamente sua entrada na colônia. Outro fator que pode estar associado é a quantidade de proteína disponível no tratamento, que pode ter sido insuficiente para ser detectada nas análises.

A média da concentração total de proteínas foi estatisticamente diferente entre as abelhas africanizadas e suas híbridas, italianas e cárnicas e entre os períodos ( $p < 0,05$ ) (Quadros 1 e 2).

**Quadro 1.** Média da concentração total de proteínas (ng) obtida por densitometria, na hemolinfa de abelhas operárias adultas (*Apis mellifera* L.) africanizadas e suas híbridas italianas e cárnicas, submetidas à produção de geléia real

Italianas	Cárnicas	Africanizadas
116,37b <sup>(1)</sup>	149,37a	123,37b

CV = 10,51%

DMS (5%) = 20,73 pelo Teste de Tukey.

Média geral = 129,70

Desvio padrão geral = 13,51

<sup>(1)</sup>Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si

**Quadro 2. Média da concentração total de proteínas (ng), obtida por densitometria, em diferentes idades, na hemolinfa de abelhas operárias adultas (*Apis mellifera* L.) africanizadas e suas híbridas italianas e cárnicas, submetidas à produção de geléia real**

Recém-emergida	12 dias	18 dias	24 dias
182,00a <sup>(1)</sup>	96,66c	90,83c	149,33b

CV = 10,51%

DMS (5%) = 27,03 pelo Teste de Tukey.

Desvio padrão geral = 13,51

<sup>(1)</sup>Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

a) O padrão eletroforético na hemolinfa de abelhas adultas recém-emergidas apresenta 27 bandas, e está distribuído uniformemente entre proteínas de baixo, médio e alto peso molecular.

b) As proteínas de baixo peso molecular da hemolinfa desaparecem com o avanço da idade das abelhas operárias, e estabilizam-se as de médio e alto peso molecular.

c) As maiores médias na concentração total de proteínas na hemolinfa foram apresentadas pelas abelhas híbridas cárnicas.

d) Os tratamentos nos níveis utilizados neste trabalho não evidenciaram diferenças nos tratamentos sobre a concentração total de proteínas na hemolinfa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARBUTHNOT, P.B., CANTRILL, R.C., HEPBURN, H.R. An electrophoretic characterization of african worker honeybee haemolymph proteins during development. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 74, p. 467-71, 1983.
- BOUNIAS, M. Les protéines de l'hémolymph de l'abeille (*Apis mellifera mellifera* L.). II. Adultes butineuses et hivernantes. *Apidologie*, Paris, v. 6, p. 219-232, 1975.
- COCHRAN, W.G., COX, G.M. *Experimental designs*. 2. ed. New York: John Wiley and Sons, 1957. 617 p.
- DOOLITTLE, G.M. *Scientific queen-rearing*. Chicago: T.G.Newman, 1899
- FOTI, N., POPA, L., CRISSAN, I. Variability of the protein components of the haemolymph in honeybees, in accordance with age, season and activity. *Apicultural, Romanian*, v. 22, p.11-17, 1969.
- GILLIAM, M., JACKSON, K.K. Proteins of developing worker honey bees, *Apis mellifera*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 65, p.516-517, 1972.
- GLINSKI, Z., JAROSZ, J. Alterations in haemolymph proteins of drone honey bee larvae parasitized by *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, Paris, v. 15, p.329-338, 1984.
- GLINSKI, Z.F., JAROSZ, J. Distribution of protein fractions in the blood of worker brood of *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.*, Bucharest, v. 24, p. 80-85, 1985.
- GLINSKI, Z., JAROSZ, J. Electrophoretic pattern of cathodal protein fractions in blood of worker adult bees, *Apis mellifera*. *Polskie Arch. Wet.*, Warsaw, v. 26, p.107-16, 1986.
- LENSKY, Y. Haemolymph proteins of the honey bee. II. Differentiation during the development of bee worker. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 39, p.335-341, 1971.
- LENSKY, Y. Circulation et organes annexes. *In: Traité de Biologie de L'abeille – Biologie et Physiologie Générales*. Paris : Masson Et Cie., 1968. v.1, p.475-498.
- MESTRINER, M.A. Polimorfismo protéico em sistema haplodiplóide (*Apis mellifera* L. 1758). São Paulo: Universidade de São Paulo, 1970. 70 f. Tese de Doutorado.
- OTANI, H., OYAMA, M., TOKITA, F. Polyacrylamide gel electrophoretic and immunochemical properties of proteins in royal jelly. *Jap. J. Dairy and Food Sci.*, Japan, v. 34, p.21-25, 1985.
- SNODGRASS, R.E., ERICKSON, E.H. The anatomy of the honey bee. *In: The hive and the honey bee*. 5. Ed. Hamilton: Dadant & Sons, 1992. p.103-169.
- SOKAL, R.R., ROHLF, F.J. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 2. ed. New York: W.H. Freeman, 1985. 859 p.
- VILLELA, G.G., BACILA, M., TASTALDI, H. *Técnicas e Experimentos de Bioquímica*. Rio de Janeiro: Koogan, 1973. 398 p.