

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS-MG  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS  
APLICADAS À SAÚDE  
Área de Concentração: Neurociências e Comportamento

JOSEANA VIEIRA

**Biologia molecular da morfogênese diferencial inicial do cérebro em  
castas de abelhas *Apis mellifera***

Alfenas/MG

2020

JOSEANA VIEIRA

**Biologia molecular da morfogênese diferencial inicial do cérebro em  
castas de abelhas *Apis mellifera***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Bióciências Aplicadas à Saúde como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de Doutora pela  
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG.  
Orientador: Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk.

Alfenas/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de  
Alfenas

Vieira, Joseana.  
V658b Biologia molecular da morfogênese diferencial inicial do cérebro em  
castas de abelhas *Apis mellifera* / Joseana Vieira - Alfenas/MG, 2020.  
147f. : il. –

Orientador: Angel Roberto Barchuk.  
Tese (Doutorado em Biociências aplicadas à Saúde) - Universidade  
Federal de Alfenas, 2020.  
Bibliografia.

1. Morfogênese. 2. *Apis mellifica*. 3. Cérebro. 4. Expressão Gênica. 5.  
MicroRNAs. I. Barchuk, Angel Roberto. II. Título.

CDD-591.3

JOSEANA VIEIRA

BIOLOGIA MOLECULAR DA MORFOGÊNESE DIFERENCIAL INICIAL DO  
CÉREBRO EM CASTAS DE ABELHAS APIS MELLIFERA

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovada em: 02 de março de 2020

Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
– UNIFAL-MG

Prof. Dr. Marcos Vinicios Salles Dias  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
– UNIFAL-MG

Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes  
Instituição: Universidade federal de São Carlos  
– UFSCAR

Prof. Dr. Pedro Augusto da Pos Rodrigues  
Instituição: Instituto Federal do Sul de Minas  
Gerais IFSULDEMINAS

Profa. Dra. Juliana Ramos Martins  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
– UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Angel Roberto Barchuk, Presidente**, em 02/03/2020, às 13:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Augusto Da Pos Rodrigues, Usuário Externo**, em 02/03/2020, às 13:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Ramos Martins, Técnico Administrativo em Educação**, em 02/03/2020, às 13:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **FRANCIS DE MORAIS FRANCO NUNES, Usuário Externo**, em 02/03/2020, às 13:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Vinicios Salles Dias, Professor do Magistério Superior**, em 02/03/2020, às 13:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0263240** e o código CRC **C8982CB8**.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela força de me permitir chegar até o fim desse projeto diante de diversos obstáculos no caminho.

Agradeço aos meus pais; por me apoiarem e me incentivarem a sempre buscar o máximo de conhecimento. Obrigada por abdicarem de tantas coisas para que eu pudesse chegar neste momento.

Agradeço a minha irmã que sempre foi alegria nos momentos de desespero ao longo de todo o caminho.

Agradeço ao meu companheiro de vida Adriano, que acompanhou de perto cada passo do meu doutorado me incentivando e acolhendo com tanto carinho nos momentos de dúvidas e incertezas e foi meu maior incentivador durante todo o doutorado.

Agradeço aos meus amigos, não me atreverei a citar nomes temendo falha da memória, que acreditaram mais em mim que eu mesma, e sempre foram fonte de conforto para os momentos difíceis.

Agradeço em especial, aos amigos abelhudos da Unifal e da USP que me incentivaram, ajudaram e participaram de cada experimento no apiário e no laboratório e compartilharam de conhecimentos, força, apoio e alegrias.

Agradeço imensamente meu orientador. Roberto, que sempre foi uma inspiração para continuar nesse caminho de tanto trabalho e dedicação. Admiro muito seu trabalho como pesquisador e, principalmente, como orientador, tratando seus orientados com o máximo de humanidade possível e não nos deixando desistir. Obrigada pelos mais de 10 anos de parceria e dedicação à minha carreira.

Agradeço aos professores Dr. Klaus Hartfelder, Dra. Zilá Simões e Dra. Márcia Bitondi por terem contribuído me acolhendo em Ribeirão e oferecendo todo o suporte de seus laboratórios para que fosse possível a conclusão deste trabalho.

Agradeço as professoras Dra. Lívia Moda e Dra. Flávia Freitas que participaram da minha formação desde a Iniciação Científica e participaram ativamente nos experimentos realizados no meu doutorado, me ajudando no planejamento e execução das imunossucessões e validações das interações miRNA-mRNA.

Agradeço aos técnicos Luiz Aguiar, Marcela Laure, Dra. Juliana Martins e Dra. Vera Lúcia Castelo Figueiredo que ofereceram apoio, conhecimentos científicos e ajuda na obtenção de amostras durante a realização dos experimentos.

Agradeço a secretária Adriana Pereira por toda dedicação e cuidado com as atividades da Pós-graduação, em especial ao me ajudar durante meu processo de trancamento e retorno ao doutorado, sendo profissional e amiga ao mesmo tempo.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, Prof. Dr. Valdemar Paffaro Jr., por todo o suporte e investimento na carreira dos alunos deste programa.

Agradeço a Universidade Federal de Alfenas, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde e ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da UNIFAL-MG por proporcionar estrutura necessária para condução deste trabalho.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa de estudos, Auxílio CNPq Processo: 406734/2018-6 e FINEP/PROINFRA 01/2008 pelos recursos financeiros, sem os quais não seria possível a realização deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“O sucesso nasce do querer, da  
determinação e persistência em se chegar a  
um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo,  
quem busca e vence obstáculos, no mínimo  
fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

## RESUMO

O desenvolvimento do cérebro é influenciado por fatores genéticos e ambientais. As larvas de rainhas de abelhas *Apis mellifera* que são alimentadas com grandes quantidades de geleia real, experimentam maior e mais rápido desenvolvimento do cérebro do que as operárias. A hipótese do cérebro social propõe que, evolutivamente, as diferenças de castas nas abelhas foram promovidas por *trade-offs* morfofisiológicos do desenvolvimento em que a casta especializada na reprodução investe no desenvolvimento dos ovários, enquanto que as operárias, não reprodutivas, investem no desenvolvimento do cérebro, o que foi confirmado em *A. mellifera*. Desde o ponto de vista genômico, as espécies de abelhas mais sociais deveriam possuir uma proporção maior de genes neurogênicos, comparada à encontrada no *Homo sapiens*, com espécies solitárias com proporções menores. O difenismo cerebral de *A. mellifera* fica evidente do ponto de vista morfológico a partir do 4º estágio larval, porém, molecularmente, a diferença já está presente no 3º estágio larval (L3). Utilizando seqüenciamento de nova geração (RNA-Seq) identificamos 60 genes diferencialmente expressos (GDEs) nos cérebros de L3, que devem incluir genes primordiais para o desenvolvimento cerebral casta-específico. O presente trabalho objetivou determinar os alcances da participação destes genes na morfogênese diferencial inicial do cérebro entre as castas e testar a hipótese do cérebro social entre 11 espécies de abelhas. As análises comparativas de genes neurogênicos entre estas abelhas (incluindo *A. mellifera*), *Drosophila* e *Homo sapiens* não refletiram uma associação entre proporção destes genes e o nível de socialidade em insetos. Em busca dos determinantes moleculares da morfogênese cerebral diferencial, validamos a expressão de nove GDEs (*amd*, *amci*, *forked*, *hex70b*, *hex70c*, *hex110*, *mas*, *nt-1* e *takeout*) durante o período larval de ambas castas. Para determinar a eventual participação de miRNAs (miRNAs *miR-317*, *miR-34* e *miR-210*) na regulação da expressão desses genes usamos ferramentas *in silico* e ensaios de luciferase. Todos os GDEs estudados respondem a pelo menos um dos miRNAs, exceto *amd*. Ademais, imunolocalizamos o produto proteico do gene *hex110* e observamos que apresenta localização nuclear. Estes resultados mostram que o estabelecimento do dimorfismo cerebral se inicia em L3, momento em que a alimentação das larvas se torna casta-específica, mediante a expressão gênica diferencial regulada pelos miRNAs *miR-317*, *miR-34* e *miR-210*.

Palavras-chave: Morfogênese cerebral. *Apis mellifera*. Cérebro social. Expressão gênica. miRNA.

## ABSTRACT

Brain development is influenced by genetic and environmental factors. The larvae of *Apis mellifera* queens, which are fed with large amounts of royal jelly, experience greater and faster brain development than workers. The social brain hypothesis suggests that, evolutionarily, the differences in castes in bees were promoted by morphophysiological development trade-offs in which the caste specialized in reproduction invests in the development of the ovaries, while the workers, non-reproductive, invest in the development of the brain, which has been confirmed in *A. mellifera*. From a genomic point of view, highly social bee species should have a higher proportion of neurogenic genes, compared to that found in *Homo sapiens*, whereas solitary species should have smaller proportions. The brain dimorphism of *A. mellifera* is evident from the morphological point of view from the 4th larval stage, however, molecularly, the difference is already present in the 3rd larval stage (L3). Using next generation sequencing (RNA-Seq) we identified 60 differentially expressed genes (DEGs) in L3 brains, which must include genes primordial for caste-specific brain development. The present work aimed to determine the scope of the participation of these genes in the initial differential morphogenesis of the brain between the castes and to test the social brain hypothesis among 11 species of bees. Comparative analyses of neurogenic genes among these bees (including *A. mellifera*), *Drosophila* and *Homo sapiens* did not reflect an association between the proportion of these genes and the level of sociality in insects. In search of the molecular determinants of differential brain morphogenesis, we validated the expression of nine DEGs (*amd*, *amci*, *forked*, *hex70b*, *hex70c*, *hex110*, *mas*, *nt-1* and *takeout*) during the larval period of both castes. To determine the possible participation of miRNAs (miRNAs *miR-317*, *miR-34* and *miR-210*) in the regulation of the expression of these genes, we use in silico tools and luciferase assays. All studied DEGs respond to at least one of the miRNAs, except *amd*. In addition, we immunolocalize the protein product of the *hex110* gene and observe that it has a nuclear location. These results show that the establishment of brain dimorphism starts at L3, at which point the larval feed becomes caste-specific, through differential gene expression regulated by miRNAs *miR-317*, *miR-34* and *miR-210*.

Keywords: Brain morphogenesis. *Apis mellifera*. Social brain. Gene expression. miRNA.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Perfis hemolinfáticos dos hormônios ecdisteroides e hormônio juvenil (JH) durante o desenvolvimento pós-embriônico de castas de <i>Apis mellifera</i> .....	21
Figura 2 -	Modelo geral da diferenciação de castas em <i>Apis mellifera</i> .....	22
Figura 3 -	A- Secção frontal do cérebro de operária de <i>A. mellifera</i> corado com azul de toluidina. B- Modelo 3D do cérebro de operária de <i>A. mellifera</i> .....	24
Figura 4 -	.. Cérebros de operárias e rainhas <i>A. mellifera</i> durante a terceira, quarta e quinta fases do desenvolvimento larval.....	27
Figura 5 -	Visão esquemática de uma interação de miRNA com seu mRNA alvo.....	32
Figura 6 -	Concentração de miRNAs em geleias durante o desenvolvimento larval.....	33
Figura 7 -	Rede de interação entre miRNA das geleias real e de operária e os GDEs nos cérebros de rainhas e operárias.....	34
Figura 8 -	Frente e verso de caixa Jenter inserida em quadro limpo.....	42
Figura 9 -	Cúpulas para ovoposição da rainha contendo larvas recém eclodidas (L1) .....	43
Figura 10 -	Realeira artificial.....	43
Figura 11 -	Organização do vetor psiCHECK2.....	55
Figura 12 -	Condições experimentais para o ensaio da luciferase.....	59
Figura 13 -	Genes neurogênicos e totais nas espécies selecionadas.....	61
Figura 14 -	Genes neurogênicos nas espécies selecionadas.....	61
Figura 15 -	Conservação de genes neurogênicos entre as espécies <i>F. varia</i> (Fvar), <i>H. sapiens</i> (Hsap), <i>D. melanogaster</i> (Dmel) e <i>A. mellifera</i> (Amel).....	63
Figura 16 -	.... Estrutura dos 9 genes relacionados à neurogênese selecionados para as análises deste trabalho.....	65

Figura 17 -	Níveis relativos de transcrição de GDEs no cérebro de larvas L3 de rainhas e operárias.....	67
Figura 18 -	Perfil de transcrição dos 9 GDEs encontrados em cérebros de rainhas e operárias de <i>A. mellifera</i> durante o período larval (A-I).....	69
Figura 19 -	Reconstrução tridimensional total de cérebros de abelhas rainhas e operárias em estágio L3 imunolocalizados com anticorpo Hex110/Alexa488, objetiva de 10X.....	73
Figura 20 -	Localização nuclear da proteína Hex110 em cérebro de abelhas em estágio L3.....	74
Figura 21 -	Reconstrução tridimensional total de cérebros de abelhas rainhas e operárias em estágio L4 imunolocalizados com anticorpo Hex110/Alexa488, objetiva de 10X.....	74
Figura 22-	Reconstrução tridimensional total de cérebros de abelhas rainhas e operárias em estágio L4 imunolocalizados com anticorpo Hex110/Alexa488, objetiva de 10X.....	75
Figura 23 -	Nível de miRNAs nos cérebros de rainhas e operárias na fase L3.....	76
Figura 24 -	.... Rede de interação mRNA-miRNA.....	77
Figura 25 -	Representação dos sítios de ligação preditos para os miRNAs <i>miR-317</i> , <i>miR-34</i> e <i>miR-210</i> na 3'UTR do gene <i>amci</i> de <i>A. mellifera</i> e validação de sequências.....	79
Figura 26 -	Representação dos sítios de ligação preditos para miRNAs <i>miR-317</i> , <i>miR-34</i> e <i>miR-210</i> na 3'UTR do gene <i>amd</i> de <i>A. mellifera</i> e validação de sequências.....	80
Figura 27 -	Representação dos sítios de ligação preditos para os miRNAs <i>miR-317</i> , <i>miR-34</i> e <i>miR-210</i> na 3'UTR do gene <i>forked</i> de <i>A. mellifera</i> e validação de sequências.....	81
Figura 28 -	Representação dos sítios de ligação preditos para os miRNAs <i>miR-317</i> , <i>miR-34</i> e <i>miR-210</i> na 3'UTR do gene <i>hex70b</i> de <i>A. mellifera</i> e validação de sequências.....	82
Figura 29 -	Representação dos sítios de ligação preditos para os miRNAs <i>miR-317</i> , <i>miR-34</i> e <i>miR-210</i> na 3'UTR do gene <i>hex70c</i> de <i>A. mellifera</i> e validação das sequências.....	83
Figura 30 -	Representação dos sítios de ligação preditos para o <i>miR-317</i> , <i>miR-34</i> e <i>miR-210</i> na 3'UTR do gene <i>hex110</i> de <i>A. mellifera</i> e validação	

	de sequências.....	84
Figura 31 -	Representação dos sítios de ligação preditos para os miRNAs <i>miR-317</i> , <i>miR-34</i> e <i>miR-210</i> na 3'UTR do gene <i>mas</i> de <i>A. mellifera</i> e validação das sequências.....	85
Figura 32 -	Representação dos sítios de ligação preditos para os miRNAs <i>miR-317</i> , <i>miR-34</i> e <i>miR-210</i> na 3'UTR do gene <i>Neurotrophin1</i> de <i>A. mellifera</i> e validação das sequências.....	86
Figura 33 -	Representação dos sítios de ligação preditos para os miRNAs <i>miR-317</i> , <i>miR-34</i> e <i>miR-210</i> na 3'UTR do gene <i>takeout</i> de <i>A. mellifera</i> e validação das sequências.....	87
Figura 34 -	Validação dos sítios de ligação preditos para o <i>miR-34</i> na 3'UTR pelo ensaio da luciferase.....	90
Figura 35 -	Validação dos sítios de ligação preditos para o <i>miR-210</i> na 3'UTR pelo ensaio da luciferase.....	91
Figura 36 -	Validação dos sítios de ligação preditos para o <i>miR-317</i> na 3'UTR pelo ensaio da luciferase.....	92
Figura 37 -	Rede interação mRNA-miRNA.....	93
Figura 38 -	Esquema proposto para explicar os aspectos moleculares do processo de morfogênese cerebral diferencial no período larval de castas de <i>A. mellifera</i> .....	116

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Características dos genes mais transcritos no cérebro de rainhas em relação ao de operárias.....	29
Quadro 2 -	Características de genes mais transcritos no cérebro de operárias em relação ao de rainhas.....	30
Quadro 3 -	miRNAs enriquecidos entre os GDEs nos cérebros e no genoma de <i>A. mellifera</i> .....	35
Quadro 4 -	Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) de operárias e rainhas de abelhas <i>A. mellifera</i> africanizadas.....	44
Quadro 5 -	Características dos primers utilizados nos experimentos de qPCR.....	46
Quadro 6 -	Características dos primers para os miRNAs selecionados.....	49
Quadro 7 -	Características dos primers para ampliar os fragmentos das 3'UTRs selecionadas.....	52
Quadro 8 -	Proporção do número de genes neurogênicos em relação ao número total de genes nas espécies selecionadas.....	62
Quadro 9 -	Parâmetros obtidos com a curva de eficiência para cada um dos genes selecionados.....	66
Quadro 10 -	Número de sítios preditos para interação entre os três miRNAs (miR-317, miR-34 e miR-210) e o os nove GDEs e fragmentos de 3'UTRs onde estão localizados estes sítios.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR	do inglês, 3' <i>untranslated region</i> – região não traduzida
5' UTR	do inglês, 5' <i>untranslated region</i> – região não traduzida
AL	lóbulo antenal
<i>amci</i>	gene <i>Chymotrypsin inhibitor</i>
<i>amd</i>	gene <i>Alpha-methyl-dopa hypersensitive protein-like</i>
BNDF	fator neurotrófico derivado do cérebro
CA	<i>Corpora allata</i>
Ca	cálice mediano
CB	complexo central
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CC	corpos cogumelares
CG	corpo gorduroso
CK	célula Kenyon
CMG	célula-mãe ganglionar
CO <sub>2</sub>	gás carbônico
Ct	ciclo <i>threshold</i>
<i>Ddc</i>	gene <i>Dopa-decarboxilase</i>
DMEM	meio <i>Dulbecco's Modified Eagle</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNT	neurotrofina de <i>D. melanogaster</i>
E	eficiência da reação
g	grama
GDE	gene diferencialmente expresso
h	hora
HEK293T	células embrionárias do rim humano linhagem 293T
<i>hex110</i>	gene <i>Hexamerina 110</i>
<i>hex70b</i>	gene <i>Hexamerina 70b</i>
<i>hex70c</i>	gene <i>Hexamerina 70c</i>
HJ	hormônio juvenil
INP	progenitores neurais intermediários
JHBP	proteína ligadora de hormônio juvenil

Kb	quilo-base
kDA	quilodalton
L1	1ª fase larval
L2	2ª fase larval
L3	3ª fase larval
L4	4ª fase larval
L5	5ª fase larval
L5F2	5ª fase larval 2ª subfase <i>feeding</i>
LA	lâmina
LB	meio de cultura Luria Bertani
LO	lóbulo óptico
<i>mas</i>	gene <i>Masquerade</i>
MB	corpos cogumelares
ME	medula
min	minuto
<i>miR-210</i>	micro-RNA 210
<i>miR-317</i>	micro-RNA 317
<i>miR-34</i>	micro-RNA 34
miRNA	micro-RNA
mL	mililitro
mRNA	RNA mensageiro
NB	neuroblasto
NES	o sinal de exclusão nuclear
ng	nanograma
NGF	fator de crescimento nervoso
NLS	sinal de localização nuclear
<i>nt-1</i>	gene <i>Neurotrophin</i> isoforma 1
°C	graus Celsius
PARs	receptores ativados por protease
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato-salino
PBST	PBS + 0,5% de Triton X-100
PBST <sub>2</sub>	PBST + 1% de albumina bovina sérica

PCR	reação em cadeia da polimerase
Pe	pedúnculos
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa
Ren	Renilla
RNA	ácido ribonucleico
<i>RpL32</i>	gene <i>Ribossomal protein L32</i>
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
s	segundo
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
Spz	proteína Spätzle
Tm	temperatura de anelamento
UV	ultravioleta
VG	vaga-lume
μg	micrograma
μL	microlitros
μM	micromolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1	Biologia geral e diferenciação de castas de abelhas <i>Apis melífera</i> .....	19
1.2	Neurogênese em <i>A. melífera</i> .....	22
1.3	O cérebro de abelhas como modelo de estudo.....	26
1.4	Nutrição larval e regulação da expressão gênica diferencial por miRNAs.....	31
1.5	Motivação.....	36
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	39
2.1	Objetivo geral.....	39
2.2	Objetivos específicos.....	39
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
3.1	Genômica comparativa de genes neurogênicos clássicos.....	41
3.2	Coleta de amostras.....	42
3.3	Anotação da estrutura dos genes relacionados ao desenvolvimento diferencial do cérebro de larvas L3 de <i>Apis melífera</i> (GDEs).....	45
3.4	Validação dos dados de RNA-Seq e determinação do perfil de transcrição durante o estágio larval por qPCR em tempo real.....	46
3.5	Imunolocalização.....	48
3.6	Escolha dos miRNAs para estudo de interação mRNA-miRNA e determinação do nível de transcrição destes na fase larval L3 de <i>A. mellifera</i>	49
3.7	Teste de elementos de ligação preditos para miRNAs pelo ensaio de gene repórter.....	50
3.7.1	<i>Predição das interações miRNA-mRNAs de A. mellifera envolvidas na neurogênese</i> .....	50
3.7.2	<i>Desenho de primers específicos para a amplificação das regiões 3'UTRs selecionadas para o ensaio de luciferaseI</i> .....	51
3.7.3	<i>Transfecção em células HEK293T em cultivo</i> .....	57
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	60
4.1	Genes neurogênicos clássicos.....	60
4.2	Organização de genes relacionados ao desenvolvimento diferencial do cérebro de larvas L3 de <i>Apis melífera</i> .....	63
4.3	Validação dos níveis de transcrição dos GDEs selecionados e perfil de transcrição no período larval em <i>A. melífera</i> .....	66
4.3.1	<i>Validação dos níveis de transcrição dos GDEs selecionados</i> .....	66
4.3.2	<i>Perfil de transcrição de GDEs no cérebro de larvas de rainhas e operárias</i> ....	68
4.4	Localização da proteína Hex110 em cérebro de larvas de rainhas e operárias..	71
4.5	Identificação de interações miRNA-mRNA alvo.....	75
4.5.1	<i>Determinação dos níveis de microRNAs em cérebros de rainhas e operárias</i> ..	75
4.5.2	<i>Redes de interação miRNAs-mRNAs e validação de sítios de ligação</i> .....	76

4.5.3	<i>Validação das interações mRNA-miRNA mediante o ensaio da luciferase.....</i>	88
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	94
5.1	Genes neurogênicos clássicos e a evolução da socialidade.....	94
5.2	Expressão gênica diferencial e a morfogênese do cérebro larval em castas de abelhas.....	95
5.2.1	<i>ALPHA-METHYLDOPA HYPERSENSITIVE PROTEIN-LIKE (AMD).....</i>	96
5.2.2	<i>MASQUERADE (MAS) E CHYMOTRYPSIN INHIBITOR (AMCI).....</i>	98
5.2.3	<i>NEUROTROFINA-1.....</i>	100
5.2.4	<i>FORKED.....</i>	102
5.2.5	<i>TAKEOUT.....</i>	104
5.2.6	<i>HEXAMERINAS.....</i>	106
5.3	A regulação da expressão diferencial de mRNAs por miRNAs e a morfogênese do cérebro larval em castas de abelhas.....	110
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	115
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	117
	<b>APÊNDICE A - EXPERIMENTOS LET-7.....</b>	139
	<b>APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO.....</b>	142

## 1 INTRODUÇÃO

Nos tópicos apresentados abaixo encontra-se uma introdução, com base em revisão da literatura acerca do tema discutido no trabalho. Tal revisão permitirá ter uma visão geral do assunto, proporcionando um melhor entendimento.

### 1.1 Biologia geral e diferenciação de castas de abelhas *Apis mellifera*

As abelhas *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) constituem colônias com sistemas altamente eficientes de divisão do trabalho (WILSON, 1971, 2008) e possuem memória bem desenvolvida e alta capacidade de aprendizado, além de um sistema de orientação espacial sofisticado (MENZEL, 1985; MENZEL; GREGGERS; HAMMER, 1993; HORRIDGE, 2009; SRINIVASAN, 2011).

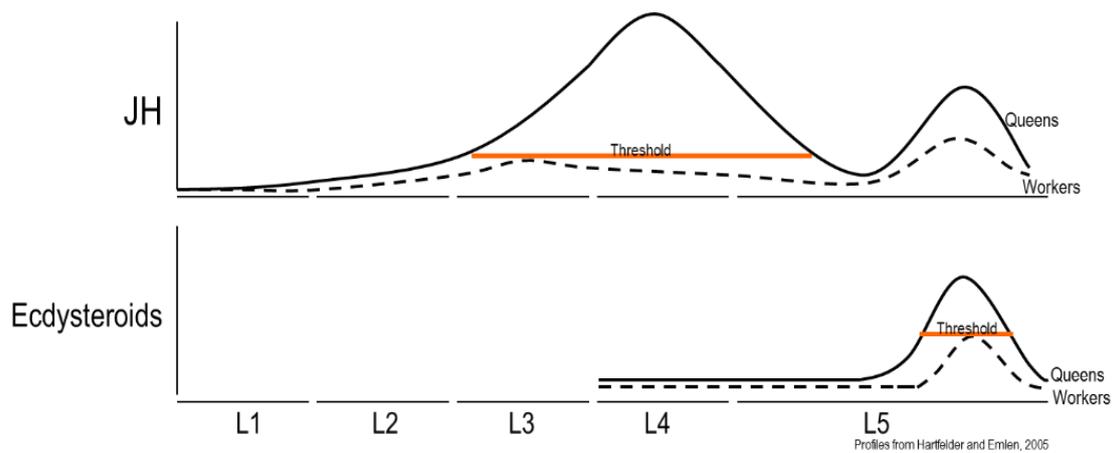
O ciclo de vida de *A. mellifera*, um inseto holometábolo, passa pelos estágios embrionário, larval, pupal e adulto. A rainha faz a postura do ovo, o qual abriga um embrião que leva 72 horas para se desenvolver e chegar ao estágio larval. As larvas eclodem do ovo, e iniciam um período de alimentação intensa e crescimento corporal. Nesse estágio ocorrem quatro mudas que determinam as cinco fases larvais (L1, L2, L3, L4 e L5). Com uma quinta muda (metamórfica) inicia-se o estágio pupal, no qual não há alimentação. No período pupal, o indivíduo em desenvolvimento utiliza a reserva nutricional, que foi obtida no estágio anterior, para a modificação dos tecidos larvais que os tornam tecidos adultos.

Estas abelhas se classificam como eussociais, por haver sobreposição de gerações e desempenharem funções específicas em sua fase adulta, como cuidado cooperativo da prole e divisão do trabalho reprodutivo (WILSON, 1971). A rainha faz postura de ovos fecundados, diploides ( $2n = 32$ ), que originam larvas fêmeas que se desenvolvem em rainhas ou operárias, bem como alguns ovos não fertilizados, haploides ( $n = 16$ ), que se desenvolvem em zangões, único tipo de macho da colônia (WINSTON, 1987). Até a terceira fase larval (L3), as fêmeas são todas alimentadas com geleia real, substância secretada pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares de

operárias adultas jovens (PIERRE, 1981). Dessa fase em diante, inicia-se a alimentação casta-específica que permite o surgimento de organismos, sistemas nervosos e comportamentos diferentes a partir do mesmo genoma (polifenismo). Uma larva selecionada para se desenvolver em rainha recebe grandes quantidades de geleia real. Em contraposição, as larvas escolhidas para ser operárias são alimentadas com “geleia de operária”, que consiste em alimento composto por geleia real, mel e pólen (MICHENER, 1969). As rainhas em desenvolvimento, além de receberem maior quantidade de alimento, possuem uma dieta mais homogênea do que a de operárias, devido à grande quantidade de proteínas específicas da geleia real (principalmente *major royal jelly proteins*, que correspondem a 90% das proteínas constituintes desta geleia; DRAPEAU et al., 2006, KAMAKURA 2011), com maior teor de açúcares (LEIMAR et al., 2012) e diferentes quantidades de outras substâncias, como minerais, vitaminas e miRNAs (GUO et al., 2013; ASHBY et al., 2016; WANG et al., 2016; MALESZKA, 2018).

A alimentação diferencial de larvas jovens desencadeia uma resposta endócrina importante, cuja característica marcante é a notável diferença nos títulos de hormônio juvenil (HJ) na hemolinfa, sintetizado pelos *Corpora allata* (CA), um par de glândulas localizadas no complexo retrocerebral (NIJHOUT; WHEELER, 1982; WHEELER, 1986; RACHINSKY; HARTFELDER, 1990; HARTFELDER; ENGELS, 1998). Os níveis desiguais de HJ (Figura 1), impulsionam as larvas que originarão cada casta (rainhas e operárias) a seguir linhas distintas de desenvolvimento, pela ativação de diferentes redes gênicas (Figura 2), ou seja, a distinção entre rainhas e operárias não é genética, e sim resultado de ativação de diferentes vias de desenvolvimento (LINKSVAYER et al., 2011; CHEN et al., 2012). Os títulos de HJ são mais elevados em rainhas no período que compreende a terceira e o início da quinta fase larval (RACHINSKY et al., 1990; HARTFELDER; ENGELS, 1998).

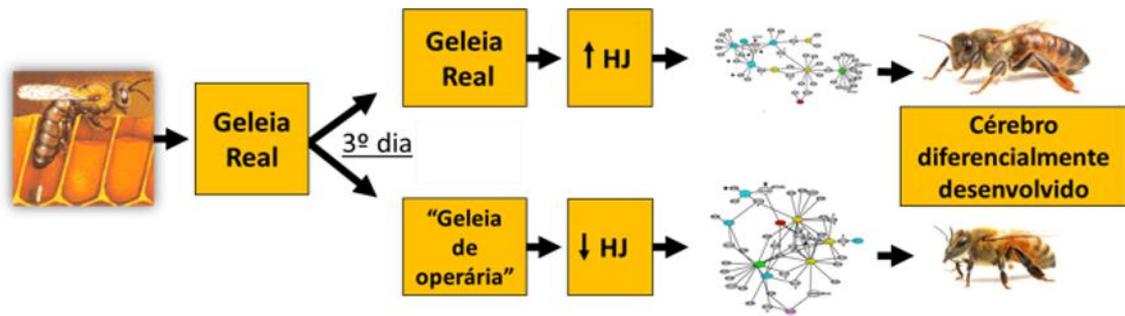
Figura 1. Perfis hemolinfáticos dos hormônios ecdisteroides e hormônio juvenil (JH) durante o desenvolvimento pós-embrionário de castas de *Apis mellifera*.



Fonte: BARCHUK et al., 2007.

A diferença nos títulos de HJ determinam alterações no padrão de desenvolvimento de *A. mellifera*, como maior crescimento corporal da larva ou de alguns órgãos, especialmente dos ovários, e o não desenvolvimento de estruturas específicas, como a corbícula (BARCHUK et al., 2007; BOMTORIN et al., 2012; MEDVED; HUANG; POPADIC, 2014). Ademais, o HJ parece controlar a amplificação do desenvolvimento neural, principalmente dos corpos cogumelares, resultando cérebros proporcionalmente maiores em rainhas quando comparado aos de operárias em um mesmo estágio larval (MODA et al., 2013). Em resumo, rainhas e operárias se originam a partir de ovos fertilizados e recebem alimentação em diferentes quantidades e composição nutricional durante o período larval, o que desencadeia a ativação de diferentes vias de desenvolvimento reguladas epigeneticamente (KUCHARSKI et al., 2008; MALESZKA, 2014; MALESZKA; MASON; BARRON, 2014).

Figura 2. Modelo geral da diferenciação de castas em *Apis mellifera*.



Fonte: Modificado de BARCHUK et al., 2007.

Nota: As larvas de 3º dia (L3) recebem alimentação diferencial, que levam a síntese de quantidades diferente de hormônio juvenil (HJ). Os diferentes títulos de HJ ativam diferentes genes resultando nos dois fenótipos das castas femininas de *A. mellifera*.

## 1.2 Neurogênese em *A. mellifera*

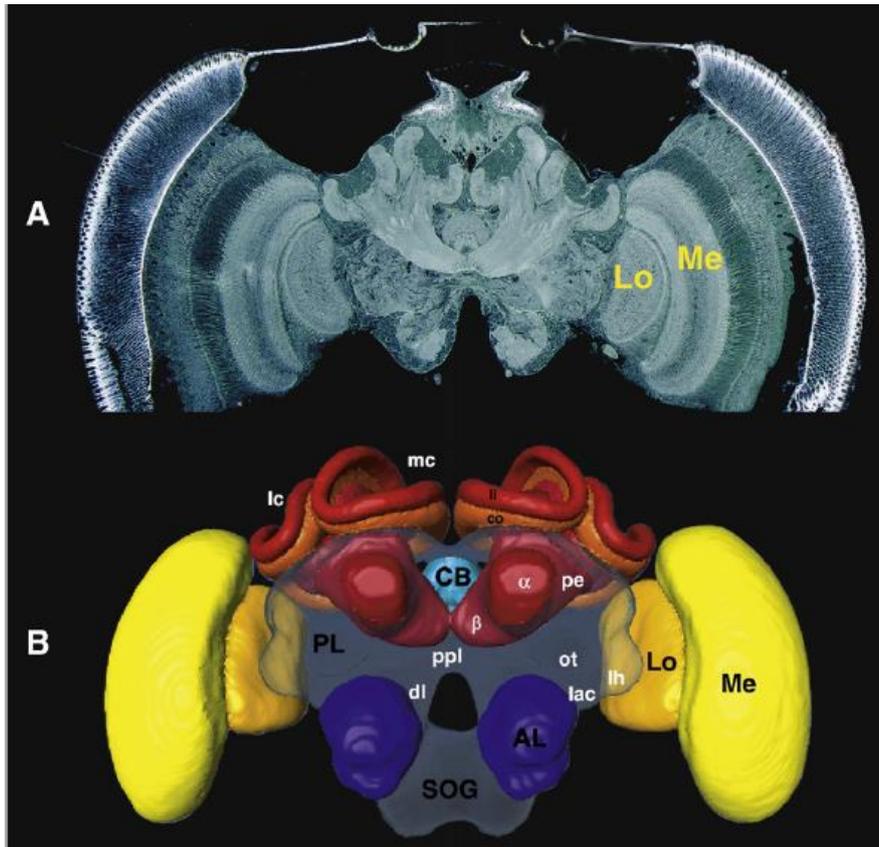
O sistema nervoso das abelhas é formado por um grande gânglio cefálico, o cérebro, que se localiza acima do gânglio subesofágico, e um longo cordão nervoso ventral com três gânglios no tórax e oito no abdômen, todos unidos (SNODGRASS, 1935; NIVEN; GRAHAM; BURROWS, 2008). Em embriões de insetos, o cérebro é diferenciado a partir da ectoderme da cabeça embrionária e os gânglios corporais são gerados a partir do cume da neuro-ectoderme (SNODGRASS, 1984). O cérebro de abelhas adultas é composto por 1 milhão de neurônios e seus neurópilos. A arquitetura dos neurópilos é composta de neurônios, seus processos e células gliais. Estes abrangem de três regiões principais do cérebro: o protocérebro, deutocérebro e o tritocérebro (Figura 3).

O deutocérebro abriga os lóbulos dorsais e os antenais, os quais contêm, aproximadamente, 160 glomérulos e recebem informações sensoriais dos receptores olfativos das antenas. A partir dos lobos dorsais, principalmente, são projetadas as fibras mecanossensoriais (SUZUKI, 1975; SNODGRASS, 1984). O tritocérebro é composto por dois lóbulos laterais, relativamente pequenos, na base do cérebro. Tais lóbulos são conhecidos por terem conexões sensoriais e motoras com o aparelho bucal e o trato digestivo, sendo adjacentes ao gânglio subesofágico, um interruptor entre o cérebro e o cordão nervoso ventral (MOBBS, 1982). O protocérebro contém os lóbulos ópticos, o

complexo central e um par de corpos cogumelares. Os lóbulos ópticos recebem e processam informação sensorial a partir dos olhos compostos. O sistema que percebe estímulos químicos é representado pelos lóbulos antenais posicionados ventralmente aos lóbulos do protocérebro. As saídas principais dos lóbulos antenais para o cérebro central dão-se por neurônios de projeção, visando os corpos cogumelares e um subcompartimento do protocérebro, o corno lateral (BRANDT et al., 2005). O complexo central conecta e coordena a informação de ambos os hemisférios cerebrais e está supostamente envolvido no controle motor. Ele compreende um grupo de neurópilas no centro do cérebro, sendo formado pela ponte protocerebral e o corpo central. O corpo central, por sua vez, é subdividido em superior, inferior e um par de nódulos (STRAUSS, 2002).

Os corpos cogumelares são estruturas pares, localizadas simetricamente em cada lado do protocérebro e descritas como sendo o centro da base neural para processamento e armazenamento da informação olfativa (DAVIS, 2001; GERBER; TANIMOTO; HEISENBERG, 2004), estando também envolvidas em outras formas de aprendizado (LIU et al., 1999; MIZUNAMI; WEIBRECHT; STRAUSFELD, 1993). Cada corpo cogumelar é formado por aproximadamente 170.000 células Kenyon, neurônios intrínsecos dessa estrutura (KENYON, 1896). As suas arborizações dendríticas originam neurópilas dispostas concêntricamente formando os cálices medial e lateral. Cada cálice é dividido em três subcompartimentos: o lábio, onde a informação olfativa é recebida; o colar, que recebe informações visuais; e o anel basal em camadas, onde as entradas visuais e olfativas convergem (RYBAK; MENZEL, 1998; STRAUSFELD, 2002). Projeções axonais das células de Kenyon originárias dos cálices formam o pedúnculo e os lobos vertical e medial dos copos cogumelares (STRAUSFELD, 2002).

Figura 3. A- Secção frontal do cérebro de operária de *A. mellifera* corado com azul de toluidina. B- Modelo 3D do cérebro de operária de *A. mellifera*.



Fonte: MALESZKA et al., 2009; BRANDT et al., 2005.

Nota: O protocérebro contém os lóbulos ópticos, a lâmina (La), a medula (Me) e o lóbulo (Lo), um par de corpos cogumelares (MB) e o complexo central (CB). Cada corpo cogumelar consiste em um cálice lateral e um cálice mediano (Ca), os quais são conectados aos lóbulos  $\alpha$  ( $\alpha$ ) e  $\beta$  ( $\beta$ ) pelo pedúnculo. O lóbulo antenal (AL) é parte do deutocérebro, o qual contém o lobo dorsal (não mostrado). O tritocérebro (não mostrado) é composto por dois pequenos lóbulos laterais na base do cérebro.

A estrutura dos corpos cogumelares é primeiramente determinada pela morfologia das células Kenyon (CK) (KENYON, 1896; MOBBS, 1982). Em *A. mellifera*, três tipos de células Kenyon podem ser facilmente identificadas, de acordo com o tamanho e localização de seus corpos celulares. Suas subpopulações se dividem segundo o estímulo sensorial de entrada: visual, olfativo e mecanossensorial (MOBBS, 1982). Cada uma dessas subpopulações é gerada em períodos distintos do desenvolvimento dos corpos cogumelares (FARRIS; SINAKEVITCH, 2003; MODA et al., 2013).

O desenvolvimento do sistema nervoso de *A. mellifera* inicia-se 44 h após a fertilização (FLEIG; SANGER, 1986). Dois nervos longitudinais se estendem ao longo do lado ventral da banda germinativa embrionária, formando o cordão nervoso ventral. No encéfalo, inicia-se a formação de três proeminências: deutocérebro, protocérebro e tritocérebro (compostos por neurópilos) a partir de uma região proliferativa da ectoderme (NELSON, 1915; DU PRAW, 1967; FLEIG; SANGER, 1986). Os progenitores de neurônios e células gliais são os neuroblastos (NBs) (WHEELER, 1891), que se dividem em dois grupos, tipos I e II. Os NBs tipo I se dividem de forma assimétrica e dão origem a outro NB - em um processo denominado auto-renovação - e a uma célula menor, chamada célula-mãe ganglionar (CMG). A CMG está determinada a se diferenciar em um neurônio e uma célula glial. Os NBs de tipo II também podem se auto-renovar ou podem formar progenitores neurais intermediários (INPs), que dão origem a CMGs (BOONE; DOE, 2008; HOMEM; REPIC; KNOBLICH, 2015; ALTENHEIN, 2015; KONISZEWSKI et al., 2016).

A proliferação neural nos corpos cogumelares inicia-se na primeira fase larval, pela divisão celular simétrica de neuroblastos (MALUN, 1998; FARRIS et al., 1999). Nas fases L1 e L2 de *A. mellifera* é possível observar dois grupos de NBs claros (centro de proliferação de CKs) por hemisfério (MALUN, 1998; FARRIS et al., 1999). Os dois grupos estão delimitados por uma fina camada de CMGs (HÄHNLEIN; BICKER, 1997). Nestas fases ainda não é possível observar cálices, lóbulos e pedúnculos. Da terceira fase larval até a metamorfose, os clusters de NB sofrem um aumento constante no volume e no número de células, incluindo alguns CMG dispersos. Esses dois tipos de células em proliferação são responsáveis por dar origem à organização do cérebro. Assim, na terceira fase larval, é possível identificar a primeira manifestação de ramificações do neurópilo peduncular, indicando a diferenciação das primeiras CKs. Isso é claramente visto a partir da quarta fase larval em diante.

As CMGs com fusos mitóticos aparecem primariamente nos limites exteriores de cada grupo de neuroblastos, aparentemente movendo-se para a superfície do grupo antes de se dividirem para produzir duas células Kenyon. Conforme a neurogênese procede, mais CMGs migram para a superfície do grupo e dividem-se e as novas células Kenyon deslocam as células nascidas anteriormente para longe do centro. As células Kenyon movem-se, de maneira preferencial, dorsalmente e externamente, como uma consequência das diferentes posições dos grupamentos de neuroblastos relativas à

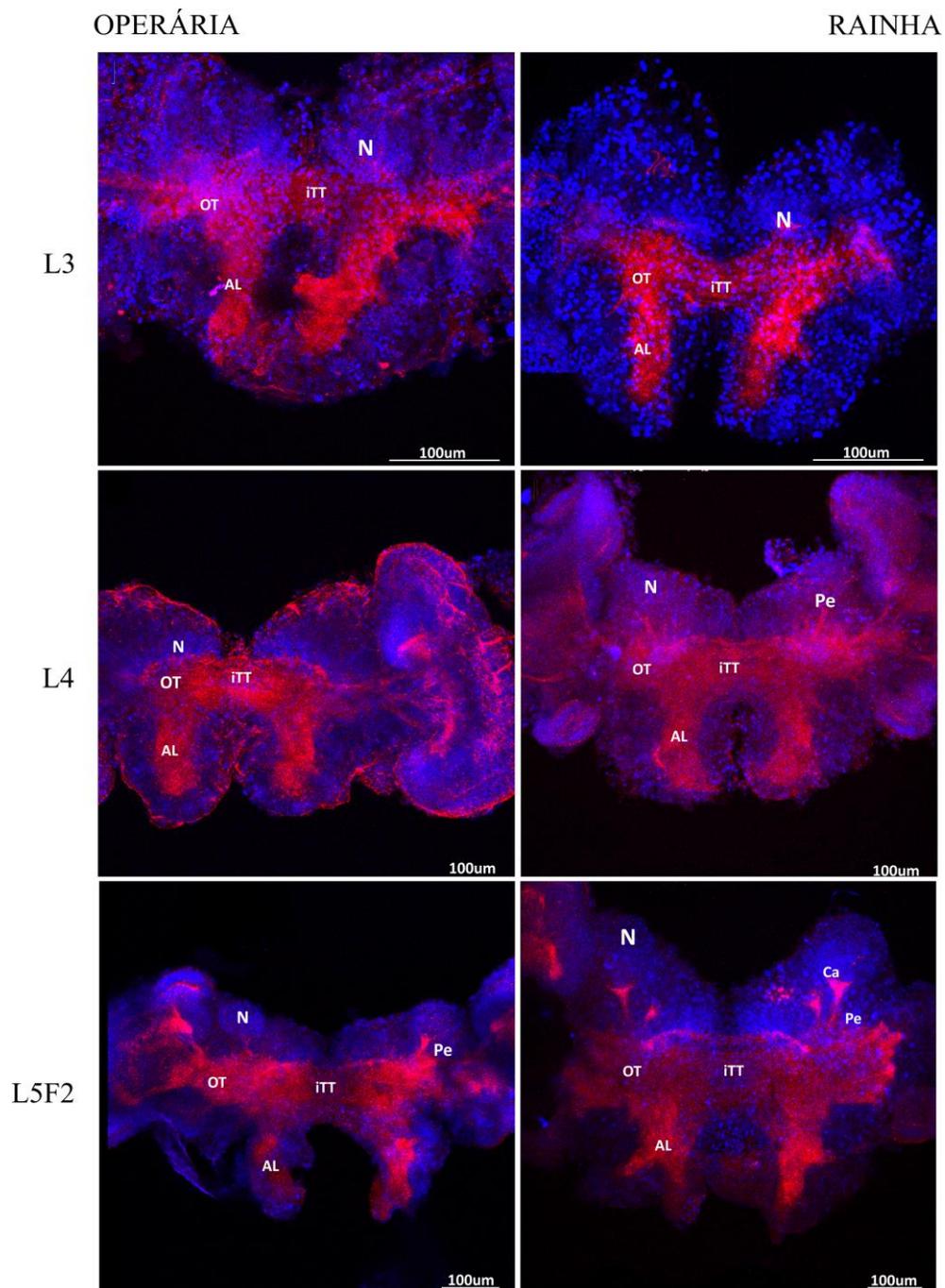
neurópila dos corpos cogumelares. O resultado neste caso é um arranjo concêntrico de corpos de células Kenyon associado a cada cálice de corpos cogumelares adultos (FARRIS et al., 1999).

Os aspectos moleculares da neurogênese de insetos são melhor estudados em *Drosophila melanogaster*. Um exemplo é o conceito de genes proneurais que foi criado após a descoberta e caracterização de quatro genes de *Drosophila* - *achaete* (*ac*), *scute* (*sc*), *letal of scute* (*lsc*) e *asense* (*ase*) – que possuem função primordial no desenvolvimento do SNC e SNP de *Drosophila* (CUBAS et al., 1991; GARCIA-BELLIDO; DE CELIS, 2009). Estudos mostram que o conjunto de ferramentas genéticas da neurogênese inicial é altamente conservado em todos os filos de animais, apesar das variações significativas no aspecto morfológico e funcional. Consequentemente, variações na morfologia e na função do sistema nervoso metazoário devem se originar de mudanças evolutivas nos processos de desenvolvimento que geram as células neurais e regulam sua diferenciação. Assim, estudos comparativos de genes envolvidos na neurogênese entre *Drosophila* e outros organismos podem nos fornecer informações sobre a evolução de diferentes aspectos funcionais do cérebro.

### 1.3 O cérebro de abelhas como modelo de estudo

O sistema nervoso é responsável pela geração e controle do comportamento. Comportamentos mais elaborados sugerem, portanto, cérebros ou componentes do cérebro mais complexos e/ou maiores. Diante do exposto, operárias adultas necessitariam de um cérebro mais desenvolvido do que as rainhas, para realizar todas as diferentes tarefas específicas de sua casta, como forrageamento, cuidado das larvas, limpeza do ninho, proteção, etc. Porém, ao contrário do que seria esperado, durante o período larval, a alimentação diferencial oferecida às rainhas promove um desenvolvimento cerebral mais rápido. Como resultado, os membros desta casta têm cérebros maiores do que os de operária neste período (BARCHUK et al., 2017). No estágio larval a diferença de desenvolvimento cerebral é mais aparente entre as fases quarta e quinta (MODA et al., 2013) (Figura 4).

Figura 4. Cérebros de operárias e rainhas *A. mellifera* durante a terceira, quarta e quinta fases do desenvolvimento larval.



Fonte: MODA et al. (2013).

Nota: Os cérebros foram corados com DAPI (núcleos, em azul) e faloidina (filamentos de actina-F, em vermelho). Notam-se claramente estruturas dos corpos cogumelares: cálices (Ca) e pedúnculos (Pe), e lobos antenais (AL) bem mais desenvolvidos em rainhas.

Durante a maior parte do desenvolvimento larval, os cérebros de rainhas *A. mellifera* apresentam uma maior área de neuroblastos do que os de operárias, o que talvez reflita a importância da qualidade da dieta como responsável por um maior desenvolvimento do sistema nervoso. Nosso grupo demonstrou que as primeiras diferenças morfológicas entre os cérebros de rainhas e operárias surgem ao redor da quarta fase larval (MODA et al., 2013). Seguidamente, testamos a hipótese de que estas diferenças morfológicas entre os cérebros de castas se originam a partir de diferenciações moleculares que acontecem em fases anteriores (L3). Para isso, realizamos análises transcriptômicas (RNA-Seq) do cérebro de rainhas e operárias na terceira fase larval (L3). Os resultados de sequenciamento de poli-A+ mostraram 60 genes diferencialmente transcritos, o que indica que o difenismo cerebral morfológico entre castas de *A. mellifera* é promovido molecularmente em fases anteriores, pelo menos, em L3. Dos 60 GDEs, 29 são mais transcritos em cérebros de rainhas e 31 em cérebros de operárias (VIEIRA, 2014) (Quadros 1 e 2).

Quadro 1. Características dos genes mais transcritos no cérebro de rainhas em relação ao de operárias.

<b>GENE</b>	<b>PROTEÍNA</b>	<b>DOMÍNIO CONSERVADO (PFAM)</b>
GB43173	Chitinase 3 (Cht-3)	Chitin binding Peritrophin-A domain /Glycosyl hydrolases family 18
GB49946	Masquerade (Mas)	--
GB50650	Proteoglycan 4	Trypsin-like serine protease/ Late Protein L2 / Trypsin
GB45633	--	DM4, DM12 family/ DUF1229
GB52105	--	--
GB53286	Forked	--
GB42549	4-nitrophenylphosphatase-like	Haloacid Dehalogenase-like Hydrolases
GB49795	--	--
GB50566	--	DUF1676
GB50648	Serine proteinase stubble	Trypsin (pfam00089) e Herpes_UL32
GB40604	Neurotrophin 1 (NT-1)	Neurotrophin1
GB42796	Takeout	Haemolymph juvenile hormone binding protein (JHBP)
GB50875	Apolipoprotein D-like, transcript variant 2	Lipocalin / cytosolic fatty-acid binding protein family
GB50560	--	--
GB45938	Alpha-methyl dopa hypersensitive protein-like (Amd)	--
GB46975	--	--
GB50180	--	--
GB48978	solute carrier family 22 member 8-like	BioY family / Sugar (and other) transporter
GB43181	--	DUF4271
GB49054	--	--
GB50561	--	--
GB50565	Osiris 7	DUF1676
GB44513	cytochrome P450 4AV1 (CYP4AV1)	Cytochrome P450
GB50562	--	DUF1676
GB50562	--	DUF1676
GB54144	--	Animal heme peroxidases and related proteins
GB54139	mucin-2-like	--
GB41493	--	--
GB50577	Osris 17	--

Fonte: VIEIRA, 2014.

Quadro 2. Características de genes mais transcritos no cérebro de operárias em relação ao de rainhas.

<b>GENE</b>	<b>PROTEÍNA</b>	<b>DOMÍNIO CONSERVADO (PFAM)</b>
GB50121	chymotrypsin inhibitor (Amci)	Trypsin Inhibitor cysteine rich domain
GB52466	--	Vitellogenin_N
GB48823	cuticular protein 2 (CPR2)	Chitin bind 4
GB55030	omega-conotoxin-like protein 1	--
GB42626	--	--
GB53925	--	--
GB50009	--	--
GB54549	alpha-glucosidase (Hbg2)	Alpha amylase catalytic domain family
GB51989	--	Pacifastin inhibitor (LCMII)
GB46587	--	--
GB44996	hexamerin 110 (Hex110)	Hemocyanin, all-alpha domain/ Hemocyanin, copper containing domain/ Hemocyanin, ig-like domain
GB41706	--	--
GB50363	vacuolar protein sorting- associated protein 27-like	Topoisomerase II-associated protein PAT1
GB42900	--	--
GB43713	cytochrome P450 9Q1 (CYP9Q1)	Cytochrome P450
GB40009	--	--
GB48391	mucin-2	Tymovirus 45/70Kd protein
GB56000	--	--
GB43690	--	Insect allergen related repeat, nitrile-specifier detoxification
GB46367	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD <sup>+</sup> ]-like	Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins/ DUF4271
GB51696	Hexamerin 70c precursor	Hemocyanin, all-alpha domain/ Hemocyanin, copper containing domain/ Hemocyanin, ig-like domain
GB46311	cuticular protein 21 (CPR21)	Chitin bind 4/ Laminin G domain
GB50116	chymotrypsin inhibitor-like	Trypsin Inhibitor like cysteine rich domain
GB48148	--	--
GB54419	short-chain dehydrogenase/reductase	Short chain dehydrogenase
GB51697	Hexamerin 70b precursor	Hemocyanin, all-alpha domain/ Hemocyanin, copper containing domain/ Hemocyanin, ig-like domain
GB43330	--	--
GB40007	nesprin-1-like	--
GB46366	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD <sup>+</sup> ]-like	--
GB43689	protein G12-like	Insect allergen related repeat

Fonte: VIEIRA, 2014.

Os 60 transcritos encontrados diferencialmente representados em cérebros de L3 são, assim, considerados como **potenciais responsáveis moleculares pela diferenciação morfológica entre cérebros de rainhas e operárias nas fases iniciais de desenvolvimento.**

#### 1.4 Nutrição larval e regulação da expressão gênica diferencial por miRNAs

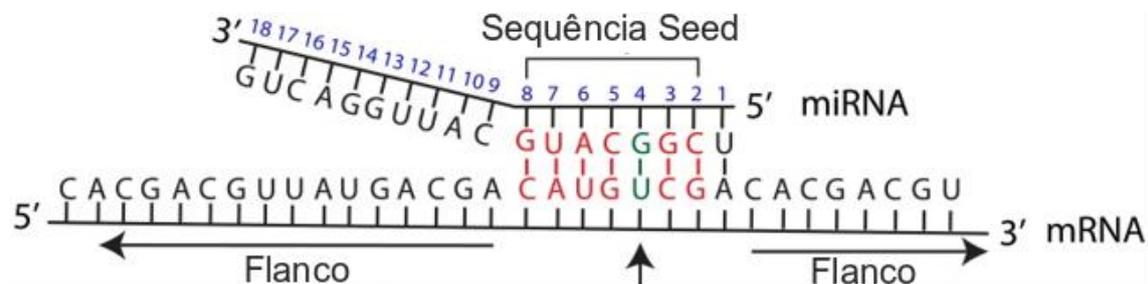
Foi demonstrado recentemente que a geleia real e a geleia de operárias contêm pequenas moléculas hidrofílicas com atividade biológica conhecidas como micro-RNAs (miRNAs; RNAs não-codificantes de 20-22 nucleotídeos) (GUO, 2010; GUO et al., 2013; ASHBY et al., 2016). Os miRNAs são moléculas que, em eucariotos, desempenham papéis importantes na regulação gênica pós-transcricional e em outros processos biológicos (AMBROS, 2004; HE; HANNON, 2004; BARTEL, 2018). Eles regulam entre 30 e 66% de todos os genes codificadores de proteínas, sendo considerados os maiores reguladores da expressão gênica (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005; FRIEDMAN et al., 2009). A função mais estudada destes RNA não-codificantes é a de silenciar pós-transcionalmente a expressão de genes por meio do pareamento de suas bases com as do mRNA alvo, desencadeando a repressão da tradução, por bloqueio do processo ou degradação do mRNA. Estão implicados na regulação de muitos processos biológicos, incluindo a diferenciação celular, o metabolismo, o ciclo celular e o envelhecimento (FINEBERG; KOSIK; DAVIDSON, 2009; ROUX; GONZALEZ-PORTA; ROBINSON-RECHAVI, 2012; MCLOUGHLIN et al., 2012). Pelo menos 70% dos miRNAs são expressos no sistema nervoso central e durante o desenvolvimento (LAGOS-QUINTANA et al., 2002, MCNEILL; VAN VACTOR, 2012).

O miRNA canônico possui um elemento de reconhecimento de um mRNA-alvo conhecido como região de *seed*. Esse elemento consiste em um complemento inverso perfeito ou quase perfeito dos nucleotídeos nas posições 2 a 8 da extremidade 5' do miRNA (Figura 5). Em animais, a região *seed* apresenta sítios de ligação na região 3'UTR (do inglês, 3' *untranslated region* – região não traduzida) de genes codificadores

de proteínas (LEWIS et al. 2003; LIM et al. 2003; STARK et al. 2003; JINEK; DOUDNA 2009). Porém, estudos mostram que os sítios de ligação para miRNAs podem ocorrer na região codificadora e na 5'UTR de mRNAs (TAY et al., 2008; JOPLING et al., 2005; OROM; NIELSEN; LUND, 2008).

Na maioria dos casos, a complementariedade da região *seed* do miRNA e a região 3'UTR do mRNA-alvo é eficiente para inibir a síntese da proteína (LEWIS et al., 2003; DOENCH; SHARP, 2004; KREK et al., 2005). Contudo, a complementariedade parcial ao longo do resto das sequências de miRNA e transcrito também contribui para reconhecimento entre miRNA e alvo (SHKUMATAVA et al., 2009). Há casos de sítios de miRNAs que não apresentam complementariedade na região *seed*, o que demonstra a variedade de formas de interação entre miRNA e mRNA-alvo (DIDIANO; HOBERT, 2008; FASANARO et al., 2012).

Figura 5. Visão esquemática de uma interação de miRNA com seu mRNA alvo.



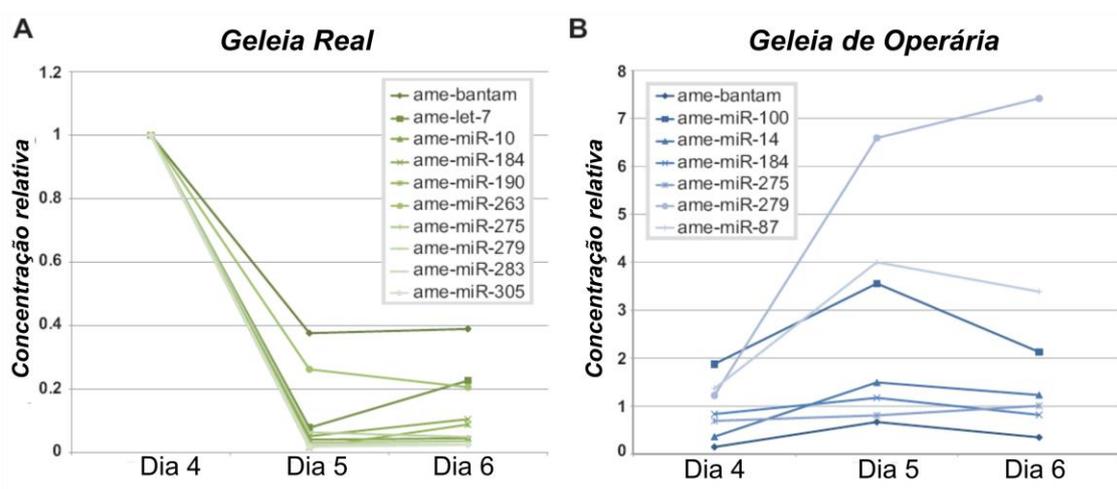
Fonte: PETERSON et al., 2014.

Nota: Número da posição do miRNA é mostrado em azul. A sequência seed refere-se a nucleotídeos nas posições 2-8 do miRNA. Flanco refere-se à sequência de mRNA de cada lado da região correspondente à seed do miRNA. As cores verde e vermelha mostram diferentes tipos de pareamento.

A determinação dos caracteres que distinguem rainhas e operárias ocorre em momentos específicos do desenvolvimento larval (PAGE; AMDAM, 2007). Guo et al., (2013) analisaram os miRNAs nas geleias real e de operária durante o curso do desenvolvimento larval. Estes autores mediram as concentrações de 22 miRNAs conhecidos na geleia real e de operária coletadas 4, 5 e 6 dias após a eclosão das larvas. Os dados mostram uma forte queda na concentração de todos os miRNAs testados em

geleia real a partir do dia 4 ao dia 5, após o qual os níveis se mantiveram estáveis (Figura 6). Em comparação, as variações nas concentrações de miRNA na geleia de operária eram menores, menos ordenadas e, em geral positivas, particularmente a partir do dia 4 ao dia 5.

Figura 6. Concentração de miRNAs em geleias durante o desenvolvimento larval.



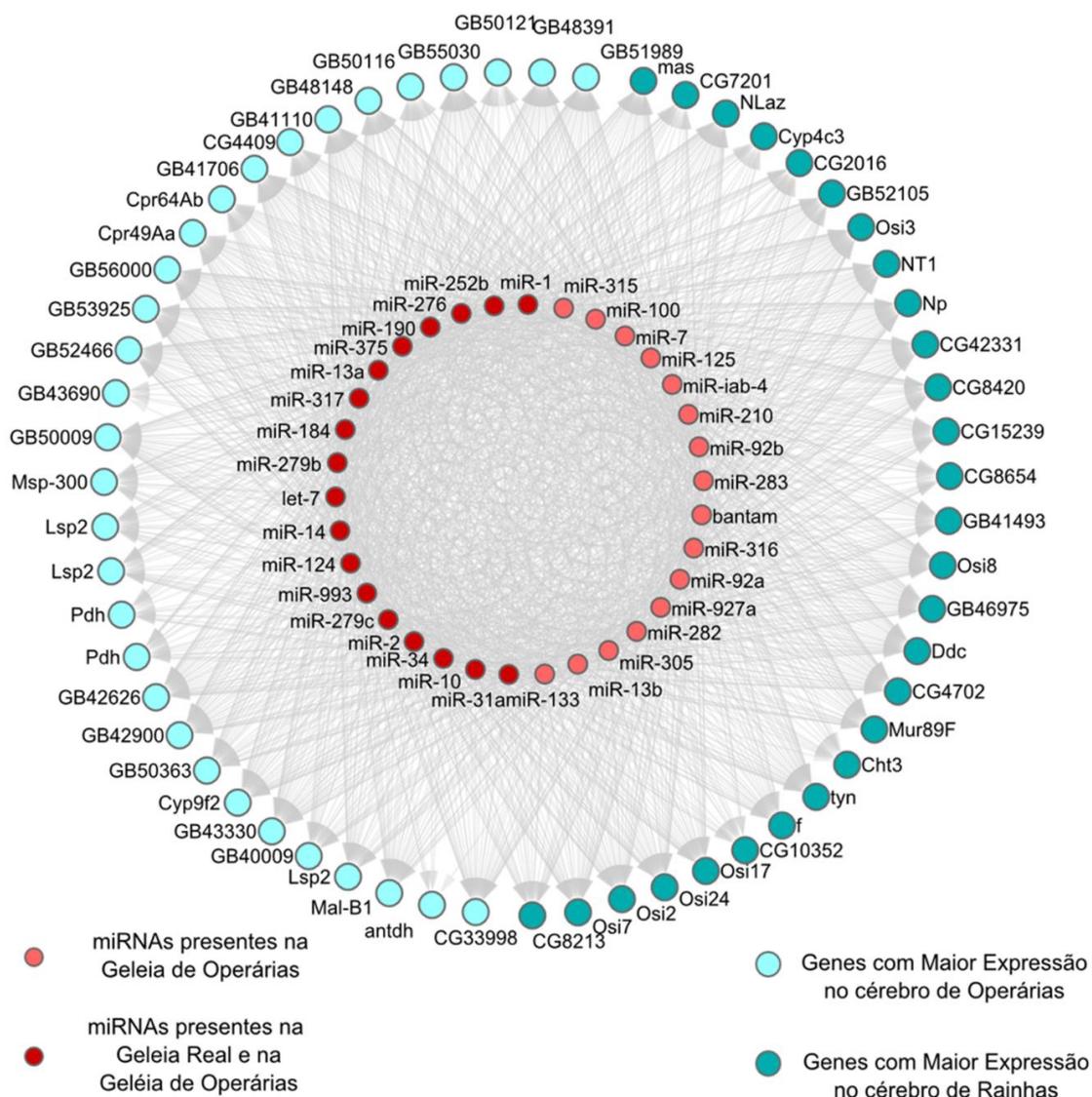
Fonte: Adaptado de GUO et al., 2013.

Nota: As amostras foram coletadas nos dias 4, 5 e 6 após a eclosão das larvas e as concentrações dos miRNAs já conhecidos foram avaliadas por qRT-PCR.

No mesmo trabalho, Guo et al. (2013) demonstra que alguns miRNAs quando fornecidos por meio da alimentação às larvas de rainhas têm a capacidade de alterar o destino das castas, e que os miRNAs mais presentes na geleia de operárias regulam coletivamente uma série de mRNAs com funções no sistema nervoso. Um outro trabalho realizado por Ashby e colaboradores (2016) mostrou que nas fases larvais L4 e L5 de *A. mellifera*, os perfis de miRNAs são claramente distintos entre rainhas e operárias.

Durante o desenvolvimento do projeto do mestrado (VIEIRA, 2014), foi elaborada uma rede de interação entre os miRNAs presentes nas geleias real e de operária (GUO et al., 2013) e as 3' UTRs dos 60 GDEs entre cérebros de rainhas e operárias (Quadros 1 e 2), mostrada na Figura 7. Na mesma ocasião, foi feito um estudo de enriquecimento entre essas interações miRNA-mRNA (Quadro 3). Esses dados deram fundamentação para os experimentos de regulação de genes envolvidos no processo de neurogênese por miRNAs realizados durante o estudo apresentado aqui.

Figura 7. Rede de interação entre miRNA das geleias real e de operária e os GDEs nos cérebros de rainhas e operárias.



Fonte: VIEIRA, 2014.

Nota: A rede mostra os GDEs que possuem sítio de ligação nas suas regiões 3'UTR para os 34 miRNA enriquecidos das geleias real e de operária.

Quadro 3. miRNAs enriquecidos entre os GDEs nos cérebros e no genoma de *A. mellifera*.

miRNA	N_targets	targets_PPI	P_value
ame-miR-283	3140	20	2.16E-02
ame-miR-927a	4221	24	4.03E-02
ame-miR-10	5669	31	2.72E-02
ame-miR-13a	5672	36	6.47E-04
ame-miR-125	5942	36	1.75E-03
ame-miR-14	6514	37	5.23E-03
ame-miR-100	6815	39	2.87E-03
ame-miR-iab-4	7401	39	1.61E-02
ame-miR-13b	6958	41	8.46E-04
ame-miR-279b	7623	41	7.35E-03
ame-miR-279c	7953	41	1.82E-02
ame-miR-315	7032	42	4.37E-04
ame-miR-133	7049	43	1.72E-04
ame-miR-92b	8085	43	6.29E-03
ame-miR-92a	8129	43	7.15E-03
ame-miR-276	7882	44	1.43E-03
ame-miR-316	9682	47	2.66E-02
ame-miR-305	9818	48	1.86E-02
ame-miR-1	9543	49	3.68E-03
ame-miR-7	10356	49	3.62E-02
ame-miR-2	9061	50	2.42E-04
ame-miR-993	9638	50	1.95E-03
ame-miR-375	9768	50	2.99E-03
ame-miR-252b	11063	52	2.48E-02
ame-miR-124	11109	52	2.81E-02
ame-bantam	10121	53	4.08E-04
ame-let-7	11006	53	8.75E-03
ame-miR-184	10104	54	1.03E-04
ame-miR-282	11131	54	4.77E-03
ame-miR-31a	11758	54	3.25E-02
ame-miR-317	11761	54	3.27E-02
ame-miR-210	12098	57	3.94E-03
ame-miR-190	12583	57	2.14E-02
ame-miR-34	12298	58	1.95E-03

Fonte: VIEIRA, 2014.

Nota: O quadro mostra o número total de genes do genoma (N\_genes) e aqueles que são alvos (N\_targets) do miRNA correspondente àquela linha. Mostra também o número de GDEs (N\_PPI) e o número daqueles que são alvos (targets\_PPI) do miRNA correspondente àquela linha. O p\_value corresponde ao grau de confiabilidade daquele gene ter mais chance de ter um GDE como alvo do que um gene qualquer do genoma. Em detalhe, aqueles miRNAs escolhidos para testes de interação miRNA-mRNA em nosso Projeto de Doutorado.

## 1.5 Motivação

O desenvolvimento de características complexas pode ser influenciado por sinais ambientais cujos diferentes “*inputs*” são integrados no sistema genômico através da participação de mediadores epigenéticos, como os mais conhecidos: metilação do DNA, modificação de histonas e a ação de RNA não codificadores (MALESZKA; MASON; BARRON, 2014). Estes, por sua vez, formam uma rede funcional que permite a regulação fina da produção de produtos proteicos com atividade direta no fenótipo morfológico do indivíduo. Porém, não se conhecem completamente os mecanismos e vias pelos quais estes sistemas são integrados e os alcances da ação destes sistemas sobre o genoma durante o desenvolvimento dos organismos. Nosso modelo de estudo é ideal para a identificação de genes de resposta a variações nutricionais que levam ao desenvolvimento diferencial de um órgão fundamental de metazoários (cérebro) e eventuais moléculas com ação epigenética que regulem a ação destes genes na síntese de seus respectivos produtos proteicos.

Além disso, os mecanismos celulares de aprendizagem e codificação da memória são altamente conservados em todos os animais e, conseqüentemente, resultados obtidos em pesquisas com organismos modelos, como insetos (MENZEL, 2012; LOCKETT; HELLIWELL; MALESZKA, 2010), são importantes contribuições no entendimento da formação da memória e processo de demência humana.

As fêmeas de abelhas *A. mellifera* que recebem uma quantidade menor de alimento durante o período larval tornam-se operárias, casta cujo cérebro adulto é proporcionalmente mais desenvolvido em relação ao das rainhas (BARCHUK et al., 2017). Durante a maior parte do desenvolvimento pós-embrionário, entretanto, o cérebro das rainhas mostra uma área maior de neuroblastos em relação ao das operárias. Além disso, o desenvolvimento de estruturas cerebrais durante o período larval é bem mais rápido em rainhas (MODA et al., 2013; BARCHUK et al., 2017), o que reflete a importância de uma dieta mais rica como responsável por um maior desenvolvimento inicial do sistema nervoso. As rainhas em desenvolvimento, além de receberem mais alimento, possuem uma dieta mais homogênea do que as primeiras, devido à grande quantidade de proteínas específicas da geleia real (principalmente *major royal jelly proteins*; DRAPEAU et al., 2006).

Partindo-se do fato de que a alimentação diferencial oferecida às larvas *A. mellifera* conduz à formação de diferentes castas, as primeiras etapas da neurogênese de abelhas constituem um experimento natural e um bom modelo para a identificação de genes que ligam a nutrição diferencial ao desenvolvimento diferencial do sistema nervoso, particularmente do cérebro.

Em nosso trabalho, abordamos o problema da base molecular da neurogênese diferencial associada ao surgimento de diferenciações fenotípicas (castas) mediante duas abordagens: #1. Genômica comparativa; #2. Biologia molecular do desenvolvimento cerebral.

Abordagem #1: A hipótese do cérebro social (ver em Barchuk et al., 2017 e Dunbar, 1998), propõe que, evolutivamente, as diferenças de castas nas abelhas foram promovidas por *trade-offs* morfofisiológicos do desenvolvimento em que a casta especializada na reprodução investe no desenvolvimento dos ovários, enquanto que as operárias, não reprodutivas, investem no desenvolvimento do cérebro. Mediante análises morfométricas, nosso Grupo demonstrou que os padrões morfológicos do desenvolvimento cerebral entre castas permitem afirmar que a hipótese é verdadeira para *A. mellifera*. Desde o ponto de vista genômico, as espécies de abelhas mais sociais deveriam possuir uma proporção maior de genes neurogênicos, comparada à encontrada no *Homo sapiens*, com espécies solitárias com proporções menores (*life-history traits* específicos estariam associados a padrões de representação de genes neurogênicos também específicos). Aproveitando os trabalhos de sequenciamento e anotação do genoma da abelha nativa sem ferrão *Frieseomelitta varia* (nos quais participamos) e a disponibilidade da sequencia genômica de dez espécies de abelhas com diferentes graus de socialidade (Hymenoptera Base - <http://hymenopteragenome.org/>), **testamos a hipótese do cérebro social mediante análises genômicas comparativas.**

Abordagem #2: Mediante trabalhos anteriores de nosso Grupo, identificamos 60 GDEs entre cérebros de rainhas e operárias na fase L3, quando se inicia o processo de alimentação casta-específica, pela técnica de RNA-Seq (genes neurogênicos casta-específicos). **Aqui, confirmamos a expressão diferencial de nove GDEs entre cérebros de rainhas e operárias na fase L3 e hipotetizamos que esses genes participam do desenvolvimento diferencial do cérebro de *A. mellifera* no período larval. Como o papel dos miRNAs na neurôgenes de *Apis mellifera* foi pouco estudado e sabendo que as geleias real e de operárias carregam populações**

**diferentes de miRNAs, que alguns destes atuam no desenvolvimento do sistema nervoso em outros organismos, hipotetizamos, que os GDEs são regulados por miRNAs endógenos e/ou incorporados durante a ingestão de geleia pelas larvas.**

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Nosso objetivo geral foi identificar bases moleculares da morfogênese diferencial inicial do cérebro de larvas em castas de abelhas *Apis mellifera*.

### 2.2 Objetivos específicos

Abaixo são listados os objetivos específicos do presente trabalho.

- a) Identificar padrões de representação de genes neurogênicos clássicos associados aos *life-history traits* de 11 espécies de abelhas, *Drosophila melanogaster* e *Homo sapiens*, usando análises genômicas comparativas.
- b) Determinar a organização genômica de GDEs no cérebro de rainhas e operárias na fase de desenvolvimento larval L3: *amci*, *mas*, *takeout*, *nt-1*, *amd*, *hex110*, *hex70b*, *hex70c* e *forked*.
- c) Determinar os níveis de transcrição cerebral durante o desenvolvimento larval de genes potencialmente envolvidos na neurogênese diferencial entre operárias e rainhas de *A. mellifera*;
- d) Identificar o padrão espacial de expressão da proteína Hex110 (cujo transcrito pertence ao grupo de GDEs) em cérebros de rainha e operária de *A. mellifera* nas fases L3 e L4.
- e) Identificar miRNAs presentes nas geleias real e de operária com potencial participação no processo de neurogênese diferencial, regulando a expressão de GDEs.

- f) Identificar potenciais sítios de ligação dos miRNAs selecionados na 3'UTR de GDEs.
- g) Validar a interação de miRNAs selecionados com GDEs, por meio do ensaio da luciferase em células em cultivo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Abaixo encontram-se descritos o material e métodos empregados no presente trabalho.

#### 3.1 Genômica comparativa de genes neurogênicos clássicos

Para determinar quais os genes neurogênicos clássicos estão presentes em *Homo sapiens* e *Drosophila melanogaster* utilizamos a ferramenta *Gene Ontology* (geneontology.org) para realizar busca pelo termo “neurogenesis” no banco de dados das duas espécies. A partir destes resultados, foram feitos BLASTs recíprocos para encontrar os genes ortólogos nas 11 (onze) espécies de abelhas selecionadas para este estudo (*Frieseomelitta varia*, *Habropoda laboriosa*, *Dufourea novaeangliae*, *Eufriesea mexicana*, *Megachile rotundata*, *Bombus impatiens*, *Lasioglossum albipes*, *Bombus terrestris*, *Apis mellifera*, *Melipona quadrifasciata*, *Euglossa dilemma*) utilizando o banco de dados Hymenoptera Base (<http://hymenopteragenome.org/>), no qual estão depositados os seus genomas.

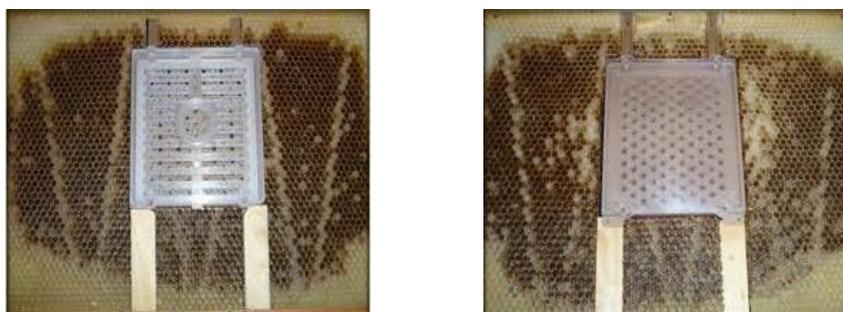
A partir dos genes ortólogos encontrados, fizemos análises da proporção de genes neurogênicos em relação ao número total de genes em cada espécie. Essa busca nos permitiu observar se há relação ou não entre a proporção de genes neurogênicos e a evolução do grau de socialidade, em outras palavras, se os organismos sociais apresentam maior proporção de genes neurogênicos quando comparados a organismos solitários.

Utilizando a ferramenta de comparação VENY 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) buscamos os genes neurogênicos compartilhados pelas espécies *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *F. varia* e *A. mellifera*.

### 3.2 Coleta de amostras

A primeira etapa para realização dos experimentos foi a coleta de amostras de larvas L3, L4 e L5F2 para dissecção dos cérebros que foram utilizados para a extração de RNA total e nos ensaios de imunolocalização (para a identificação da localização de proteínas). As larvas de abelhas africanizadas foram provenientes do Apiário Experimental do Departamento de Genética da FMRP – USP, Ribeirão Preto, SP. Tanto as larvas de operárias, quanto as de rainhas foram obtidas após postura controlada, visando minimizar as diferenças no desenvolvimento entre elas e garantir sua idade correta. Para isso, a rainha foi aprisionada para postura por 6 h em uma caixa Jenter (Figura 8) (para obter larvas L3) ou tela excludora (para obter larvas L4 e L5F2). A rainha, então, foi solta e logo em seguida foi conferida a existência de ovos (postura). Completadas 72 h de desenvolvimento embrionário, foram feitas as transferências de parte das larvas recém eclodidas destinadas para o desenvolvimento de rainhas, para uma realeira artificial (Figuras 9 e 10). As outras larvas foram deixadas nas células, onde eclodiram, para o desenvolvimento de operárias. As cúpulas com futuras rainhas foram acopladas à realeira artificial, sem a necessidade de adição de geléia real, pois ela já está presente na cúpula transferida. Subsequentemente, a realeira artificial foi inserida numa colônia, permanecendo nela até o dia da coleta. As larvas de ambas castas foram coletadas nas fases de desenvolvimento escolhida para estudo (L3, L4 e L5F2), sendo identificadas segundo Michelette e Soares (1993) (Quadro 4).

Figura 8. Frente e verso de caixa Jenter inserida em quadro limpo.



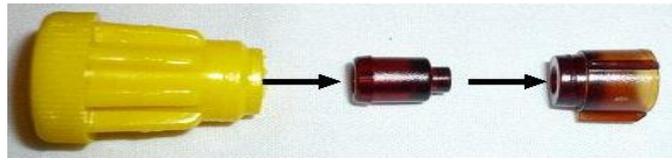
Fonte: Cornwall Honey – Beepedia Using the Karl Jenter Kit for Honey Bee Queen Rearing (<http://www.cornwallhoney.co.uk/beepedia/jenter1.htm>)

Figura 9. Cúpulas para ovoposição da rainha contendo larvas recém eclodidas (L1).



Fonte: Cornwall Honey – Beepedia Using the Karl Jenter Kit for Honey Bee Queen Rearing (<http://www.cornwallhoney.co.uk/beepedia/jenter1.htm>)

Figura 10. Realeira artificial.



Fonte: Cornwall Honey – Beepedia Using the Karl Jenter Kit for HoneyBee Queen Rearing (<http://www.cornwallhoney.co.uk/beepedia/jenter1.htm>).

Nota: A cúpula (primeira peça de cor marrom) é utilizada pela rainha para a postura. Encontra-se inserida na caixa Jenter. Assim que ocorre a eclosão da larva após 72h, esta é acoplada à célula (segunda peça de cor marrom) e ambas acopladas à peça amarela, formando uma realeira artificial, identificada como tal pelas operárias por seu tamanho. A peça amarela é colada com a própria cera da abelha, em uma barra que deve ser inserida na caixa selecionada para criação de rainha, no mínimo 24h antes da transferência.

Quadro 4. Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) de operárias e rainhas de abelhas *A. mellifera* africanizadas.

FASE	CARACTERIZAÇÃO		DURAÇÃO (horas)
	RAINHA	OPERÁRIA	
Ovo	Embriões de 0 a 72 horas		72 (antes da eclosão)
L1	Peso – 0,0001 a 0,00045 g	Peso – 0,0001 a 0,0003 g	0-20 (após eclosão)
L2	Peso – 0,00035 a 0,0015 g	Peso – 0,0003 a 0,001 g	20-35
L3	Peso – 0,0013 a 0,007 g	Peso – 0,0015 a 0,004 g	35-55
L4	Peso – 0,0038 a 0,044 g	Peso – 0,004 a 0,0248 g	55-80
L5F1	Peso – 0,035 a 0,090 g	Peso – 0,029 a 0,06 g	80-95
L5F2	Peso – 0,091 a 0,180 g	Peso – 0,06 a 0,11 g	95-105
L5F3	Peso – 0,181 a 0,260 g	Peso – 0,11 a 0,16 g	105-115

Fonte: modificado de Michelette e Soares (1993).

Nota: A duração das fases larvais no desenvolvimento pré-imaginal refere-se às horas após eclosão. Detalhe em cinza: fases utilizadas em nosso trabalho (L3, L4 e L5F2, F = feeding).

Quando na fase correta, as larvas foram coletadas e os cérebros dissecados em salina 0,9% para manter as estruturas do cérebro conservadas. Para cada uma das triplicatas das amostras biológicas de cérebros de rainhas e operárias utilizadas para a validação dos dados de RNA-Seq por RT-qPCR foram coletados em média 15 cérebros por amostra. Estes cérebros tiveram seu RNA extraído segundo o protocolo de extração do reagente TRIzol® (Invitrogen). Foi realizada uma segunda coleta de cérebros, os quais foram mantidos intactos para uso nas análises de imunolocalização. Para os ensaios de RT-qPCR, o RNA total foi tratado com DNase (RQ1 RNase-Free DNase – Promega), para eliminação de possível contaminação com DNA. O RNA de larvas L3 foi usado para sintetizar cDNA utilizando o kit NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen). Enquanto o RNA das amostras das fases L4 e L5F2 tiveram o cDNA sintetizado pelo kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total para que todas as amostras tivessem a mesma quantidade inicial de material genético. A mesma técnica foi usada para obter o perfil de transcrição para cada um dos genes estudados.

### 3.3 Anotação da estrutura dos genes relacionados ao desenvolvimento diferencial do cérebro de larvas L3 de *Apis mellifera* (GDEs)

Dos 60 GDEs determinados pelas análises de RNA-Seq (Quadro 2), nove genes foram selecionados para validação e estudos de regulação por miRNA. A seleção foi feita baseando-se nas possíveis funções dos genes segundo a literatura relativa aos ortólogos encontrados em outras espécies. Os genes escolhidos foram: *amci*, *mas*, *takeout*, *nt-1*, *amd*, *hex110*, *hex70b*, *hex70c* e *forked*. Inicialmente realizou-se uma análise *in silico*, pela qual foram recuperadas as sequências em nucleotídeos dos transcritos destes genes com base na versão mais recente do genoma de *A. mellifera* (versão 4.5, Official Gene Set 3.2, ELSIK et al., 2014), disponível na base de dados BeeBase (<http://hymenoptera-genome.org/beebase/>). Nesta plataforma, também, é possível obter o número de isoformas de cada gene. Cada um desses nove genes foi anotado, o que consiste em encontrar a localização física de determinado gene dentro de um grupo cromossômico e determinar a sequência e localização de cada elemento do gene (éxons, íntrons, regiões 3' e 5' UTR). Para anotar os genes em estudo, foram recuperados arquivos no formato FASTA contendo o grupo cromossômico em que cada gene está localizado. Nesses arquivos, estão as sequências de nucleotídeos deste grupo cromossômico. Recuperamos também arquivos no formato *gff*, os quais contêm as coordenadas para localização de cada elemento gênico. Estas foram utilizadas para anotar os genes dentro dos seus respectivos grupos cromossômicos. A anotação gênica foi realizada a partir das plataformas Artemis 7.0 (RUTHERFORD et al., 2000) e UGENE (OKONECHNIKOV et al., 2012), onde identificamos as sequências de cada éxon, e ajustamos as fronteiras buscando os sítios canônicos de *splicing* no início e término de cada íntron (GT-AG).

### 3.4 Validação dos dados de RNA-Seq e determinação do perfil de transcrição durante o estágio larval por qPCR em tempo real

A análise do perfil de transcrição dos GDEs selecionados e a validação dos dados obtidos para estes genes por RNA-Seq (VIEIRA, 2014) foram realizadas através de qPCR utilizando-se SYBR® Green (*Applied Biosystems*) e primers específicos no sistema 7500 Real Time PCR (*Applied Biosystems*) do Laboratório de Biologia Animal Integrativa do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG. Para cada gene, foram analisadas, em triplicata, três amostras de cDNA, provenientes de RNAs obtidos a partir de cérebros de operárias e rainhas nas fases L3, L4 e L5F2 (3 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas). O gene codificador da proteína ribossomal L32 (*RpL32*), constituinte estrutural dos ribossomos, foi utilizado como controle (referência) nas reações de qPCR para os mRNAs (LOURENÇO et al., 2008). No desenho dos primers foram utilizados os softwares Primer Express for Real Time PCR (versão 3.0; *Applied Biosystems*). A ferramenta Primer 3 (UNTERGASSER et al., 2007) foi utilizada para verificar se os pares de primers encontram-se em éxons diferentes, para que amplifiquem um fragmento de tamanho maior do que o esperado, caso haja contaminação das amostras por DNA genômico. A ferramenta BLAST foi empregada na análise do nível de especificidade de cada um deles. Os *primers* utilizados estão apresentados na Quadro 5.

Quadro 5 – Características dos primers utilizados nos experimentos de qPCR.

GENE	FORWARD PRIMER (INICIADOR 5') Sequência 5'-3'	REVERSE PRIMER (INICIADOR 3') Sequência 5'-3'	Tm (°C)	TAMANHO AMPLICON
<i>hex110</i> *	GGCGGAGGAATTCAGCAAAA	TGGCCTACAGGATTCTGGAT	60	152 bp
<i>hex70b</i> *	ATACGACGAGTTCGGTCATG	ACGAAGACAGATTCGTGGCT	60	132 pb
<i>hex70c</i> *	TTACAAAAGTCCGCTTGGG	GGGATAGATCTCGTAGATGG	60	130 pb
<i>Amd</i>	AGCACACAGAAGCCAGAAAG	CTGGTAAAATGTATCGTCCACATCT	60	65 pb
<i>Amci</i>	TGTCTCGAATCATCTTCATTTTGC	ACACCTCGTTGGTCCACACT	60	84 pb
<i>nt-1</i>	CGAAAATGTGGAGGAGGGTTT	TTGCGGACGCGCGTAT	60	58 pb
<i>Mas</i>	TTACTGGTTACGGATATATGGGAGAAG	CATTCACCTTTTCGTATACATTCTGCA	60	69 pb
<i>Forked</i>	GTTACACAGAAGAAGCTTGACAACAC	TCTACTGTATCTGCGATCGGTTTT	60	71 pb
<i>Takeout</i>	TTGCTAGATCGGCAATGTG	GTATCCAATTGCGGCAA	60	62 pb
<i>rpl32</i>	CGTCATATGTTGCCAACTGGT	TTGAGCACGTTCAACAATGG	60	150 pb

Fonte: Da autora. \* Referência: MARTINS et al., 2010.

Antes da análise dos GDEs por PCR quantitativa em tempo real, os primers foram testados para garantir que se ligassem apenas à região de interesse no genoma de *A. mellifera*. Isto foi realizado através de PCR convencional, utilizando a seguinte programação: 1 ciclo de 2 min a 94 °C; 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s na Ta (Temperatura de anelamento) de 60 °C e 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 7 min a 72 °C. Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose em tampão SB (ácido bórico e NaOH) e corados com *SYBR Safe* (*Applied Biosystems*). As bandas foram visualizadas através de um transiluminador UV (DNR, MiniBis Pro).

A seguir, foram realizados os testes de eficiência de cada par de *primers* (na concentração de 10 µM). Para tanto, realizamos reações em diferentes concentrações dos cDNAs (1, 1:5, 1:25; 1:125 e 1:625) no sistema 7500 Real Time PCR. Desta forma, verificamos que os cálculos de eficiência estavam entre 90-100% (Life Technologies, 2014) nas seguintes condições de PCR: 1 ciclo de 2 min a 50 °C, 1 ciclo de 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min na T<sub>m</sub> e um ciclo final de 95 °C por 15 s. A partir da amplificação destes produtos, os valores de *Slope*, fornecidos após a construção de uma curva de regressão linear (valores da curva padrão), foram utilizados para a verificação da eficiência da reação (E) mediante a fórmula  $[E=10^{(-1/Slope)}-1]$ . A especificidade dos produtos de PCR foi confirmada mediante análise da curva de dissociação para cada amostra. R<sup>2</sup> é o fator de correlação linear entre as concentrações do produto amplificado e os valores de seus ciclos limítrofes (*threshold cycle*, Ct). Quanto mais R<sup>2</sup> está próximo do valor 1, mais adequado.

Os valores de quantificação relativa foram calculados utilizando-se o Método 2<sup>(-ΔΔcT)</sup> (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), sendo que o menor valor de dCt foi tomado como referência unitária para cada gene. Os resultados das amostras de rainhas e operárias foram considerados diferentes quando p<0,05 (*teste t Student*; *GraphPad Prism* v.6).

### 3.5 Imunolocalização

A técnica de imunolocalização foi utilizada para determinar a presença da proteína Hex110 nos cérebros de rainhas e operárias L4. Este experimento permite avaliar a distribuição espacial da proteína codificada pelos genes de interesse.

Os cérebros dissecados foram fixados em 4% paraformaldeído em PBST 0,5% (PBS + 0,5% Triton X-100) por 30 min, sob agitação. Estes foram, então, permeabilizados com PBST (PBS + 0,5% Triton X-100) por 5 min (3 lavagens), e o bloqueio foi feito com PBST e 5% de albumina sérica bovina (PBSBT<sub>2</sub>) por 5 min (5 lavagens) e incubados em PBSBT<sub>2</sub> e 10% de soro de cabra, por 30 min. Depois, os cérebros foram incubados com o anticorpo anti-HEX 110 produzido em coelhos em concentração de 1:200 (*Rheabiotech*) em PBSBT<sub>2</sub> e 10% de soro de cabra, durante 16 h a 4 °C. Em sequência, o material foi lavado 3 vezes por 5 min e 5 vezes por 20 min em PBSBT<sub>2</sub>, e incubado com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488 (*Molecular probes* diluição 1:200) em PBSBT<sub>2</sub> por 2 h em temperatura ambiente. Seguidamente, os cérebros foram lavados com PBSBT<sub>2</sub> (3 lavagens de 5 min e 5 lavagens de 20 min) e colocados na lâmina. Todo o líquido, usado para realizar as lavagens mencionadas, foi retirado e 1 gota de ProlongGold (*Life Technologies*) foi adicionada sobre os cérebros. Estes foram posicionados da melhor forma para visualização no microscópio com o auxílio de uma pinça e cobertos com uma lamínula. As lâminas foram deixadas em local escuro, temperatura ambiente, por 24 h e, então, examinadas em microscópio confocal (*Leica TCSSP5 confocal microscope*). Pela facilidade de obtenção de cérebros de larvas L4, estes experimentos foram feitos no Laboratório de Biologia do desenvolvimento de abelhas em colaboração com as Profas. Dras. Márcia Bitondi (FFCLRP-USP) e Lívia Moda (UNIFAL-MG).

### 3.6 Escolha dos miRNAs para estudo de interação mRNA-miRNA e determinação do nível de transcrição destes na fase larval L3 de *A. mellifera*

Dentre os 34 miRNAs (Quadro 3 e Figura 7; VIEIRA, 2014) que possuem interações com as 3'UTRs dos GDEs enriquecidas em relação ao genoma de *A. mellifera* (p-value < 0,05) selecionamos três (*miR-210*, *miR-34*, *miR-317*) para determinar seus níveis nos cérebros de *A. mellifera* por qPCR e validar as interações preditas mRNA-miRNA por ensaio de gene-reporter. A seleção foi feita a partir dos dados encontrados na literatura científica, relação com desenvolvimento do sistema nervoso, e pela possível interação com os nove GDEs, tornando-se candidatos promissores para estudos de regulação do desenvolvimento inicial do cérebro de *A. mellifera*.

A determinação dos níveis dos miRNAs nos cérebros de *A. mellifera* por qPCR seguiu o mesmo protocolo apresentado na Seção 3.4 tendo apenas como modificação o gene de referência que agora passou a ser o U5 snRNA, um componente da maquinaria de *splicing* ('spliceossomo'), e indicado na literatura como tendo expressão constitutiva (SCHMITTGEN et al., 2004). As sequências utilizadas como primer *Foward* foram as próprias sequências dos miRNAs (Quadro 6) e o primer *Reverse* corresponde ao fornecido pelo kit NCode, com sequência não informada.

Quadro 6. Características dos primers para os miRNAs selecionados.

<b>GENE</b>	<b>FOWARD PRIMER</b>	<b>REVERSE PRIMER</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>TAMANHO AMPLICON</b>
<i>U5 snRNA*</i>	CTCTGGTTTCCCTTCAAATC	ATCAATTGTTCCCCTCCACG	60	74bp
<i>miR-34</i>	TGGCAGTGTGTTAGCTGGTTG	-	60	~45pb
<i>miR-210</i>	TTGTGCGTGTGACAGCGGCTA	-	60	~45pb
<i>miR-317</i>	TGAACACAGCTGGTGGTATCTCAGT	-	60	~45pb

Fonte: Da autora. \* Referência: HERNANDES, 2013.

### 3.7 Teste de elementos de ligação preditos para miRNAs pelo ensaio de gene repórter

#### 3.7.1 Predição das interações miRNA-mRNAs de *A. mellifera* envolvidas na neurogênese

A predição das interações miRNA-mRNAs em *A. mellifera* foi realizada seguindo o protocolo desenvolvido em Cristino et al., 2014 e Freitas et al., 2017. Utilizando o programa *RNAhybrid* buscamos sítios de ligação para os miRNAs *miR-34*, *miR-317* e *miR-210* nas regiões 3'UTRs dos 9 genes selecionados (*amd*, *forked*, *hex70b*, *hex70c*, *hex110*, *nt-1*, *mas*, *takeout*, *amci*) (REHMSMEIER et al., 2004; KRUGER; REHMSMEIER, 2006). Recuperamos as regiões de 1000 nt a jusante (*downstream*) do códon de parada dos genes codificadores (versão 4.5; Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) para serem utilizadas como 3'UTRs. Destacamos que para usar este valor, de 1000 nt, consideramos dados de *D. melanogaster*, que registram uma média de 500 nt, uma vez que a anotação das regiões 3'UTRs ainda não foi finalizada no genoma de *A. mellifera*.

A sequência dos miRNAs foram recuperadas da base de miRNAs miRBase (versão 21, GRIFFITHS-JONES et al., 2008; KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2014). Selecionamos os sítios preditos com base na energia livre da interação miRNA-mRNA alvo (energia livre  $\leq -15$  kcal/mol) e também com base na presença de *seed* (nucleotídeos de 2 a 8 da região 5' do miRNA) total e parcialmente conservada, permitindo o pareamento G:U, já que esse tipo de pareamento não prejudica as interações (VELLA et al., 2004; DIDIANO; HOBERT, 2006; 2008).

As interações miRNA-mRNA preditas foram consideradas nas seguintes etapas do experimento de validação. As interações miRNA-mRNA preditas foram representadas em uma rede construída utilizando-se a plataforma Cytoscape (<http://cytoscape.org/>).

### 3.7.2 Desenho de primers específicos para a amplificação das regiões 3'UTRs selecionadas para o ensaio de luciferase

A estrutura de cada um dos genes candidatos foi anotada como descrito na Seção 3.2. Os sítios de ligação preditos também foram anotados, permitindo assim o desenho de *primers* que flanqueiam os sítios preditos na 3'UTR com o auxílio do programa Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Estes *primers* foram usados para amplificar os fragmentos de 3'UTRs selecionados para o ensaio da luciferase. A cada par de *primers* foi adicionado o sítio de restrição para a enzima Xho-I (*primer forward*) ou Not-I (*primer reverse*) e uma extensão (CAGTGACT) que permite o melhor ancoramento da enzima de restrição (Figura 11). Esses sítios de enzima de restrição foram utilizados para a inserção do fragmento no vetor de clonagem (Quadro 7).

Quadro 7. Características dos primers para ampliar os fragmentos das 3'UTRs selecionadas.

(continua)

Gene	Nome dos primers	Sequência 5' → 3'	Fragmento Amplificado
<i>Amd</i>	Amd_frag1_34s1-317s1-7s1-210s1_F Amd_frag1_34s1-317s1-7s1-210s1_R	<u>CAGTGACT/CTCGAG/TGAAACATTCTCCCGTGAAGGAA</u> <u>CAGTGACT/GCGGCCGC/CCTCTCCTCGGTGTTTCAAT</u>	465pb
	Amd_frag2_7s2-317s2-34s2_F Amd_frag2_7s2-317s2-34s2_R	<u>CAGTGACT/CTCGAG/ATAATCTAATATCAAGTTTTCC</u> <u>CAGTGACT/GCGGCCGC/TCCCGTTATTCTCGGATA</u>	353pb
<i>Forked</i>	Forked_frag1_317s1-7s1-34s1_F Forked_frag1_317s1-7s1-34s1_R	<u>CAGTGACT/CTCGAG/TCGCGGACCGTATGCAACGC</u> <u>CAGTGACT/GCGGCCGC/TGTGAAGGGTAAAGAGCAACG</u>	265pb
	Forked_frag2_210s1_F Forked_frag2_210s1_R	<u>CAGTGACT/CTCGAG/TTGTTCCCTATCATGCTAGAGAC</u> <u>CAGTGACT/GCGGCCGC/ACATCCCCACTTGAACAGTTT</u>	396pb
<i>hex70b</i>	Hex70b_frag1_7s1-210s1-34s1_F Hex70b_frag1_7s1-210s1-34s1_R	<u>CAGTGACT/CTCGAG/ACGATAAATATTTTCGTATTAC</u> <u>CAGTGACT/GCGGCCGC/CCGGAATGAAGTCTCTTG</u>	310pb
	Hex70b_frag2_7s2-210s2-317s1_F Hex70b_frag2_7s2-210s2-317s1_R	<u>CAGTGACT/CTCGAG/TCATTTCCGGCACATAAATCAC</u> <u>CAGTGACT/GCGGCCGC/CACATGTATGAACGTACACAGGA</u>	309pb
<i>hex70c</i>	Hex70c_frag1_317s1-7s1-34s1_F Hex70c_frag1_317s1-7s1-34s1_R	<u>CAGTGACT/CTCGAG/GAATTACTGAACGAAAACCTG</u> <u>CAGTGACT/GCGGCCGC/TCGAGGATCACTATGCCAAAC</u>	323pb
	Hex70c_frag2_34s1-210s1_F Hex70c_frag2_34s1-210s1_R	<u>CAGTGACT/CTCGAG/CGAGAACATCTGTATGTCTTTA</u> <u>CAGTGACT/GCGGCCGC/GCAAATTATAATGATGCAAATTAGTTC</u>	294pb
<i>hex110</i>	Hex110_frag1_210s1-34s1-7s1-317s1_F Hex110_frag1_210s1-34s1-7s1-317s1_R	<u>CAGTGACT/CTCGAG/TTTTTCGTCAAGGATGTGCTC</u> <u>CAGTGACT/GCGGCCGC/TTTGAAATCCCCAACTTGTGA</u>	276pb
	Spatzle_frag1_317s1-7s1-34s1_F Spatzle_frag1_317s1-7s1-34s1_R	<u>CAGTGACT/CTCGAG/GTATTTTCGGAGTACCTGATC</u> <u>CAGTGACT/GCGGCCGC/CAAGATGAAAAGCTACATTCTGTG</u>	182pb
<i>nt-1</i>	Spatzle_frag2_210s1-210s2-7s2_F Spatzle_frag2_210s1-210s2-7s2_R	<u>CAGTGACT/CTCGAG/GCAATCAGCAGATCATGTTCA</u> <u>CAGTGACT/GCGGCCGC/ATTGCACCTGCCCAACAAT</u>	205pb

(conclusão)

Gene	Nome dos primers	Sequência 5' → 3'	Fragmento Amplificado
<i>Mas</i>	Mas_frag1_210s1-317s1-7s1_F	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /AGCTGGACTTGTTTCGTGGG	240pb
	Mas_frag1_210s1-317s1-7s1_R	CAGTGACT/ <u>GCGGCCGC</u> /TTTTTCATAAACATTTTGCTAGATACG	
<i>Mas</i>	Mas_frag2_34s1-34s2_F	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /CGCGCTTGATGATGTAACATTTTC	317pb
	Mas_frag2_34s1-34s2_R	CAGTGACT/ <u>GCGGCCGC</u> /TTCAAATGTTGGATAAACGAAA	
<i>Takeout</i>	Takeout_frag1_34s1-7s1_F	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /ACAAGATGGCGGTTAACGAG	363pb
	Takeout_frag1_34s1-7s1_R	CAGTGACT/ <u>GCGGCCGC</u> /GATGATATTGATTTCGATATTATC	
<i>Takeout</i>	Takeout_frag2_317s1_F	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /AACTGGAGGAAAGCTTCGAG	197pb
	Takeout_frag2_317s1_R	CAGTGACT/ <u>GCGGCCGC</u> /CCATAAATACACAATGAGAAAGTATAT	
<i>Takeout</i>	Takeout_frag3_7s3-210s1-210s2_F	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /CAAGCAAAATTATTACAGGCTA	252pb
	Takeout_frag3_7s3-210s1-210s2_R	CAGTGACT/ <u>GCGGCCGC</u> /TTTATCCTGTTTCCTTATAATGAGT	
<i>Amci</i>	Amci_frag1_317s1-34s1_F	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /CGGTTGTCAGTGTCAGGAAG	319pb
	Amci_frag1_317s1-34s1_R	CAGTGACT/ <u>GCGGCCGC</u> /ATGTATCGAGTACACGATAAT	
<i>Amci</i>	Amci_frag2_210s1-210s2-7s1_F	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /AAACGCAAACACGGGTTAAT	307pb
	Amci_frag2_210s1-210s2-7s1_R	CAGTGACT/ <u>GCGGCCGC</u> /TTGTTAACATCCCTTGTTCGAAT	

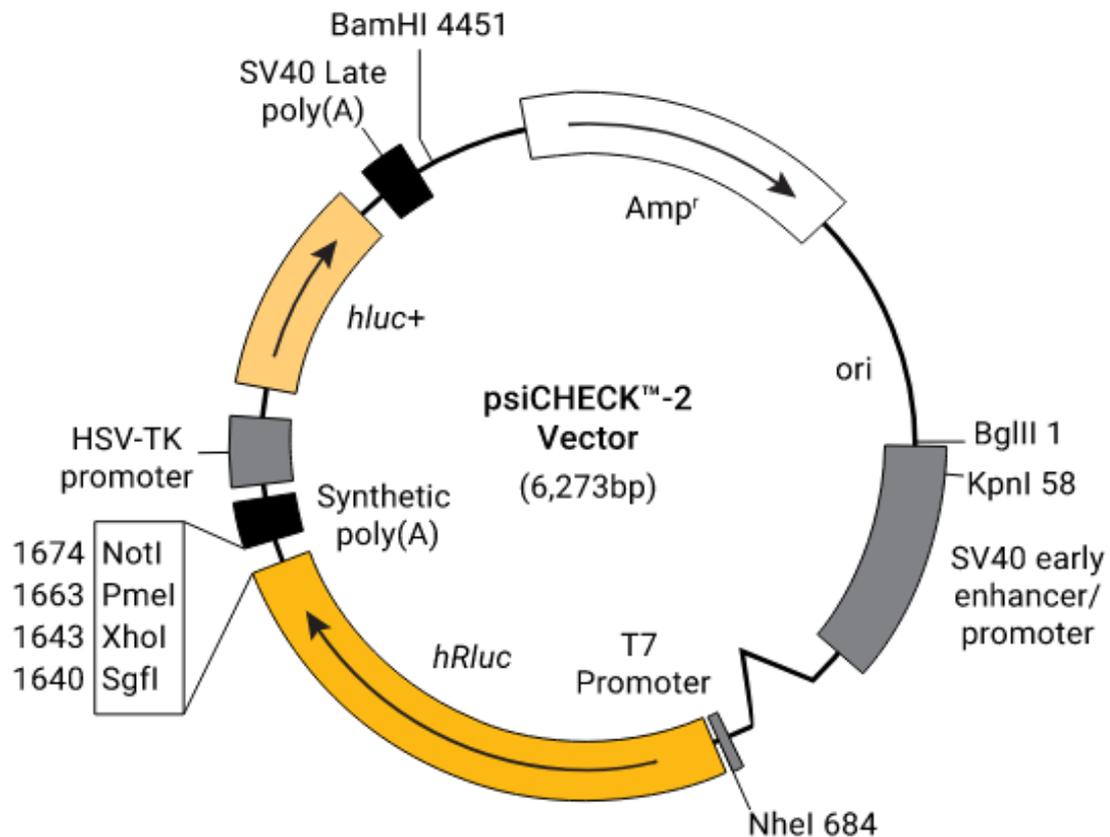
Fonte: Da Autora.

Nota: Os trechos sublinhados correspondem à extensão para o ancoramento das enzimas de restrição (CAGTGACT) e aos sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas Xho-I (CTCGAG) e Not-I (GCGGCCGC).

Inicialmente, as regiões com os sítios preditos de ligação de miRNAs das 3'UTRs de mRNA dos genes candidatos foram amplificadas utilizando *primers* específicos. As amplificações foram realizadas mediante PCR convencional, utilizando-se um *pool* de cDNAs de larvas e pupas de abelhas operárias como molde. A lista de *primers* utilizados encontra-se no Quadro 7. As reações foram feitas com 25  $\mu\text{L}$  de solução *Master Mix* (2X, Eppendorf), 16  $\mu\text{L}$  de água milli-Q autoclavada, 2  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ), e 5  $\mu\text{L}$  de cDNA (concentrado). As reações foram feitas no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*), e a temperatura inicial de pareamento dos *primers* e o número inicial de ciclos foram, respectivamente, 60 °C e 40. Após a amplificação por PCR os fragmentos foram purificados utilizando-se o *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* (*Invitrogen*). Os fragmentos relativos aos genes em estudo foram, seguidamente, inseridos no vetor *psiCHECK2* (*Promega*).

O vetor *psiCHECK2* contém a região codificadora da luciferase do vaga-lume (*Photinus pyralis*, Arthropoda, Insecta) e da luciferase da Renilla (*Renilla reniformis*, Cnidaria, Anthozoa). Esta última contém uma região com múltiplos sítios de restrição na sua extremidade 3', o que permite a inserção dos fragmentos de interesse que serão clonados (Figura 10). Para a inserção, o vetor *PsiCHECK2* (2  $\mu\text{g}$ ) foi digerido por 1,0  $\mu\text{L}$  da enzima *Not-I HF™* (20.000U/mL; *New England Biolabs*) e 1,0  $\mu\text{L}$  de *Xho-I* (20.000U/mL; *New England Biolabs*) em uma reação com 3,0  $\mu\text{L}$  de *CutSmart Buffer* (*New England Biolabs*) e água milli-Q até completar o volume de 30  $\mu\text{L}$ . Os fragmentos purificados (700 ng) foram digeridos por 0,5  $\mu\text{L}$  da enzima *Not-I HF™* (20.000U/mL; *New England Biolabs*) e 0,5  $\mu\text{L}$  de *Xho-I* (20.000U/mL; *New England Biolabs*) em uma reação com 4,0  $\mu\text{L}$  de *CutSmart Buffer* (*New England Biolabs*) e água milli-Q até completar o volume de 40  $\mu\text{L}$ . As reações de digestão foram incubadas por 3 horas a 37 °C, seguido de 30 min a 65 °C para inativação das enzimas.

Figura 11. Organização do vetor psiCHECK2.



Fonte: Promega.

Nota: O vetor psiCHECK 2 é formado por duas sequências promotoras (SV40 early enhancer/promoter e HSV-TK promoter); sítios para enzimas de restrição (NheI, NotI, PmeI, XhoI; SgfI e BamHI); duas sequências poliA (Synthetic poly(A) e SV40 Late poly(A)); gene de resistência à ampicilina; e dois genes de luciferase, sendo um da Renilla (hRluc) e um do vagalume (hluc+).

O vetor PsiCHECK2 digerido foi defosforilado, evitando o religamento das suas extremidades digeridas no passo anterior, por 3  $\mu$ L da enzima *Alkaline Phosphatase* (Promega), 6  $\mu$ L do tampão *Alkaline Phosphatase 10X Reaction Buffer* (Promega) e água milli-Q até completar o volume de 60  $\mu$ L. A reação de defosforilação foi incubada por 2 h a 37 °C, e depois 15 min a 75 °C para inativação da enzima. Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão 1x TAE (diluído a partir de uma solução TAE 50x: 242 g de Tris Base, 57,1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de solução de EDTA dissódico, 0,5 M, pH 8) e corado e contendo 5  $\mu$ L de SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (10.000x concentrado, Invitrogen) por 80 mL de gel. O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado com a migração do marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen). Os géis foram visualizados e fotografados com

auxílio do aparelho Kodak EDAS 290. As bandas correspondentes aos fragmentos de 3'UTRs amplificados foram recortadas do gel de agarose e purificadas para recuperação do DNA puro utilizando-se o (*PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen)*). A reação de ligação, realizada para inserir os fragmentos de 3'UTR amplificados no vetor PsiCHECK2, foi realizada com 2 µl T4 DNA Ligase (*Promega*), 10 µl 2X *Rapid Ligation Buffer*, T4 DNA Ligase (*Promega*), 150 ng dos fragmentos de 3'UTRs digeridos e purificados, 50 ng de vetor PsiCHECK2 digerido e defosforilado e água milli-Q até completar o volume de 20 µL. Após adicionar a solução de ligação, as amostras foram incubadas por 16 horas a 4 °C.

Bactérias quimicamente competentes (*Dh5-Alpha Competent E. coli*) foram misturadas a 40 µL da solução de ligação e deixadas por 30 minutos no gelo. Em seguida, as bactérias foram transfectadas com o vetor PsiCHECK2+3'UTR por choque térmico (42 °C por 45 segundos, imediatamente seguido de dois minutos no gelo). Adicionamos 700 µL de meio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido às bactérias transformadas, as quais foram incubadas por uma hora a 37 °C e 4,3 x g em estufa (*Shel Lab*). As bactérias transformadas foram espalhadas em placas de LB sólido contendo ampicilina (200 ng/µL) e incubadas por 16 horas a 37°C em estufa (*Shel Lab*).

Foram utilizadas reações de PCR com *primers* específicos para o vetor PsiCHECK2 para se identificar as colônias transfectadas com os vetores positivos para a inserção da 3'UTR. Dez microlitros de solução de PCR (5 µL de 2x *Master Mix*; 0,4 µL de 100 µM *primer forward*; 0,4 µL de 100 µM *primer reverse* e água milli-Q q.s.p. 10 µL) foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços. Com auxílio de uma ponteira, as colônias de bactérias foram transferidas para uma nova placa LB. As mesmas ponteiras, contendo bactérias, foram então utilizadas para a realização das reações de PCR, com intuito de se confirmar a inserção dos fragmentos. A amplificação por PCR foi realizada por 40 ciclos (95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos, 72°C por 30 segundos) utilizando-se *primers* que flanqueiam a região multiclonal do vetor PsiCHECK2. As amostras foram aplicadas a gel de agarose 1% (2,5 g agarose, 250 mL Tampão TAE 1x) e visualizadas e fotografadas com auxílio do aparelho Kodak EDAS 290. Após 16 horas, as colônias positivas para o vetor PsiCHECK2+3'UTR foram tocadas com uma ponteira na placa e a ponteira foi colocada em um tubo falcon (15 mL) com 6 mL LB líquido + 6 µL Ampicilina (200 ng/µL) para o crescimento das bactérias. Os tubos falcon foram incubados por 16 horas, a 37 °C, 4.3 g. Então, os

vetores PsiCHECK2+3'UTR foram purificados utilizando-se o *QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN)*.

Para confirmar a sequência dos fragmentos clonados procederam-se reações de sequenciamento independentes nas duas direções (*sense* e *anti-sense*). Foram enviados 20 ng de cada vetor ao Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) que realiza sequenciamento, instalado no Hemocentro da USP, Campus Ribeirão Preto, onde as amostras foram sequenciadas na plataforma HiScan™SQ (Illumina).

### 3.7.3 Transfecção em células HEK293T em cultivo

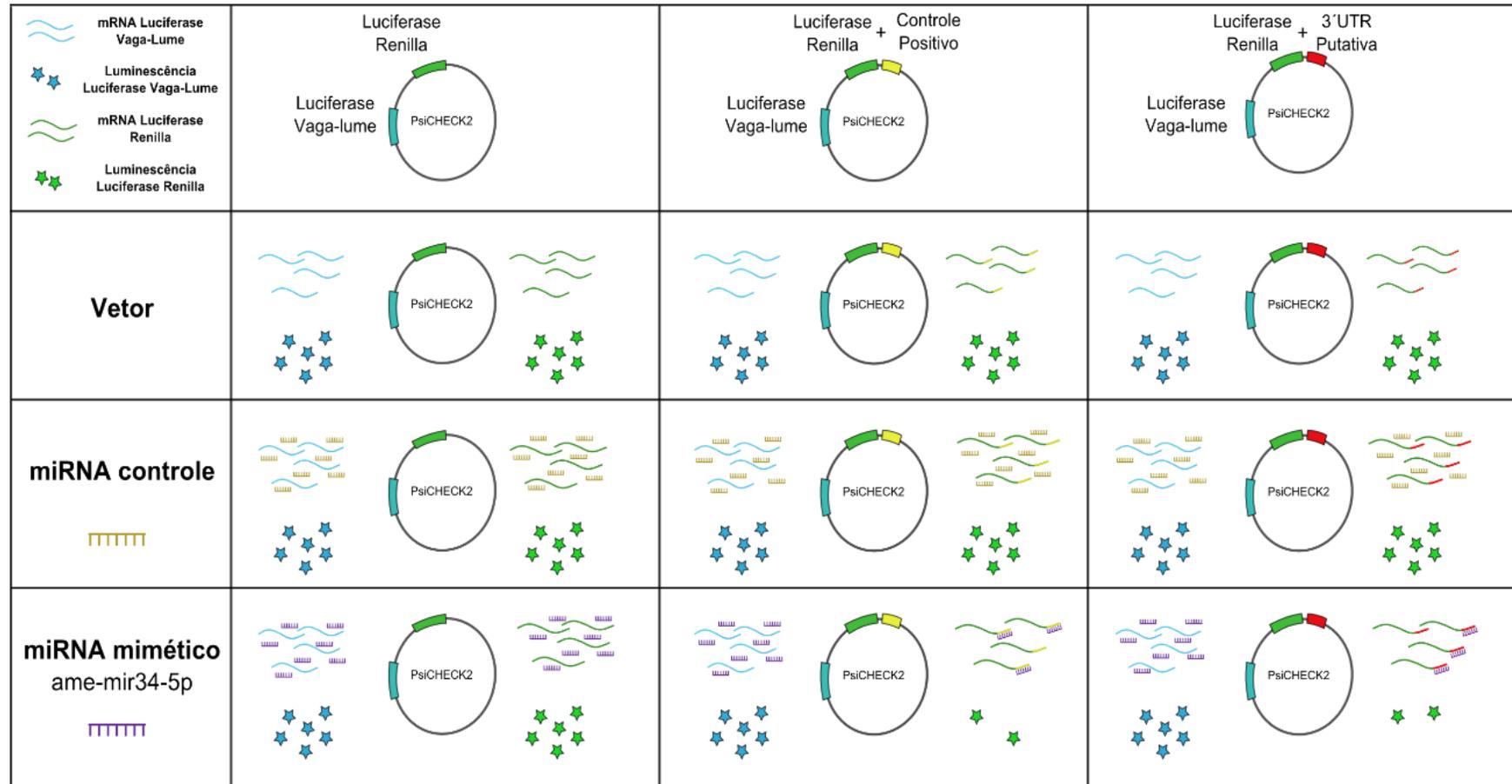
Para os experimentos de transfecção, foram utilizadas as células HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293T cells*) derivadas dos rins de embrião humano (*Thermo Fisher Scientific – R70007*). As células HEK293T foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich), enriquecido com 10% soro bovino fetal (FBS, Invitrogen) inativado por aquecimento (30 minutos, a 56 °C) e Penicilina/Estreptomicina (5000 U/mL e 5000 µg/mL, respectivamente), a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>.

No dia da transfecção, as células HEK293T foram semeadas em placas de 24 poços (0,5x10<sup>5</sup> células/poço) por 24 h. Então, as células HEK293T foram co-transfectadas com 200 ng/poço do vetor PsiCHECK2 (contendo ou não as 3'UTRs candidatas), 40 pmol/poço de miRNA mimético ou sequência controle (outro miRNA mimético) usando 1,5 µL/poço de *Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific)* de acordo com instruções do fabricante. Para cada gene, três condições experimentais foram testadas: 1) apenas o vetor, contendo o fragmento a ser investigado, foi transfectado; 2) o vetor e o miRNA mimético; 3) o vetor e o miRNA controle (Figura 11). Após 24 horas, a solução de transfecção foi removida, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e lisadas em 300 uL *Passive Lysis Buffer (Promega)* em temperatura ambiente por 15 min, 3,3 x g. Dez microlitros do lisado celular foram transferidos para placas de 96 poços (Perkin Elmer). A atividade das luciferases do vaga-lume e da Renilla foram medidas utilizando-se o *kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)*. Foram adicionados 50 µL *luciferase*

*assay reagent II* (LAR II) a cada poço e a atividade da luciferase do vaga-lume foi medida através do luminômetro *FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader*. Na sequência, 50 µL do reagente *Stop&Glo* foi aplicado a cada poço e a atividade da luciferase da Renilla foi obtida. Uma vez que a luciferase do vaga-lume não é perturbada pela inserção de fragmentos espera-se que sua luminescência seja constante independentemente da condição experimental. Assim, a atividade da luciferase do vaga-lume serviu de controle da transfecção do vetor. Por sua vez, a atividade da luciferase da Renilla é diretamente afetada pela regulação pós-transcricional do miRNA, uma vez que este pode ou não alvejar a sequência 3'UTR do gene investigado transcrito juntamente com o gene da Renilla. A razão entre as atividades das luciferase da Renilla e do Vaga-lume (Renilla/Vaga-lume) foi calculada para cada experimento. No caso da razão se manter constante em todas as condições de experimento, o sítio de ligação testado não é real. No entanto, se a razão for menor ou maior na presença do miRNA investigado, conclui-se que houve ligação deste miRNA no sítio predito.

A análise estatística dos resultados do ensaio de luciferase foi feita sobre os valores da razão Renilla/Vaga-lume utilizando-se o *Teste t de Student* ( $p < 0,05$ ), no *software GraphPad Prism v.6*, para identificar aqueles resultados que apresentam diferenças estatísticas.

Figura 12. Condições experimentais para o ensaio da luciferase.



Nota: A sequência controle contém dois sítios de ligação que são perfeitamente pareados pela sequência completa do miRNA. Nas células transfectadas com PsiCHECK2+3'UTR ou Sequência Controle, espera-se uma queda na atividade da luciferase Renilla na presença do miRNA mimético (Retirado, com autorização, de Freitas, 2014).

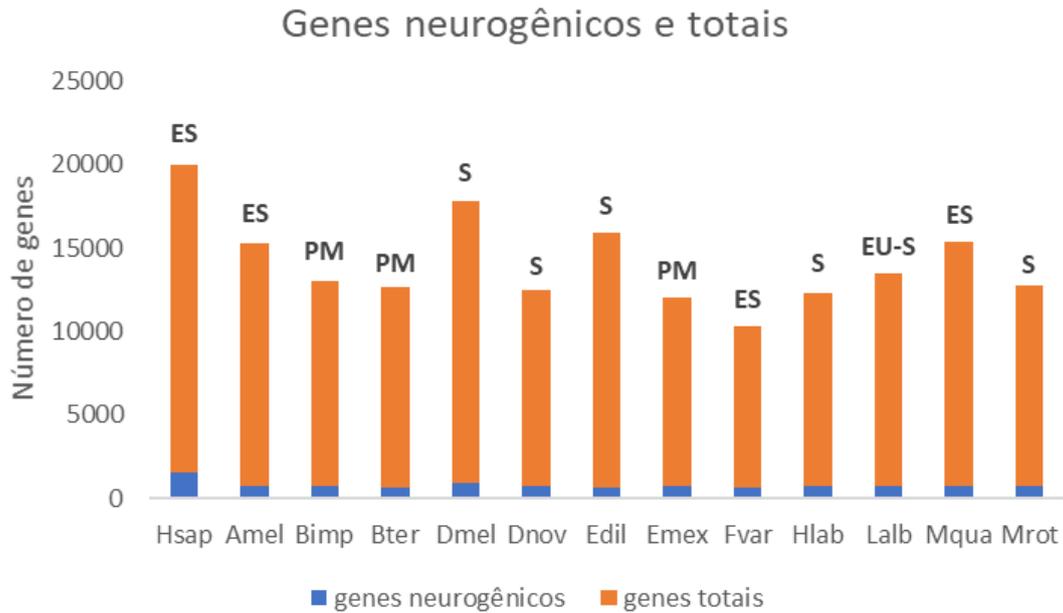
## 4. RESULTADOS

Os resultados obtidos, após análise estatística dos dados coletados durante a execução do presente trabalho, são apresentados a seguir.

### 4.1 Genes neurogênicos clássicos

No marco da abordagem #1 de nosso trabalho, com o objetivo de realizar uma primeira aproximação na determinação do grau de associação entre nível de socialidade de animais modelo e a proporção de genes neurogênicos de seu genoma, analisamos comparativamente os genomas de onze abelhas (com diferentes níveis de socialidade), uma mosca (*D. melanogaster*) e o homem (*H. sapiens*). Realizadas as análises e comparações dos genes neurogênicos clássicos entre as 13 (treze) espécies selecionadas (Figuras 13 e 14 e Quadro 8), encontramos que a proporção destes em relação ao total de genes fica em torno de 4,3 a 5,8% na maioria das espécies de abelhas e em *D. melanogaster*. A espécie *F. varia* (6,51%) é a que se aproxima mais na proporção encontrada para *H. sapiens* (7,94%). Já *A. mellifera*, nosso modelo estudo, está na 11<sup>a</sup> posição (Quadro 8), apresentando a proporção bastante próxima à observada na espécie *M. quadrifasciata*, ambas as abelhas são eussociais.

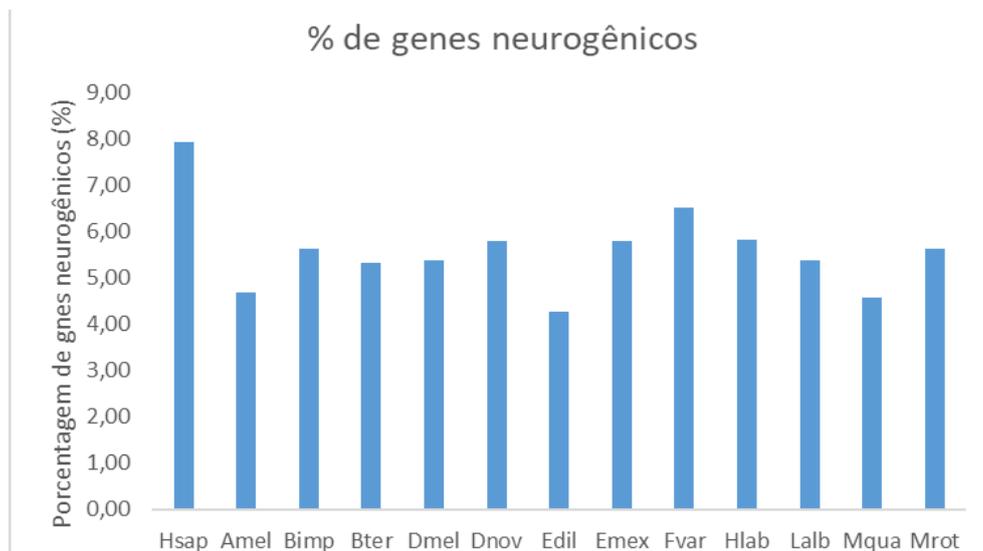
Figura 13. Genes neurogênicos e totais nas espécies selecionadas.



Fonte: Da autora.

Nota: Número de genes neurogênicos e totais para cada espécie. Hsap: *H. sapiens*; Fvar: *F. varia*; Hlab: *H. laboriosa*; Dnov: *D. novaeangliae*; Emex: *E. mexicana*; Mrot: *M. rotundata*; Bimp: *B. impatiens*; Lalb: *L. albipes*; Dmel: *D. melanogaster*; Bter: *B. terrestris*; Amel: *A. mellifera*; Mqua: *M. quadrifasciata*; Edil: *E. dilemma*. S= solitária, PM= primitivamente social, ES= eussocial.

Figura 14. Genes neurogênicos nas espécies selecionadas.



Fonte: Da autora.

Nota: Proporção de genes neurogênicos em relação ao número total de genes. Hsap: *H. sapiens*; Fvar: *F. varia*; Hlab: *H. laboriosa*; Dnov: *D. novaeangliae*; Emex: *E. mexicana*; Mrot: *M. rotundata*; Bimp: *B. impatiens*; Lalb: *L. albipes*; Dmel: *D.*

melanogaster; Bter: *B. terrestris*; Amel: *A. mellifera*; Mqua: *M. quadrifasciata*; Edil: *E. dilemma*.

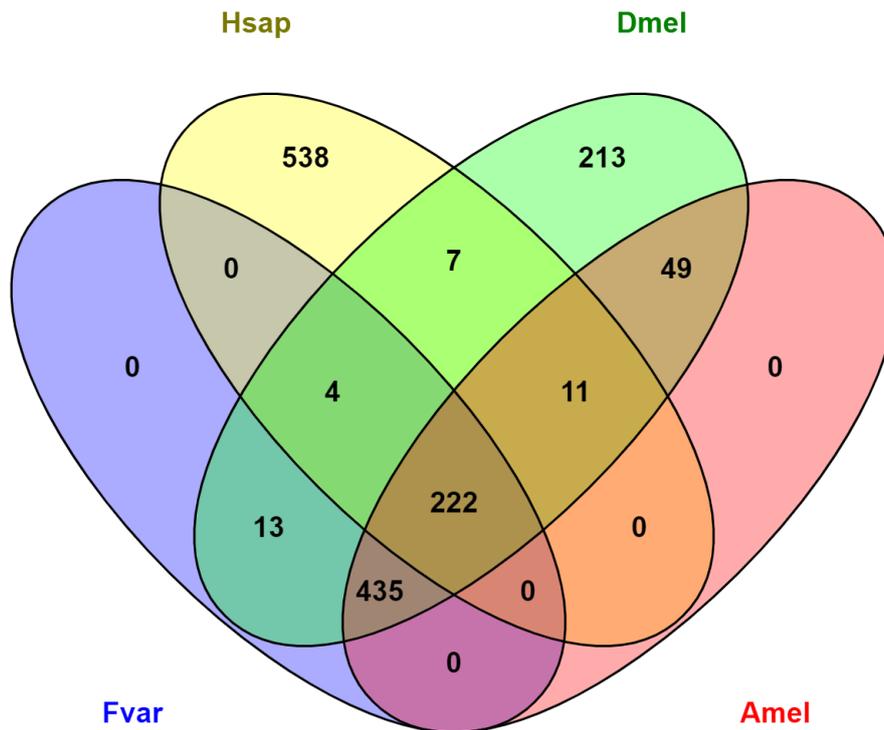
Quadro 8. Proporção do número de genes neurogênicos em relação ao número total de genes nas espécies selecionadas.

Espécies	nº de genes neurogênicos	nº de genes totais	%
Hsap	1586	19.986	7.94
Fvar	674	10.346	6.51
Hlab	715	12.279	5.82
Dnov	721	12.453	5.79
Emex	696	12.022	5.79
Mrot	717	12.770	5.61
Bimp	732	13.050	5.61
Lalb	722	13.448	5.37
Dmel	954	17.792	5.36
Bter	672	12.648	5.31
<b>Amel</b>	<b>717</b>	<b>15.314</b>	<b>4.68</b>
Mqua	703	15.368	4.57
Edil	679	15.904	4.27

Fonte: Da autora.

O diagrama de Venn com os resultados de genes relacionados à neurogênese comuns entre as espécies *A. mellifera*, *F. varia*, *D. melanogaster* e *H. sapiens* (Figura 15) mostra que a maioria dos genes da neurogênese de *A. mellifera* tem ortólogos próximos a outra abelha *F. varia* e a mosca da fruta combinadas (435 genes equivalente a 60,6%), sendo próprios de insetos, e 222 genes (14,9%) são compartilhados entre os quatro organismos analisados. É possível observar que 213 genes são particulares de *Drosophila*, enquanto 538, de humanos. Todos os dados relativos às análises genômicas comparativas apresentados acima formam parte de um manuscrito submetido para publicação (FREITAS et al., 2019).

Figura 15. Conservação de genes neurogênicos entre as espécies *F. varia* (Fvar), *H. sapiens* (Hsap), *D. melanogaster* (Dmel) e *A. mellifera* (Amel).



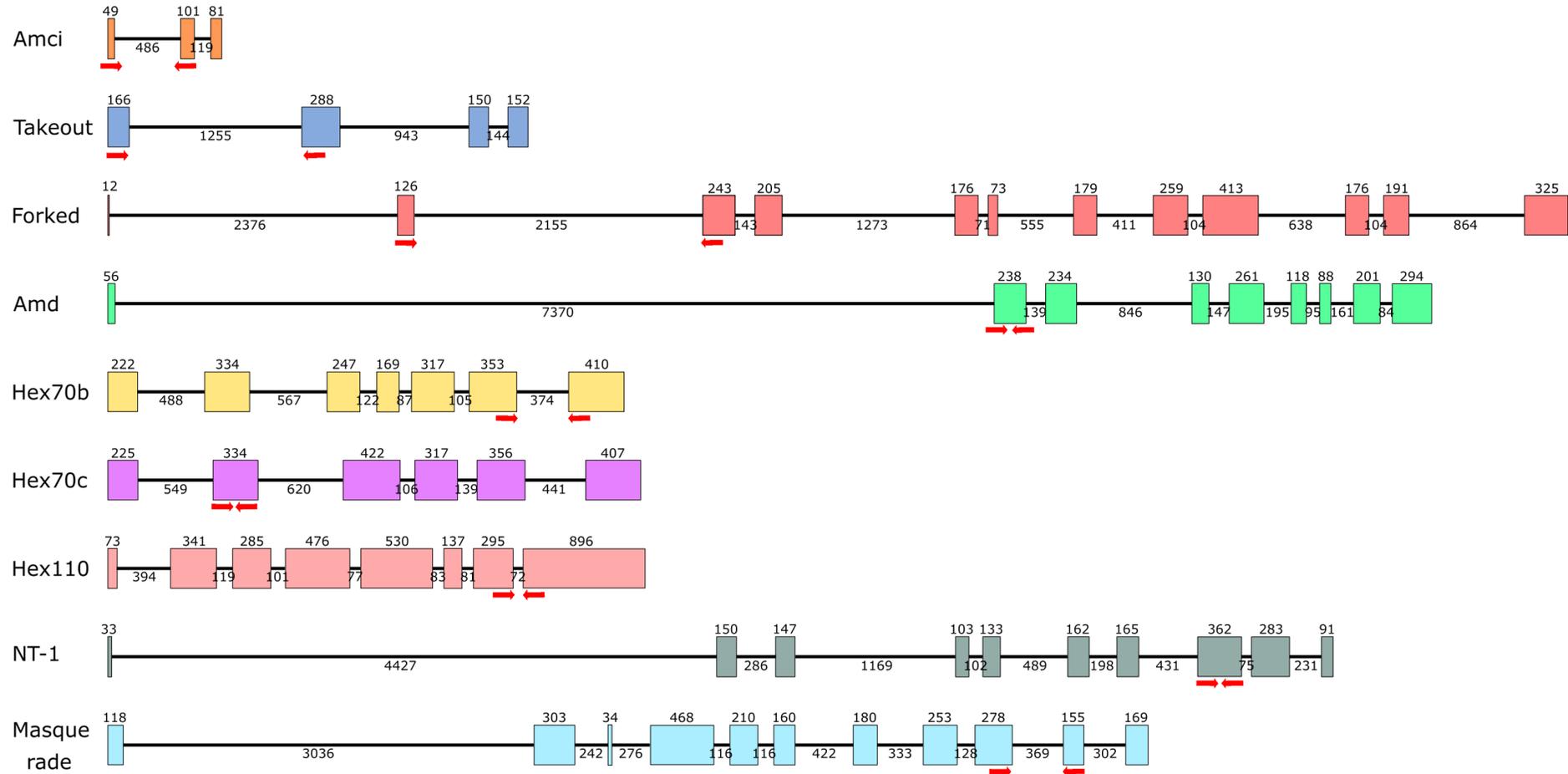
Fonte: Da autora.

#### 4.2 Organização de genes relacionados ao desenvolvimento diferencial do cérebro de larvas L3 de *Apis mellifera*

No marco da abordagem #2, através de análises *in silico*, recuperamos as informações referentes aos nove genes envolvidos na neurogênese em estudo: *amd*, *mas*, *takeout*, *nt-1*, *amci*, *hex110*, *hex70b*, *hex70c* e *forked*, incluindo suas sequências em nucleotídeos pela plataforma Beebase. A maioria destes genes está localizada em diferentes cromossomos, com exceção aos genes *hex70b* e *hex70c* localizados no cromossomo 8, e aos genes *mas* e *amci*, no cromossomo 15. Verificamos a ocorrência de variantes para os genes *amd*, *forked*, *hex110* e *nt-1*, visto que há mais de uma sequência gênica, com pequenas diferenças entre elas, para o mesmo número de referência do gene. Para todos esses genes, as diferenças em nucleotídeos entre as

variantes são muito pequenas, o que dificulta o desenho de oligonucleotídeos específicos para cada uma. Entretanto, validar a expressão gênica de cada variante não é uma questão relevante para este trabalho no momento. A Figura 16 ilustra a organização gênica dos genes selecionados baseando-se na sequência total de seus transcritos obtidos na plataforma Beebase.

Figura 16. Estrutura dos 9 genes relacionados à neurogênese selecionados para as análises deste trabalho.



Fonte: Da autora.

Nota: A estrutura gênica ilustra o tamanho total dos transcritos de cada gene no sentido 5' - 3'. Os éxons estão representados por retângulos preenchidos com cores. Os íntrons estão representados pelas linhas em preto que unem os éxons. O comprimento de retângulos e linhas é proporcional ao número de bases correspondentes a cada éxon ou íntron. As setas vermelhas indicam a localização dos primers, utilizados nos experimentos de PCR em Tempo Real, dentro da estrutura gênica.

### 4.3 Validação dos níveis de transcrição dos GDEs selecionados e perfil de transcrição no período larval em *A. melífera*

#### 4.3.1 Validação dos níveis de transcrição dos GDEs selecionados

Já foi demonstrado que os cérebros de rainhas se desenvolvem mais rapidamente que os cérebros de operárias no estágio larval (MODA et al., 2013). Análises por RNA-Seq com amostras de cérebros das duas castas na fase L3 pidentificaram 60 genes diferencialmente expressos (VIEIRA, 2014). Destes, nove foram selecionados para validação por qPCR, devido a sua possível função exercida no desenvolvimento do cérebro. Primeiramente, foram determinadas as curvas de eficiência dos genes *alpha-methyl dopa hypersensitive protein-like (amd)*, *chymotrypsin inhibitor (amci)*, *takeout*, *forked*, *neurotrophin1 (nt-1)* e *masquerade (mas)*, pois os primers para os genes das *hexamerinas (hex)* já haviam sido previamente testados (MARTINS et al., 2010). As curvas foram obtidas a partir de um *pool* das amostras em estudo. Os parâmetros da curva de eficiência mostraram-se apropriados (Quadro 9), o que permitiu a realização de estimativas de níveis de transcrição mediante a comparação de valores de  $\Delta\Delta C_T$ . Os genes das *hexamerinas* tiveram a sequência de primers retirada de artigo científico (MARTINS et al., 2010) que avaliou a expressão dos mesmos em distintos contextos da biologia de *A. mellifera*.

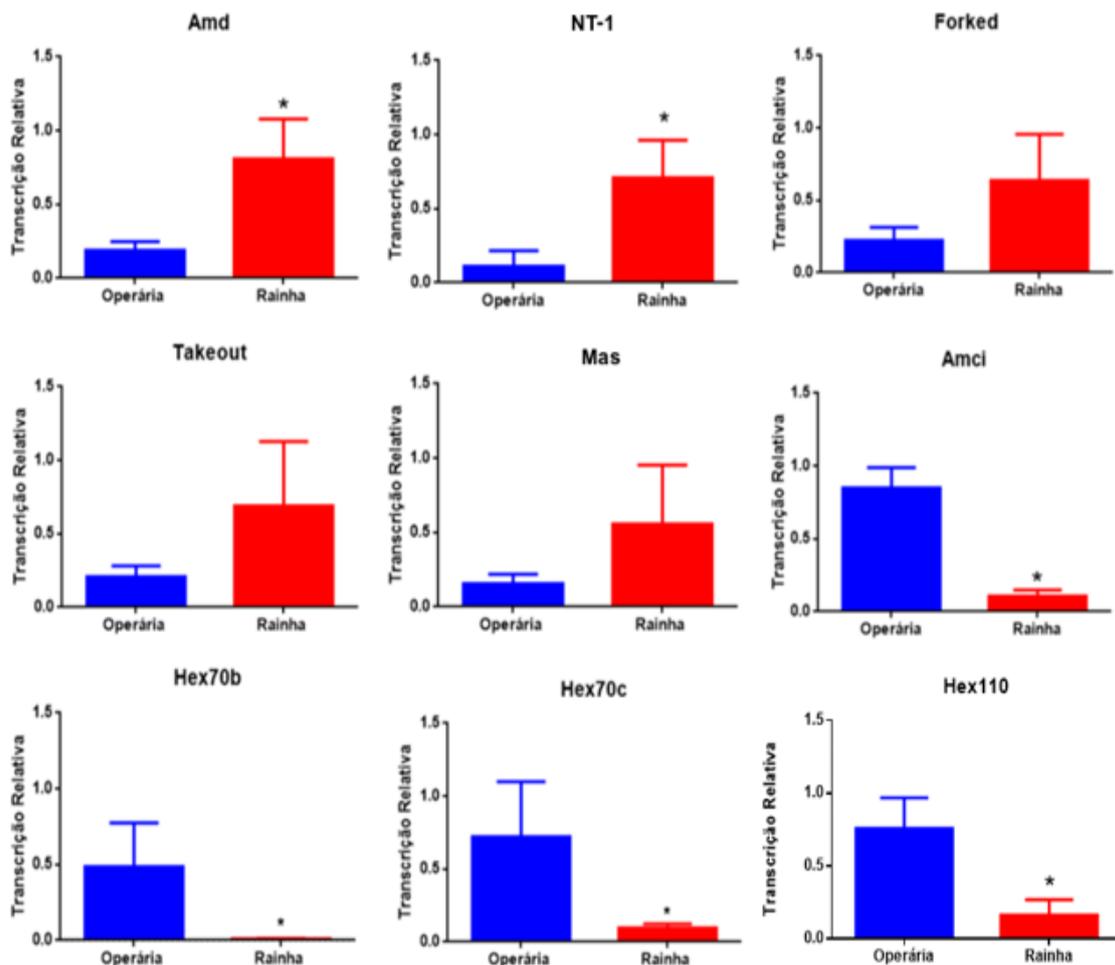
Quadro 9 – Parâmetros obtidos com a curva de eficiência para cada um dos genes selecionados.

GENE	SLOPE	R <sup>2</sup>	EFICIÊNCIA
<i>amd</i>	-3,42	0,990	0,96
<i>amci</i>	-3,60	0,995	0,90
<i>nt-1</i>	-3,60	0,973	0,90
<i>Mas</i>	-3,29	0,958	1,01
<i>forked</i>	-3,48	0,972	0,94
<i>takeout</i>	-3,24	0,984	1,04

Fonte: Da autora.

Os resultados obtidos por qPCR para amostras de cérebros de rainhas e operárias na fase L3 (VIEIRA, 2014) mostraram a mesma tendência de expressão diferencial obtida nos experimentos de RNA-Seq, validando-os: os níveis de transcrição dos três genes *hexamerinas* e do *amci* estimados por qPCR são maiores em operárias na fase analisada (t test  $p < 0,05$ ). O oposto ocorre para os genes *amd*, *nt-1* (t test  $p < 0,05$ ), *forked*, *takeout* e *mas* (não significativamente) que têm seus maiores níveis de transcrição em cérebros de rainhas no mesmo período (Figura 17).

Figura 17. Níveis relativos de transcrição de GDEs no cérebro de larvas L3 de rainhas e operárias



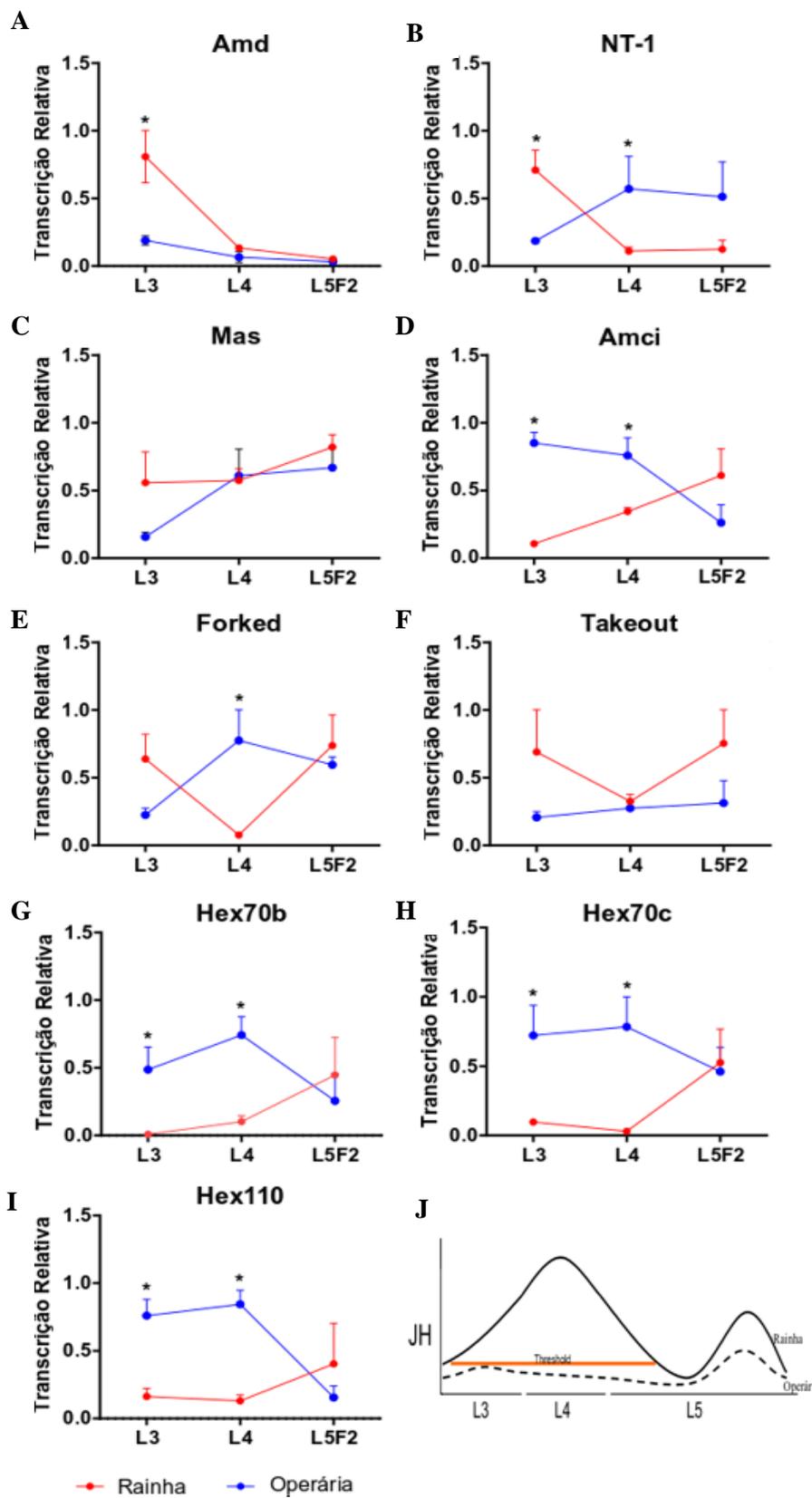
Fonte: Da autora.

Nota: As ordenadas representam os níveis de transcrição relativa avaliados por RT-qPCR. Os dados foram normalizados em relação aos transcritos do gene codificador da proteína ribossomal L32 (RpL32). Três amostras biológicas foram analisadas em triplicata técnica. \*diferença estatisticamente significativa entre as castas (t test unpaired,  $p < 0,05$  quando comparado com operárias).

#### *4.3.2. Perfil de transcrição de GDEs no cérebro de larvas de rainhas e operárias*

Validados os resultados do RNA-Seq, determinamos o perfil de transcrição dos 9 GDEs durante o período larval (fases L3, L4, L5F2) de rainhas e operárias por qPCR (Figura 18).

Figura 18. Perfil de transcrição dos 9 GDEs encontrados em cérebros de rainhas e operárias de *A. mellifera* durante o período larval (A-I).



Fonte: Da autora.

Nota: As ordenadas representam os níveis de transcrição relativa avaliados por RT-qPCR. Os dados foram normalizados em relação aos transcritos do gene codificador da proteína ribossomal L32 (RpL32). Três amostras biológicas foram analisadas em triplicata técnica. \*diferença estatisticamente significativa entre as castas (t test unpaired,  $p < 0,05$ , quando comparado com operárias). J - Perfil hemolinfáticos do hormônio juvenil (JH) durante o desenvolvimento pós-embrionário de castas de *Apis mellifera* (adaptado de Barchuk et al., 2007).

Os resultados referentes a *amd* revelam que sua expressão é aumentada em cérebros de rainhas no início de desenvolvimento larval (L3). Essa expressão diminui nos períodos subsequentes em rainhas e se mantém em nível baixo em todas as fases larvais analisadas em operárias sem apresentar diferenças estatisticamente significantes entre as castas nas fases L4 e L5 (t test  $p < 0,05$ ; Figura 18-A).

Conforme pode ser observado na Figura 18-B, o perfil de expressão do gene que codifica para proteína neurotrofina-1 (*nt-1*) apresenta diferença estatística favorecendo os cérebros de rainhas no início do desenvolvimento larval (L3), invertendo o favorecimento entre as castas na fase seguinte (L4) (t test  $p < 0,05$ ). Já na fase L5F2 o nível de expressão pouco se altera em relação à fase anterior analisada, mas não apresenta diferença entre as castas.

Ao longo do período analisado, a expressão da serino-protease *mas* mostrou-se similar entre as castas. Na fase larval L3 a expressão em rainhas excede a de operárias, porém não apresenta diferença estatística entre os dados (Figura 18-C). Como resultado para o inibidor de tripsina *amci* (Figura 18-D), obtivemos maior expressão em cérebros de operárias nas duas primeiras fases larvais analisadas (L3 e L4). O perfil de expressão de operárias apresenta queda ao longo do período analisado, ao contrário o perfil obtido em rainha é crescente no mesmo período. Na fase L5F2, os resultados obtidos para as duas castas não apresentam diferença de expressão.

Analisando a correlação de Pearson entre os perfis de transcrição dos genes *mas* e *amci* em operárias obtivemos resultado de correlação negativa de aproximadamente -0,72. Esse resultado reforça a proposição de que esses genes atuam de forma antagônica nos indivíduos da casta analisada.

O resultado das análises de *forked* ao longo do período estudado mostra que sua expressão é similar entre as castas, exceto em L4, momento em que a expressão em operárias excede a de rainhas (t test  $p < 0,05$ ; Figura 18-E).

Na figura 18-F está representado o perfil de expressão de *takeout*. Nela é possível verificar que o transcrito mostrou expressão baixa em operárias em todo o período analisado. O gráfico que representa a expressão de *takeout* em rainhas tende para uma parábola contrária à observada no mesmo período para o HJ (Figura 18-J).

Com relação aos genes de hexamerinas, o resultado inicial mais interessante foi o de que estas são transcritas no cérebro durante o desenvolvimento larval. Além disso, os resultados revelaram um mesmo perfil para as três hexamerinas analisadas (*hex70b*, *hex70c*, *hex110*): a expressão é aumentada em cérebros de operárias nas primeiras fases larvais analisadas (L3 e L4). Essa expressão diminui nos períodos subsequentes em operárias e aumenta em rainhas sem, no entanto, apresentar diferenças estatisticamente significantes entre as castas na fase L5F2 (Figura 18-G-I).

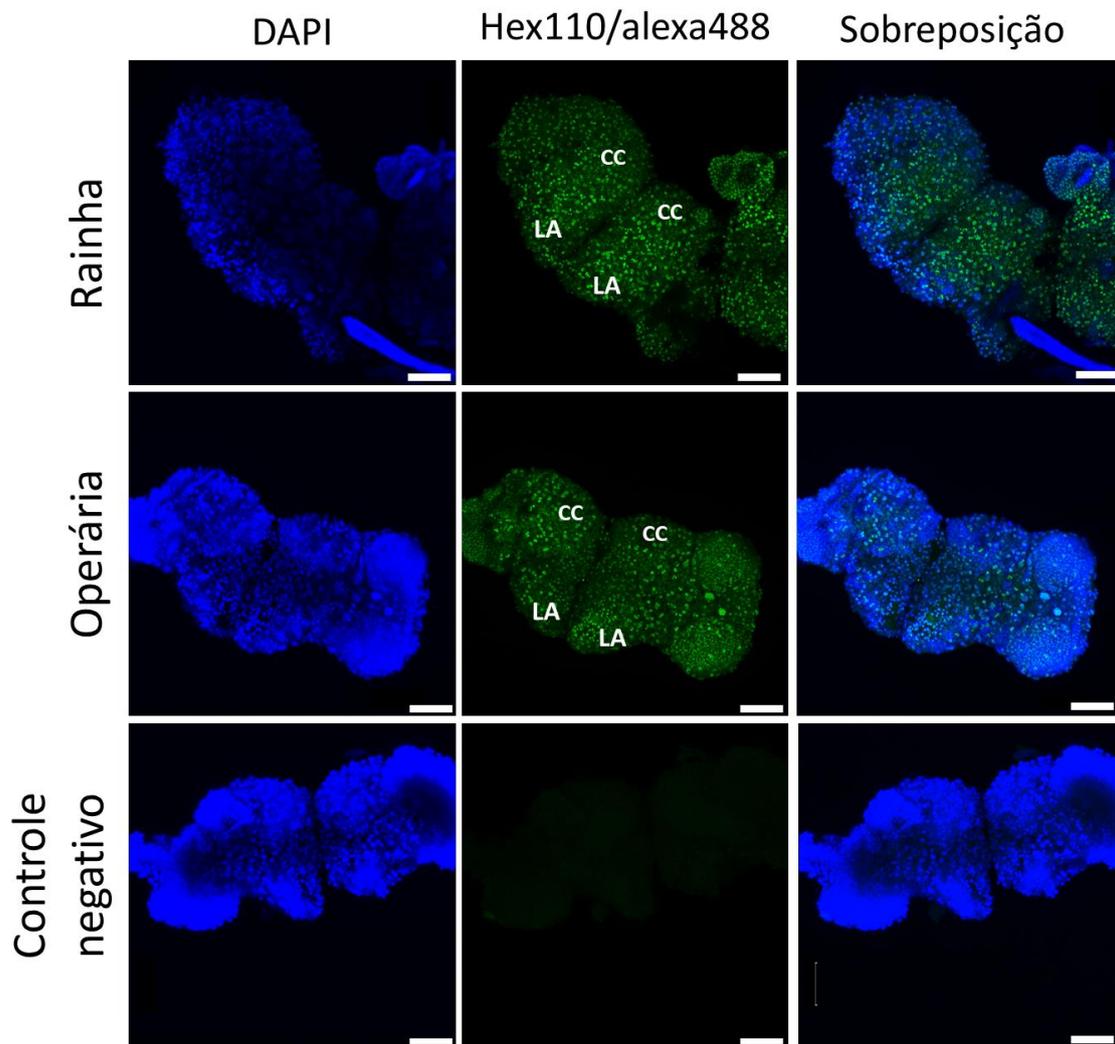
Foram calculadas as correlações de Pearson para o perfil transcrucional das três Hexamerinas estudadas neste trabalho. A expressão destes genes nos cérebros de rainhas e operárias apresenta correlação negativa entre as castas, sendo -0,99 para os genes *hex70c* e *hex110*, e -0,72 para *hex70b*. A correlação também foi calculada entre a expressão das três hexamerinas dentro de uma mesma casta. O resultado para ambas as castas foi de correlação positiva acima de 0,90, mostrando que as hexamerinas apresentam perfis de transcrição na fase larval semelhantes entre elas.

#### 4.4 Localização da proteína Hex110 em cérebro de larvas de rainhas e operárias

Através dos experimentos de qPCR utilizando amostras de cérebros de rainhas e operárias no estágio larval, mostramos que o gene *hex110* é mais transcrito em operárias nas fases L3 e L4. Neste período, decidimos determinar se a expressão da proteína segue o mesmo *timing* da transcrição do gene e, sendo assim, seria responsável de alguma forma pelo desenvolvimento diferencial do cérebro observado no estágio larval L4. Em nossos ensaios de imunolocalização, os cérebros foram preparados seguindo protocolo descrito na sessão 3.5 (material e métodos) utilizando DAPI e anticorpo policlonal Hex110 seguido do anticorpo secundário anti-coelho Alexa Flúor-488. Os resultados mostraram que a proteína Hex110 é detectada em cérebros de rainhas e operárias L3 e L4 (Figuras 19-22). No estágio L3 nota-se que a proteína Hex110 está

distribuída de forma homogênea por toda a estrutura cerebral nas duas castas (Figura 19). Analisando o material com uma objetiva de maior aumento, conseguimos detectar que essa marcação está dentro do núcleo (figura 20). Quando se analisa a fase L4, percebe-se que a marcação de Hex110 está, de forma similar a L3, dentro dos núcleos. No entanto, sua distribuição na estrutura cerebral é diferente entre as castas: em operárias, a Hex110 está homogeneamente distribuída por toda a estrutura cerebral, enquanto que em rainhas a marcação parece se concentrar nas regiões onde estão os lobos antenais (LA) e lobos ópticos (LO), estando menos aparente nos corpos cogumelares (CC) (Figuras 21 e 22).

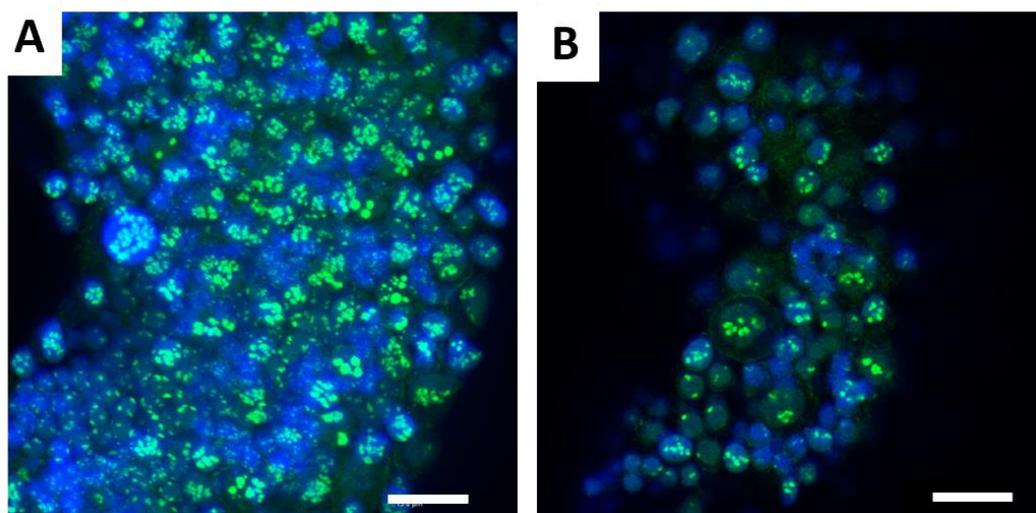
Figura 19. Reconstrução tridimensional total de cérebros de abelhas rainhas e operárias em estágio L3 imunolocalizados com anticorpo Hex110/Alexa488, objetiva de 10X.



Fonte: Da autora.

Nota: O controle negativo, utilizando apenas anticorpo secundário está representado. Não há diferenças na localização da proteína Hexamerina 110 entre as castas. CC: corpos cogumelares, LA: lobos antenais. Escala: 50  $\mu$ m.

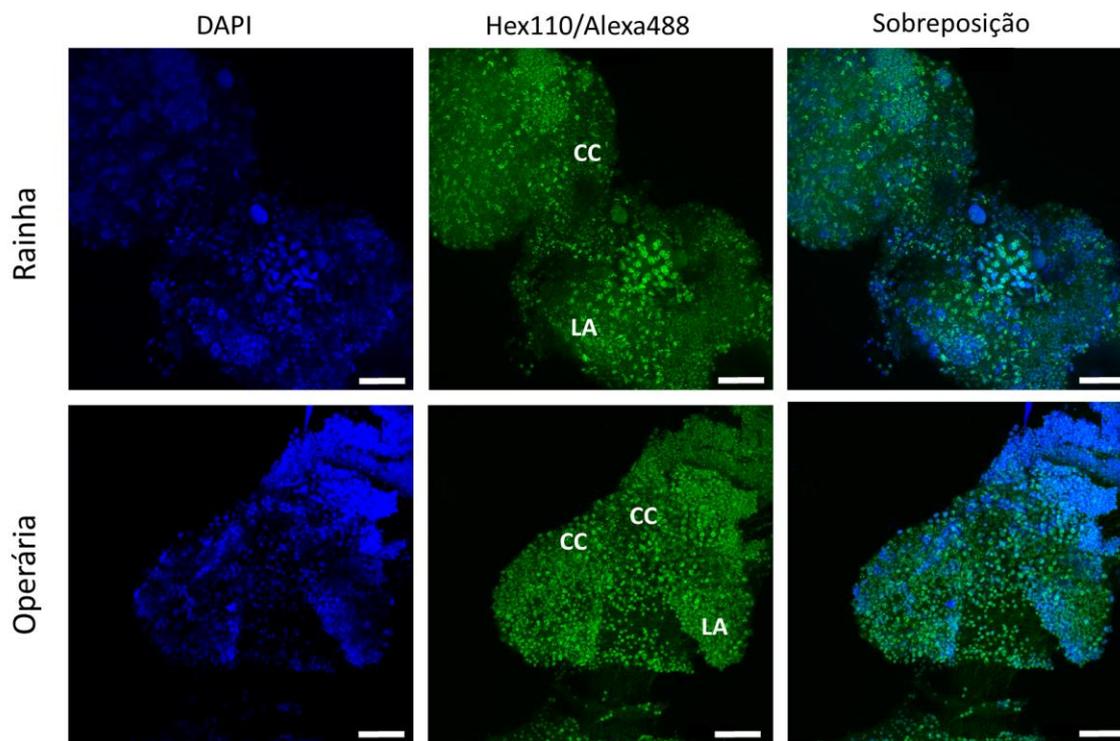
Figura 20. Localização nuclear da proteína Hex110 em cérebro de abelhas em estágio L3.



Fonte: Da autora.

Nota: A. Reconstrução tridimensional total e B. Plano focal. Azul: DAPI, verde: Hex110/Alexa488. Escala: 15  $\mu$ m.

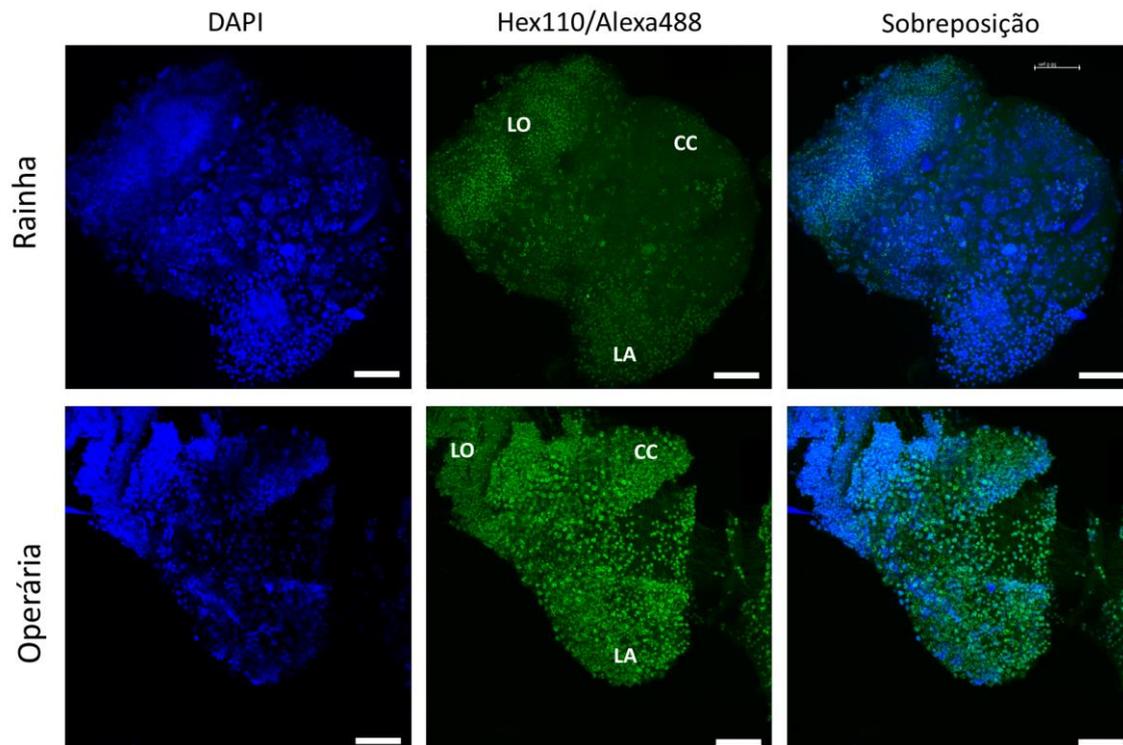
Figura 21. Reconstrução tridimensional total de cérebros de abelhas rainhas e operárias em estágio L4 imunolocalizados com anticorpo Hex110/Alexa488, objetiva de 10X.



Fonte: Da autora.

Nota: A localização de Hex110 é diferente em operárias e rainhas. Em operárias a marcação Hex110/Alexa488 está homogeneamente distribuída pelo cérebro, enquanto em rainhas há maior concentração nos lobos antenais (LA). Escala: 50  $\mu$ m.

Figura 22. Reconstrução tridimensional total de cérebros de abelhas rainhas e operárias em estágio L4 imunolocalizados com anticorpo Hex110/Alexa488, objetiva de 10X.



Fonte: Da autora.

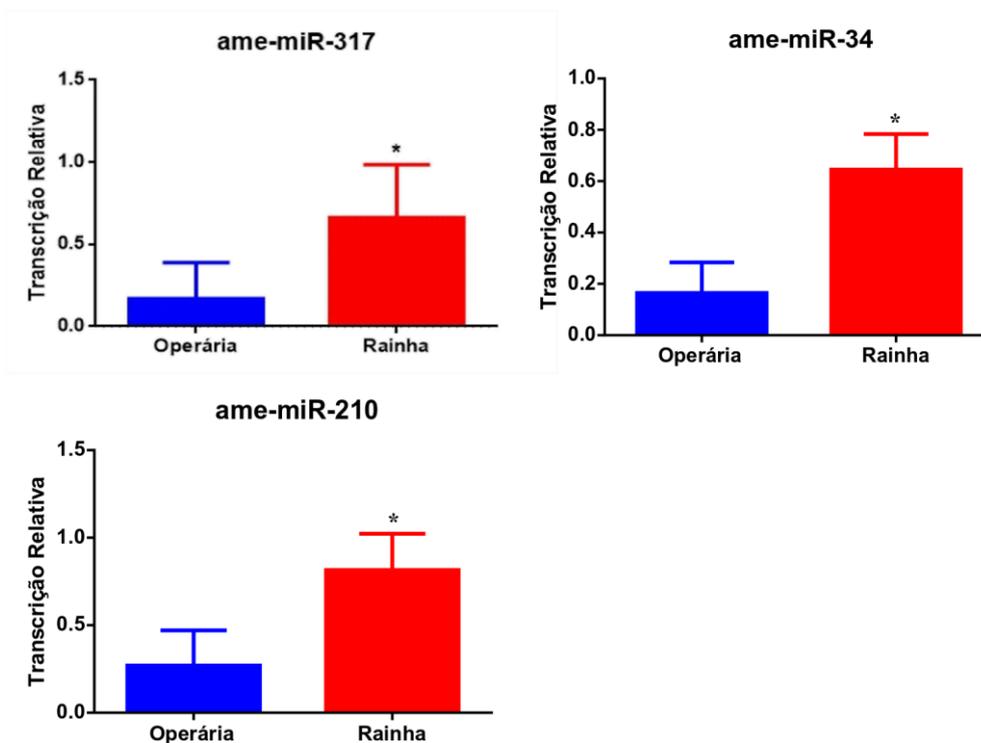
Nota: Apenas um hemisfério cerebral está representado nesta figura. A localização de Hex110 é diferente em operárias e rainhas, sendo que em operárias a marcação Hex110/Alexa488 está homogeneamente distribuída pelo cérebro, enquanto em rainhas há maior concentração nos lobos antenais (LA) e nos lobos ópticos (LO). Escala: 50 $\mu$ m.

#### 4.5 Identificação de interações miRNA-mRNA alvo

##### 4.5.1 Determinação dos níveis de microRNAs em cérebros de rainhas e operárias

Os níveis dos três miRNAs selecionados para este trabalho, *miR-210*, *miR-34* e *miR-317*, foram determinados por qPCR em cérebros de rainhas e operárias na fase larval L3 de *A. mellifera*. Como mostra a Figura 23, os três miRNAs estão mais presentes nos cérebros de rainhas na fase larval L3 (t test  $p < 0,05$ ).

Figura 23. Nível de miRNAs nos cérebros de rainhas e operárias na fase L3.



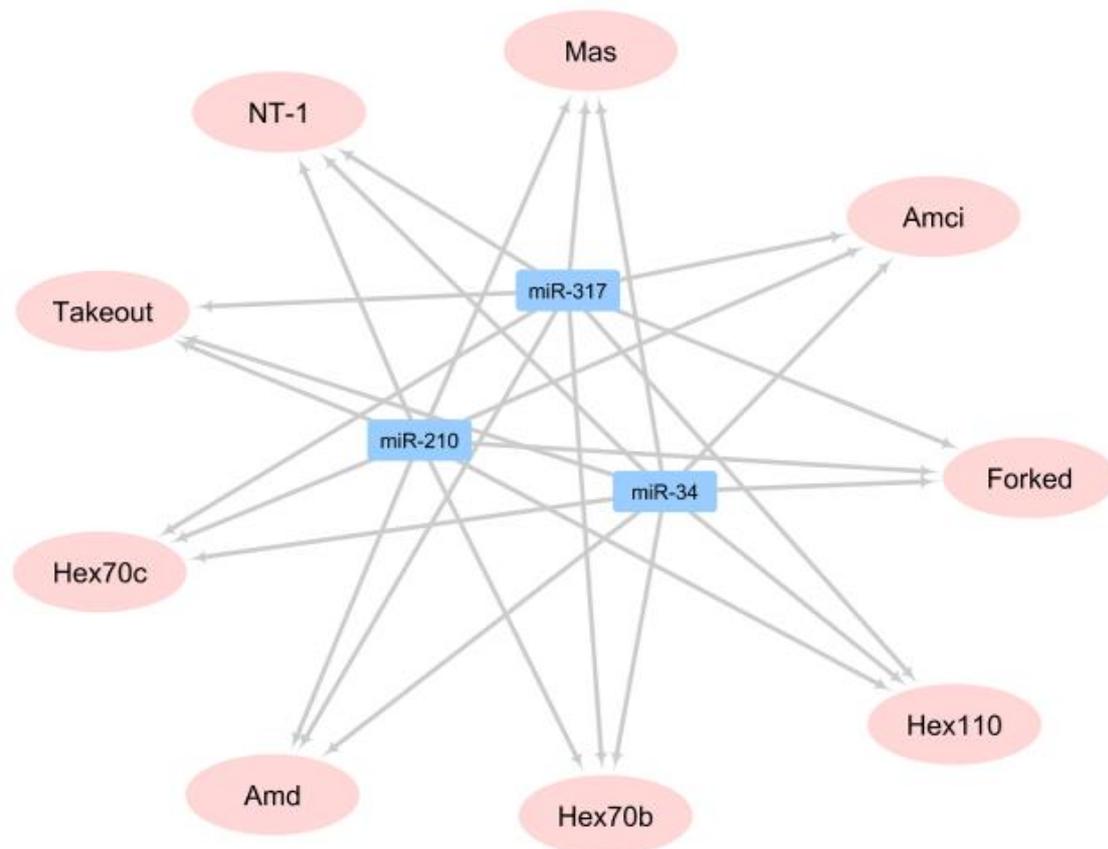
Fonte: Da autora.

Nota: As ordenadas representam os níveis relativos avaliados por RT-qPCR. Os dados foram normalizados em relação aos transcritos do RNA U5 snRNA. Três amostras biológicas foram analisadas em triplicata técnica. \*diferença estatisticamente significativa entre as castas (t test unpaired,  $p < 0,05$  quando comparado com operárias).

#### 4.5.2 Redes de interação miRNAs-mRNAs e validação de sítios de ligação

Através das nossas análises pela ferramenta *RNAhybrid*, conseguimos determinar potenciais sítios de ligação dos 3 miRNAs selecionados nas 3'UTRs dos nove GDEs em estudo. Como é possível observar na rede de interação mostrada na Figura 24, os nove GDEs possuem sítios de ligações putativos para os três miRNAs selecionados. Vale ressaltar que para alguns genes foram selecionados mais de um sítio para um mesmo miRNA, uma vez que já se sabe que o mesmo pode apresentar mais de um sítio de interação com a 3'UTR de um transcrito. Ao todo selecionamos 36 sítios de interação como candidatos para validação, agrupados em 18 fragmentos de 3'UTR (Quadro 10 e Figuras 25-33).

Figura 24. Rede de interação mRNA-miRNA.



Fonte: Da autora.

Nota: As elipses rosas representam os mRNAs, os retângulos azuis representam os miRNAs e as linhas cinzas, as interações mRNAs-miRNAs preditas pelo software RNAhybrid.

Quadro 10. Número de sítios preditos para interação entre os três miRNAs (miR-317, miR-34 e miR-210) e o os nove GDEs e fragmentos de 3'UTRs onde estão localizados estes sítios.

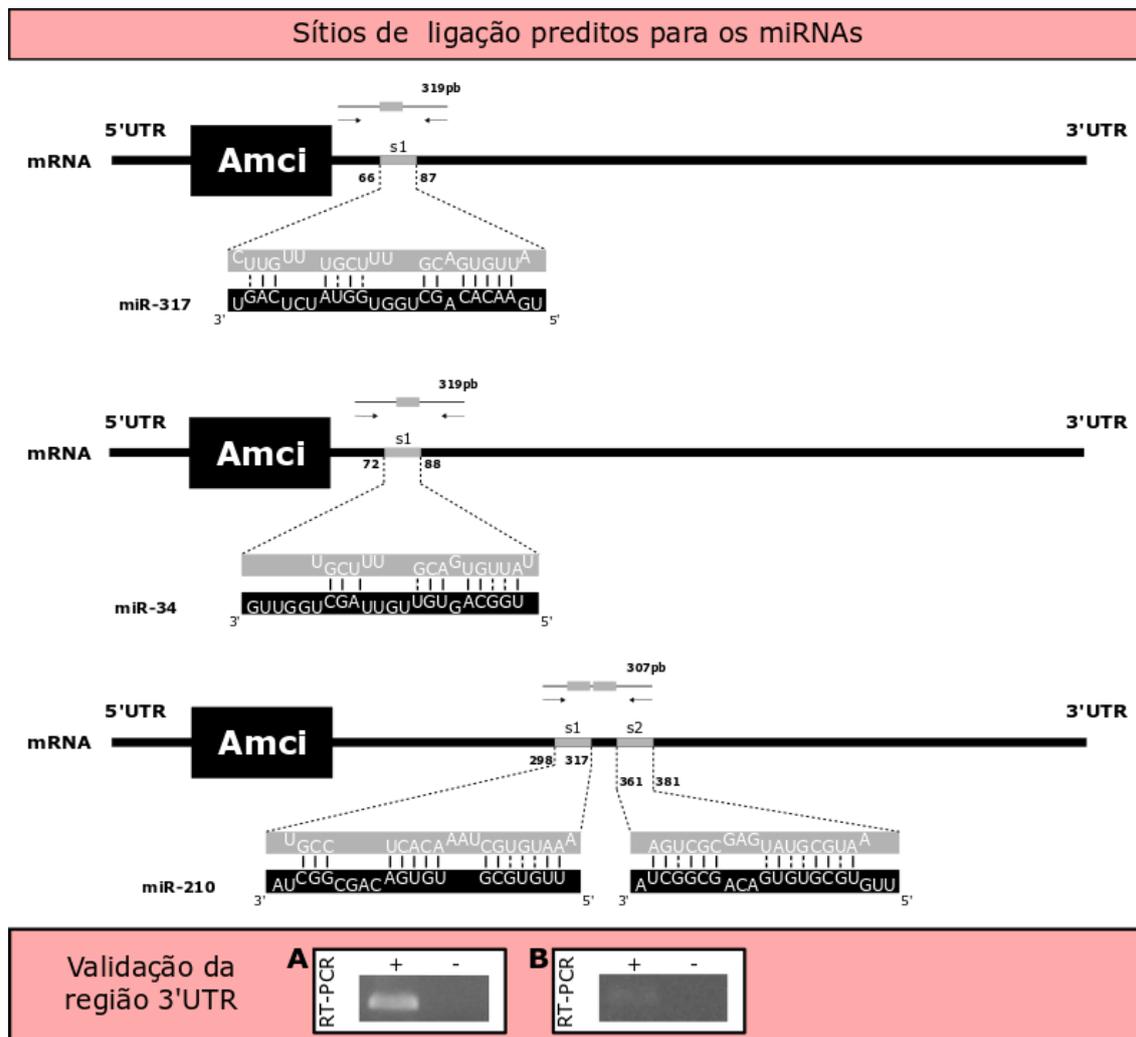
<b>Gene</b>	<b>miR-317</b>	<b>miR-34</b>	<b>miR-210</b>	<b>Fragmento 3'UTR</b>
<i>amci</i>	1	1	2	2
<i>amd</i>	2	2	1	2
<i>forked</i>	1	1	1	2
<i>hex70b</i>	1	2	2	2
<i>hex70c</i>	1	2	1	2
<i>hex110</i>	1	1	1	1
<i>mas</i>	1	2	1	2
<i>nt-1</i>	1	1	2	2
<i>takeout</i>	1	1	2	3

Fonte: Da autora.

Para verificar se os *miR-34*, *miR-317* e *miR-210* regulam os alvos preditos em nossa análise *in silico* (Figura 24), primeiramente, as regiões dos respectivos cDNAs (de genes alvo) que contêm sítios de ligação putativos foram amplificadas e inseridas no vetor para uso no ensaio da luciferase. O fato de termos amplificado fragmentos da 3'UTR dos genes investigados por RT-PCR valida algumas das sequências 3'UTRs usadas nas predições de sítios de ligação para os miRNAs e os resultados da amplificação desses fragmentos estão destacados nas Figuras 25-33. Para cada gene, encontramos pelo menos um sítio de ligação de cada miRNA.

Dos 18 fragmentos de 3'UTR identificados inicialmente contendo sítios potenciais de ligação de microRNAs, foram validados 15 por RT-PCR (faixa rosa inferior das Figuras 25-33). Aqueles não validados foram o fragmento de 353 pb do gene *amd* (incluindo os sítios para *miR-317* e *miR-34*), o fragmento de 317 pb do gene *mas* (incluindo os sítios para *miR-34*) e o fragmento de 252 pb do gene *takeout* (incluindo os sítios para *miR-210*). A validação dessas regiões é importante, pois usamos a 3'UTR putativa para cada gene (região de 1.000 pb anterior à região codificadora do gene).

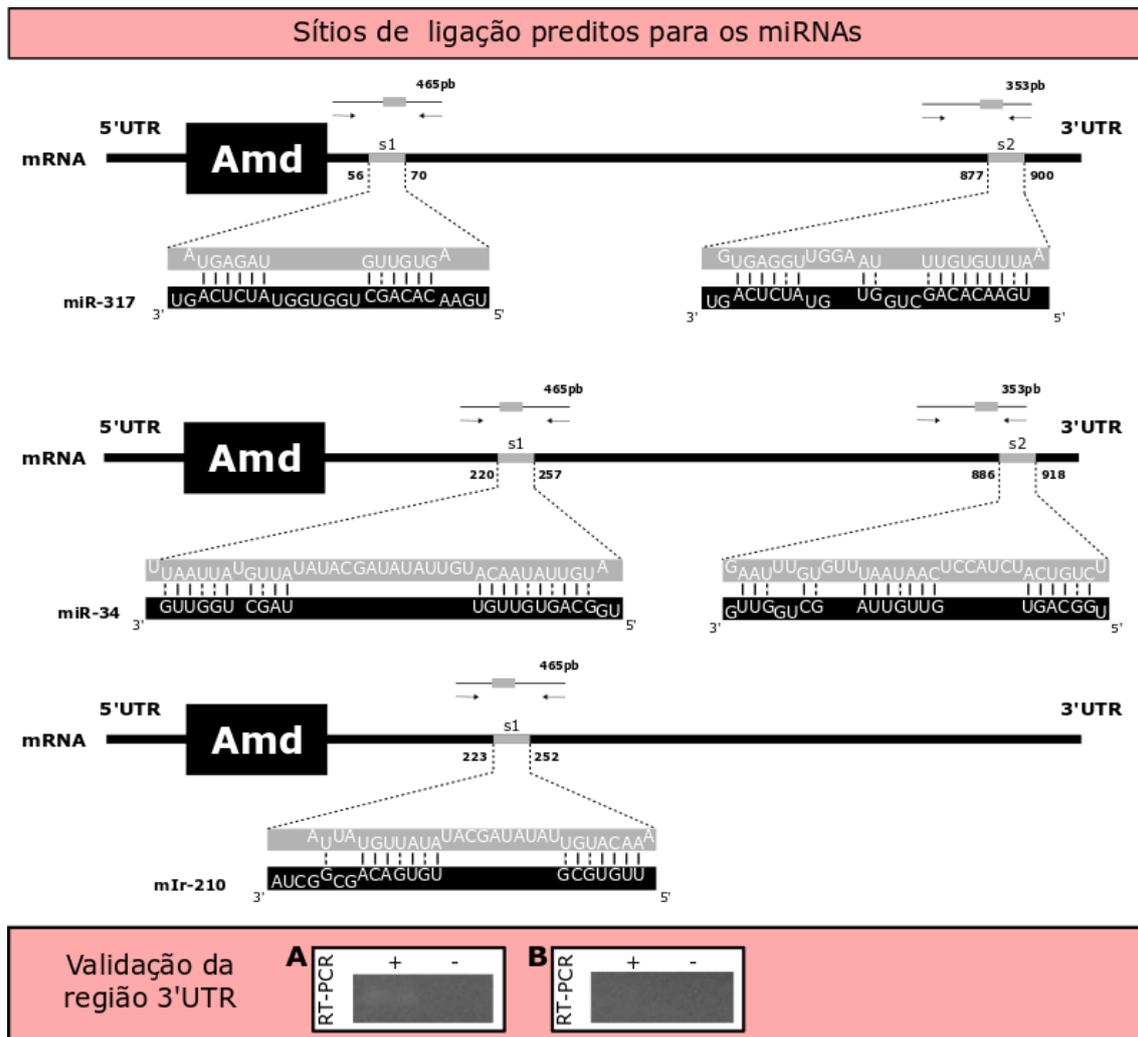
Figura 25. Representação dos sítios de ligação preditos para os miRNAs *miR-317*, *miR-34* e *miR-210* na 3'UTR do gene *amci* de *A. mellifera* e validação de sequências.



Fonte: Da autora.

Nota: A região codificadora do gene *amci* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para os miRNAs (retângulos cinzas), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. Os dois fragmentos amplificados por RT-PCR (validados) e seus respectivos controles negativos (ausência de cDNA na reação de RT-PCR) estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura. A – corresponde ao fragmento de 319 nt (incluindo os sítios para *miR-317* e *miR-34*); B – corresponde ao fragmento de 307 nt (incluindo o sítio *miR-210*). Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

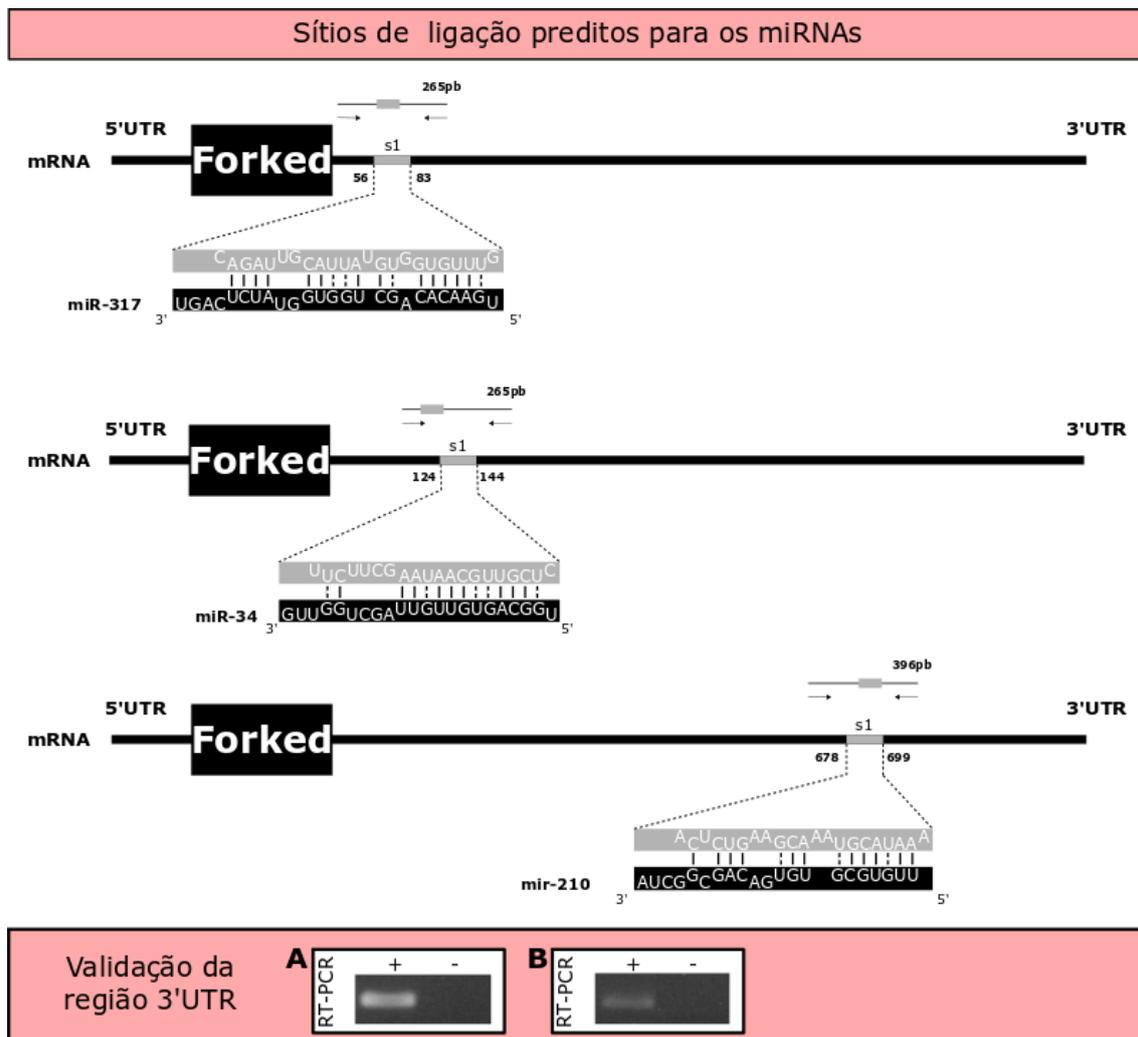
Figura 26. Representação dos sítios de ligação preditos para miRNAs *miR-317*, *miR-34* e *miR-210* na 3'UTR do gene *amd* de *A. mellifera* e validação de sequências.



Fonte: Da autora.

Nota: A região codificadora do gene *amd* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para os miRNAs (retângulos cinzas), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. Os dois fragmentos amplificados por RT-PCR (validado apenas o correspondente a 465pb) e seus respectivos controles negativos (ausência de cDNA na reação de RT-PCR) estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura: A – corresponde ao fragmento de 465 nt (incluindo os sítios para miR-317, miR-34 e miR210); B – corresponde ao fragmento de 353 nt (incluindo os sítios para miR-317 e miR-34). Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

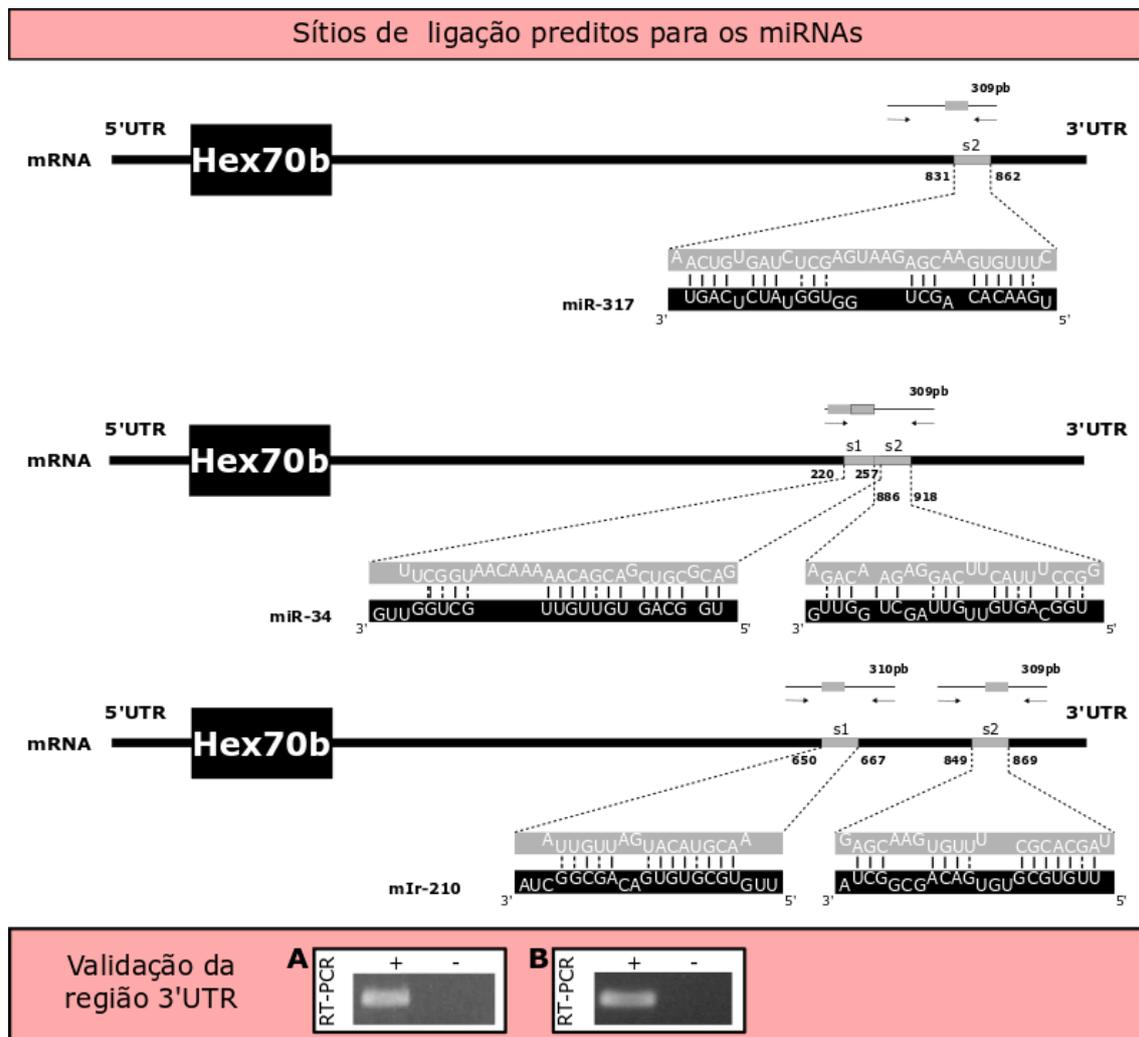
Figura 27. Representação dos sítios de ligação preditos para os miRNAs *miR-317*, *miR-34* e *miR-210* na 3'UTR do gene *forked* de *A. mellifera* e validação de sequências.



Fonte: Da autora.

Nota: A região codificadora do gene *forked* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para os miRNAs (quadrados pretos menores), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. Os dois fragmentos amplificados por RT-PCR (validados) e seus respectivos controles negativos (ausência de cDNA na reação de RT-PCR) estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura: A – corresponde ao fragmento de 265 nt (incluindo os sítios para *miR-317* e *miR-34*); B – corresponde ao fragmento de 396 nt (incluindo o sítio para *miR-210*). Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

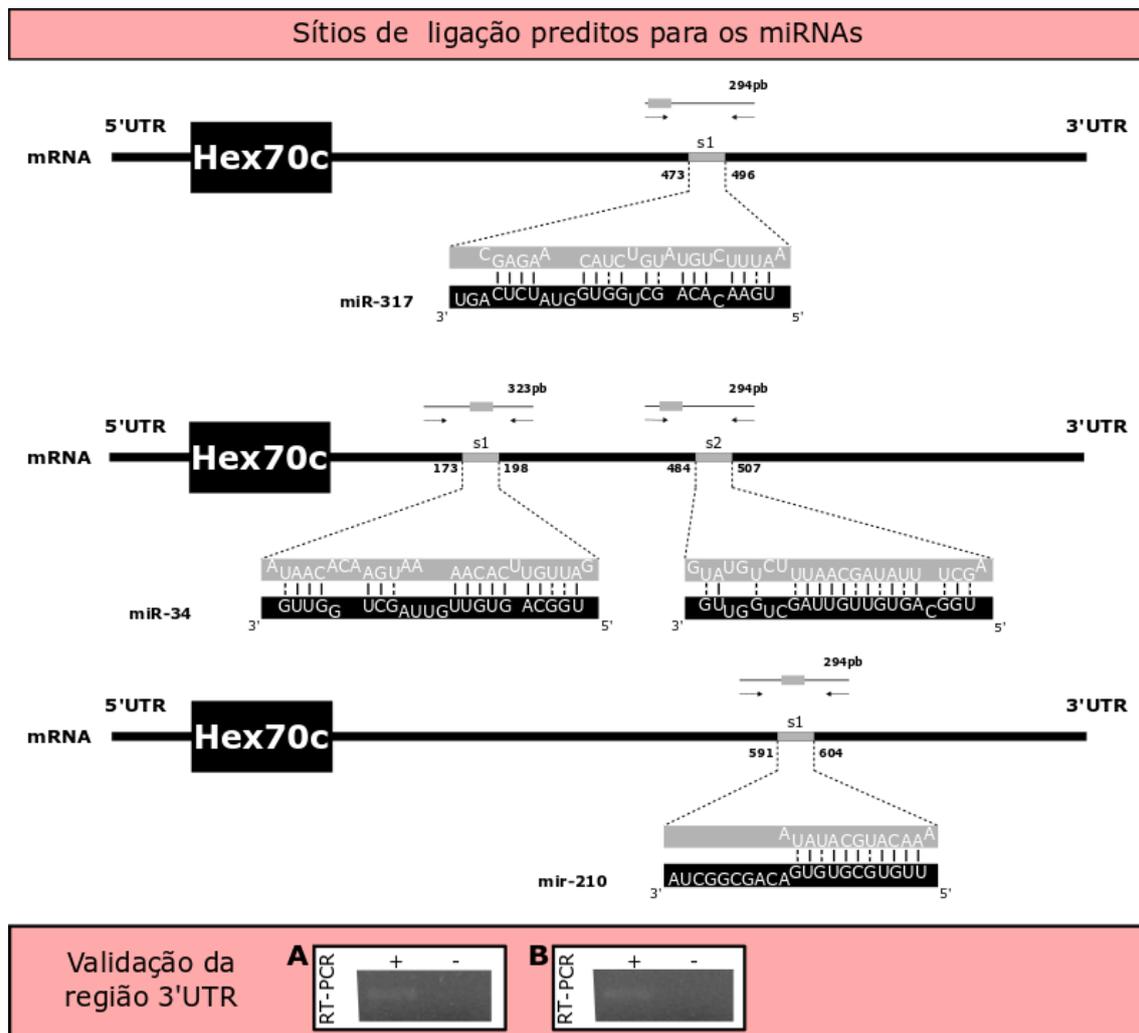
Figura 28. Representação dos sítios de ligação preditos para os miRNAs *miR-317*, *miR-34* e *miR-210* na 3'UTR do gene *hex70b* de *A. mellifera* e validação de sequências.



Fonte: Da autora.

Nota: A região codificadora do gene *hex70b* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para os miRNAs (quadrados pretos menores), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. Os dois fragmentos amplificados por RT-PCR (validados) e seus respectivos controles negativos (ausência de cDNA na reação de RT-PCR) estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura: A – corresponde ao fragmento de 310 nt (incluindo o sítio para *miR-210*); B – corresponde ao fragmento de 309 nt (incluindo sítios para *miR-317*, *miR-34* e *miR-210*). Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

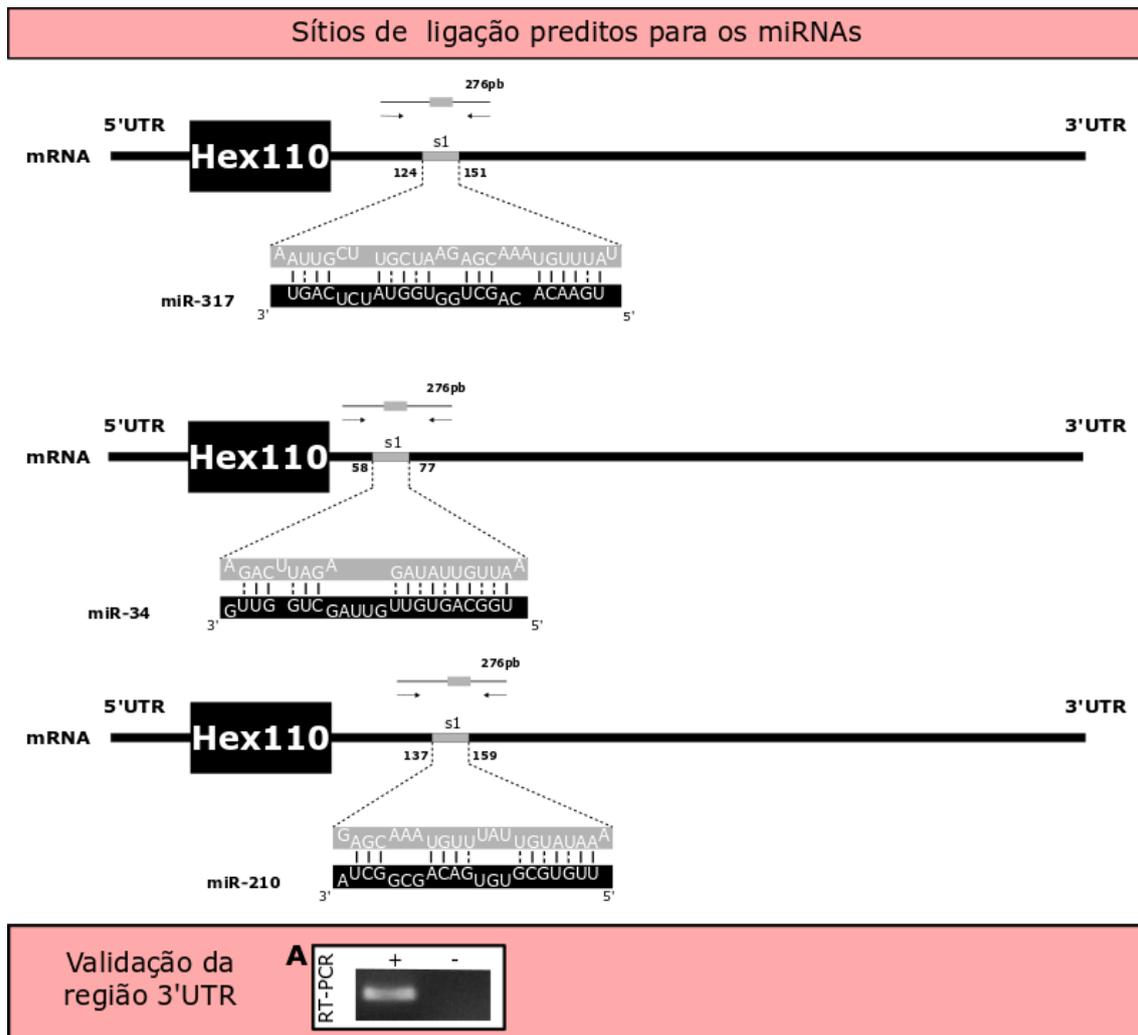
Figura 29. Representação dos sítios de ligação preditos para os miRNAs *miR-317*, *miR-34* e *miR-210* na 3'UTR do gene *hex70c* de *A. mellifera* e validação das sequências.



Fonte: Da autora.

Nota: A região codificadora do gene *hex70c* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para os miRNAs (quadrados pretos menores), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. Os dois fragmentos amplificados por RT-PCR (validados) e seus respectivos controles negativos (ausência de cDNA na reação de RT-PCR) estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura: A – corresponde ao fragmento de 323 nt (incluindo o sítio para *miR-34*); B – corresponde ao fragmento de 294 nt (incluindo sítios para *miR-317*, *miR-34* e *miR-210*). Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

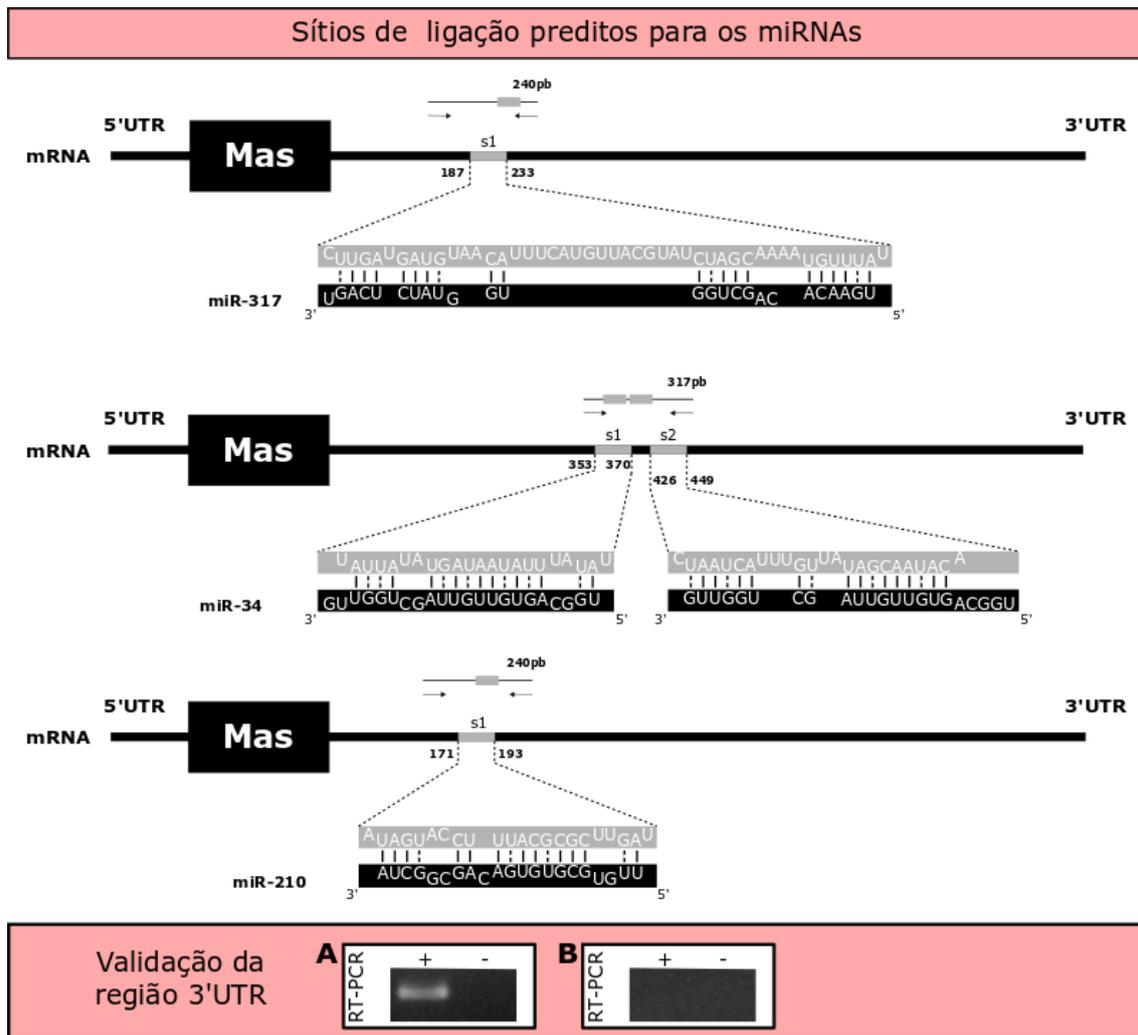
Figura 30. Representação dos sítios de ligação preditos para o *miR-317*, *miR-34* e *miR-210* na 3'UTR do gene *hex110* de *A. mellifera* e validação de sequências.



Fonte: Da autora.

Nota: A região codificadora do gene *hex110* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para os miRNAs (quadrados pretos menores), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. O fragmento amplificado por RT-PCR (validado) e seu respectivo controle negativo (ausência de cDNA na reação de RT-PCR) estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura: A – corresponde ao fragmento de 276 nt (incluindo os sítios para *miR-317*, *miR-34* e *miR-210*). Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

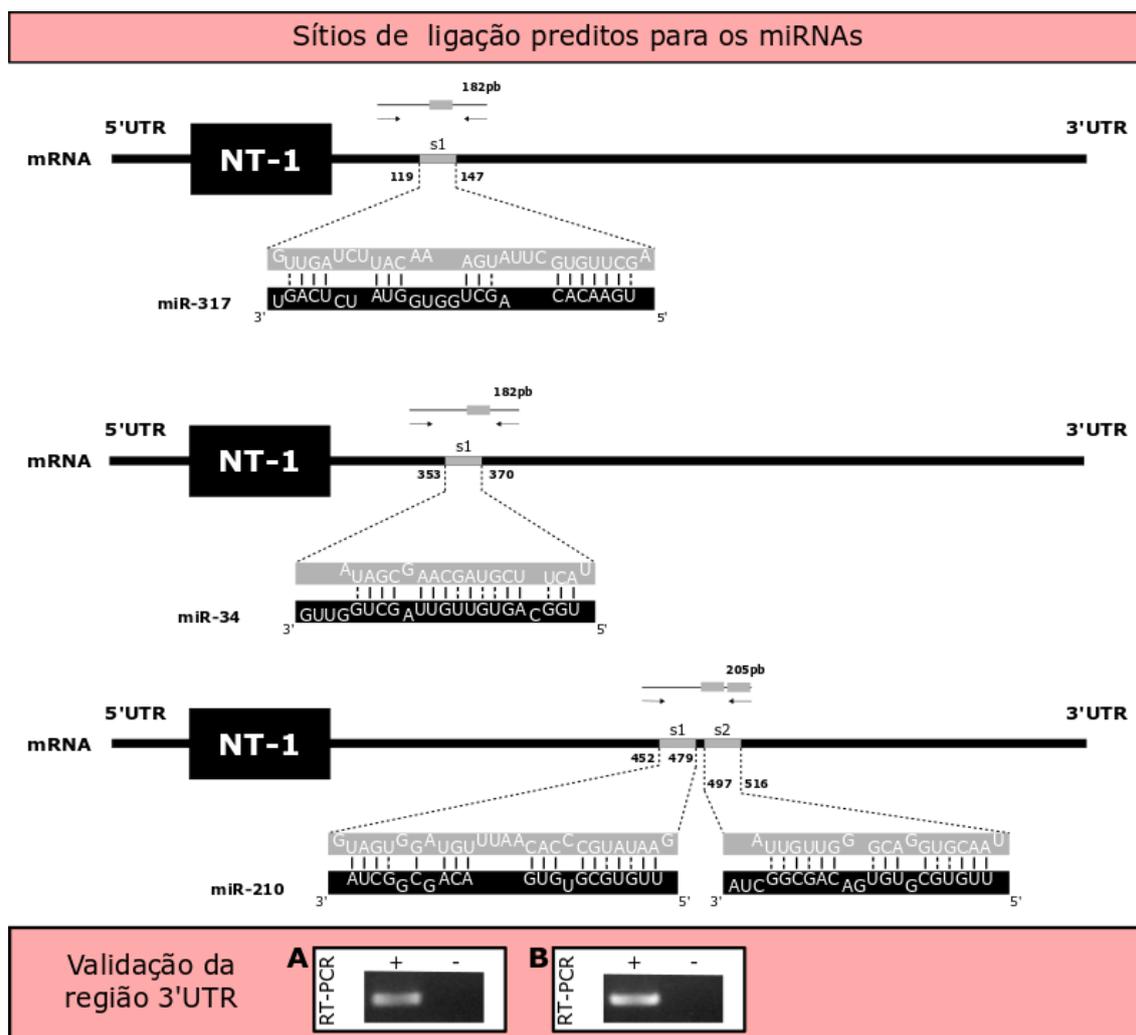
Figura 31. Representação dos sítios de ligação preditos para os miRNAs *miR-317*, *miR-34* e *miR-210* na 3'UTR do gene *mas* de *A. mellifera* e validação das sequências.



Fonte: Da autora.

Nota: A região codificadora do gene *mas* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para os miRNAs (quadrados pretos menores), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. Os dois fragmentos amplificados por RT-PCR (validado apenas o correspondente a 240pb) e seus respectivos controles negativos (ausência de cDNA na reação de RT-PCR) estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura: A – corresponde ao fragmento de 240 nt (incluindo sítios para *miR-317* e *miR-210*); B – corresponde ao fragmento de 317 nt (incluindo sítios para *miR-34*). Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

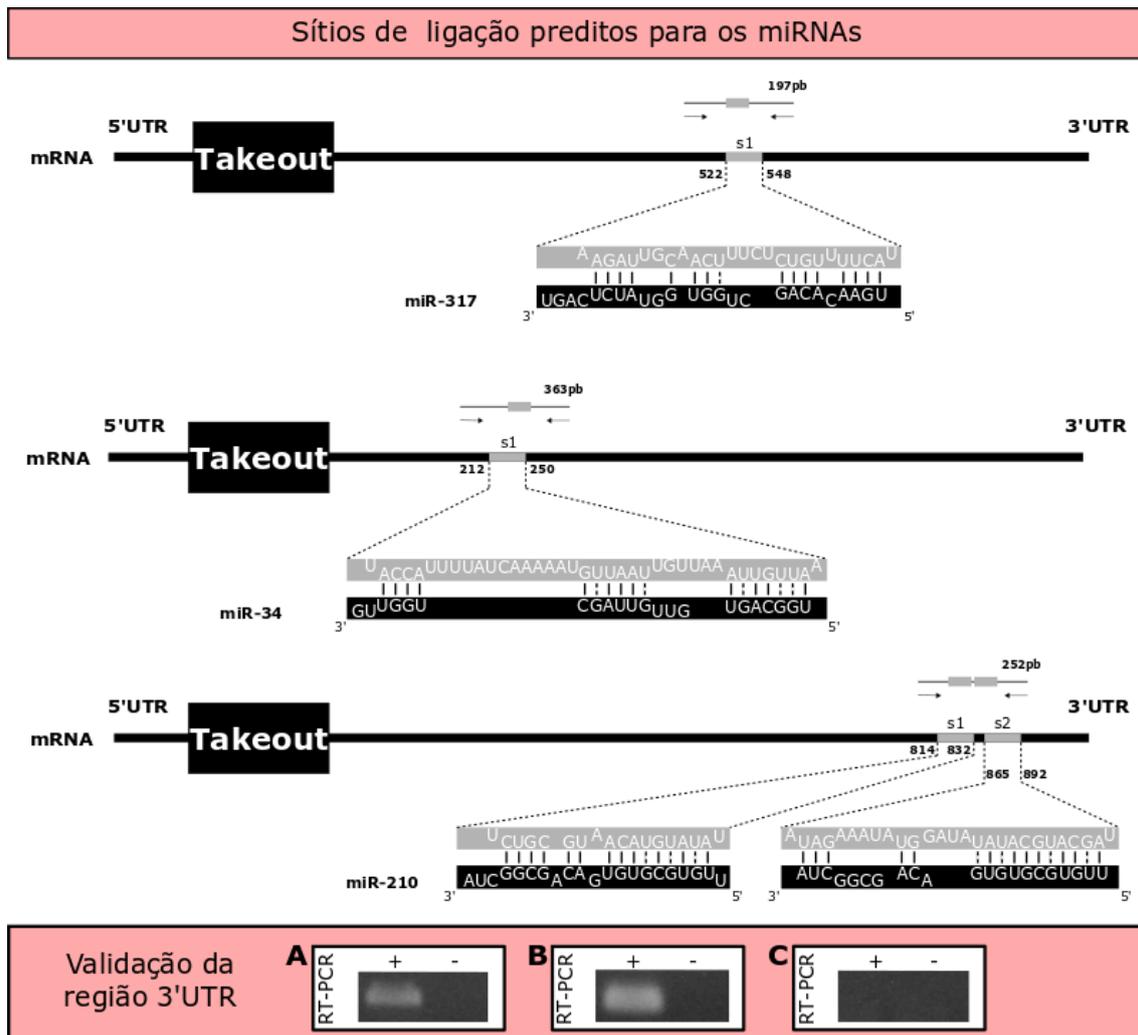
Figura 32. Representação dos sítios de ligação preditos para os miRNAs *miR-317*, *miR-34* e *miR-210* na 3'UTR do gene *Neurotrophin1* de *A. mellifera* e validação das sequências.



Fonte: Da autora.

Nota: A região codificadora do gene *Neurotrophin1* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para os miRNAs (quadrados pretos menores), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. Os dois fragmentos amplificados por RT-PCR (validados) e seus respectivos controles negativos (ausência de cDNA na reação de RT-PCR) estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura: A – corresponde ao fragmento de 182 nt (incluindo os sítios para *miR-317* e *miR-34*); B – corresponde ao fragmento de 205 nt (incluindo os sítios para *miR-210*). Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

Figura 33. Representação dos sítios de ligação preditos para os miRNAs *miR-317*, *miR-34* e *miR-210* na 3'UTR do gene *takeout* de *A. mellifera* e validação das sequências.



Fonte: Da autora.

Nota: A região codificadora do gene *takeout* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para os miRNAs (quadrados pretos menores), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. Os dois fragmentos amplificados por RT-PCR (validados apenas os correspondentes a 363 e 197pb) e seus respectivos controles negativos (ausência de cDNA na reação de RT-PCR) estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura: A – corresponde ao fragmento de 363 nt (incluindo o sítio para *miR-34*); B – corresponde ao fragmento de 197 nt (incluindo o sítio para *miR-317*); C – corresponde ao fragmento de 252 nt (incluindo o sítio para *miR-210*). Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

#### 4.5.3 Validação das interações mRNA-miRNA mediante o ensaio da luciferase

Para realizar a validação da ligação microRNAs-mRNAs alvos utilizando o ensaio da luciferase, foi feita a clonagem dos fragmentos de 3'UTR validados por RT-PCR (item anterior). A clonagem de cada um dos fragmentos foi adicionalmente confirmada por sequenciamento tipo Sanger. Obteve-se êxito na clonagem dos seguintes fragmentos de 3'UTR: *amd* fragmento 1, *amci* fragmento 1, *forked* fragmentos 1 e 2, *hex70b* fragmentos 1 e 2, *hex70c* fragmento 1, *hex110* fragmento 1, *mas* fragmento 1, *nt-1* fragmento 1, *takeout* fragmentos 1 e 2.

O ensaio da luciferase consistiu em transfectar células HEK293T com vetor PsiCHECK2 + 3'UTR e moléculas miméticas de miRNA. Na condição de o sítio de ligação para o miRNA ser verdadeiro, há menos síntese da proteína luciferase e, portanto, menor intensidade de luminescência. O bom funcionamento do sistema desenvolvido para o ensaio de luciferase foi verificado com o uso do vetor contendo a sequência controle (controle positivo). A sequência controle consistia em uma sequência complementar aos respectivos miRNAs transfectados: *miR-34* (Figura 34-A); *miR-210* (Figura 35-A); *miR-317* (Figura 36-A). As moléculas miméticas dos miRNAs foram capazes de reconhecer a sequência controle e causar a diminuição da síntese da proteína da atividade da luciferase e, conseqüentemente, a diminuição da intensidade da luminescência produzida: *miR-34* (Figura 34-B); *miR-210* (Figura 35-B); *miR-317* (Figura 36-B). Uma vez verificada a eficácia das moléculas miméticas em reconhecerem um sítio de ligação perfeito, bem como o funcionamento do ensaio da luciferase, realizamos os experimentos com os vetores PsiCHECK2 contendo fragmentos da 3'UTR dos genes *amd*, *amci*, *forked*, *hex70b*, *hex70c*, *hex110*, *takeout*, *mas*, *nt-1* (figura 34 - 36). Para garantir que a diminuição da síntese da proteína da atividade da luciferase ocorreu pela ligação específica do miRNA mimético com o sítio predito da 3'UTR, fizemos experimentos com miRNA controle (sequência randômica) que não possuía complementariedade com a 3'UTR clonada (controle negativo).

As figuras 34-36 mostram os resultados dos ensaios de luciferase. A primeira coluna de cada um dos gráficos representa o ensaio em que o vetor foi transfectado nas células sem nenhum dos miRNAs miméticos. A segunda coluna representa o resultado obtido para os experimentos em que o vetor foi transfectado juntamente com a

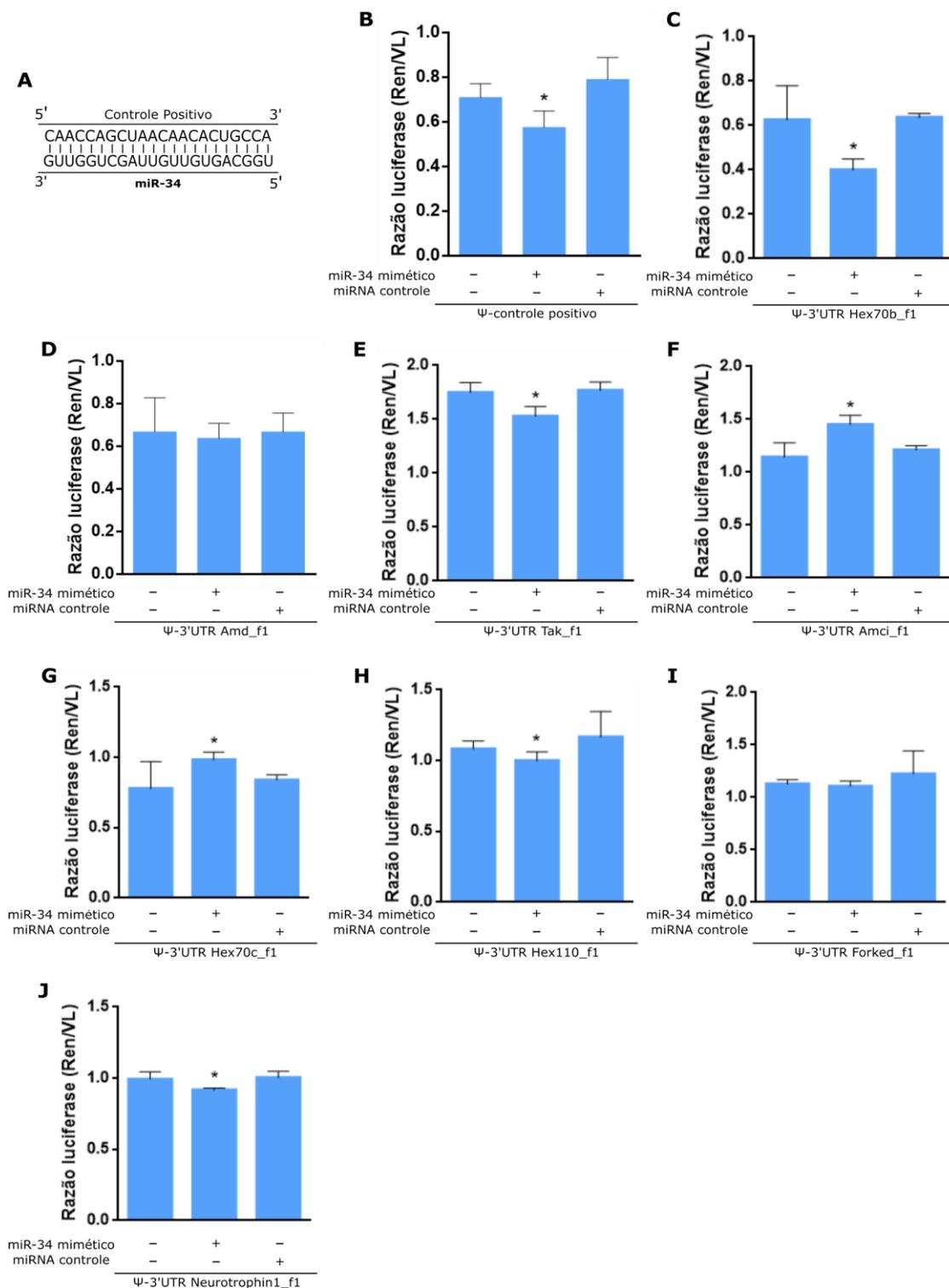
sequência mimética de um dos miRNAs selecionados para estudo (*miR-317*, *miR-34* ou *miR-210*). A terceira coluna mostra o resultado obtido para a transfecção do vetor com o miRNA controle (controle negativo).

Nossos experimentos validaram os sítios preditos para *miR-34* nas regiões 3'UTR dos genes *hex70b* (Figura 34-C), *takeout* (Figura 34-E), *amci* (Figura 34-F), *hex70c* (Figuras 34-G), *hex110* (Figuras 34-H) e *nt-1* (Figuras 34-J). No entanto, os sítios preditos para os genes *amd* (Figura 34-D) e *forked* (Figura 34-I) não responderam à presença do *miR-34* mimético, sugerindo que esses sítios não sejam funcionais.

Validamos também os sítios preditos para *miR-210* nas regiões 3'UTR dos genes *hex70b* (Figura 35-E), *mas* (Figura 35-F) e *hex110* (Figura 35-G). Os sítios preditos para os genes *amd* (Figura 35-C) e o gene *forked* (Figura 35-D) não responderam à presença do *miR-210* mimético, sugerindo que esses sítios não sejam funcionais.

Também pudemos provar a ligação de *miR-317* nos sítios preditos nas regiões 3'UTR dos genes *amci* (Figura 36-D), *takeout* (Figura 36-G), *mas* (Figura 36-I) e *forked* (Figura 36-K). Os sítios preditos para os genes *amd* (Figura 36-C), *hex70b* (Figura 36-E), *hex110* (Figura 36-F), *hex70c* (Figura 36-H) e *nt-1* (Figura 36-J) não responderam à presença do *miR-317* mimético, sugerindo que esses sítios não sejam funcionais.

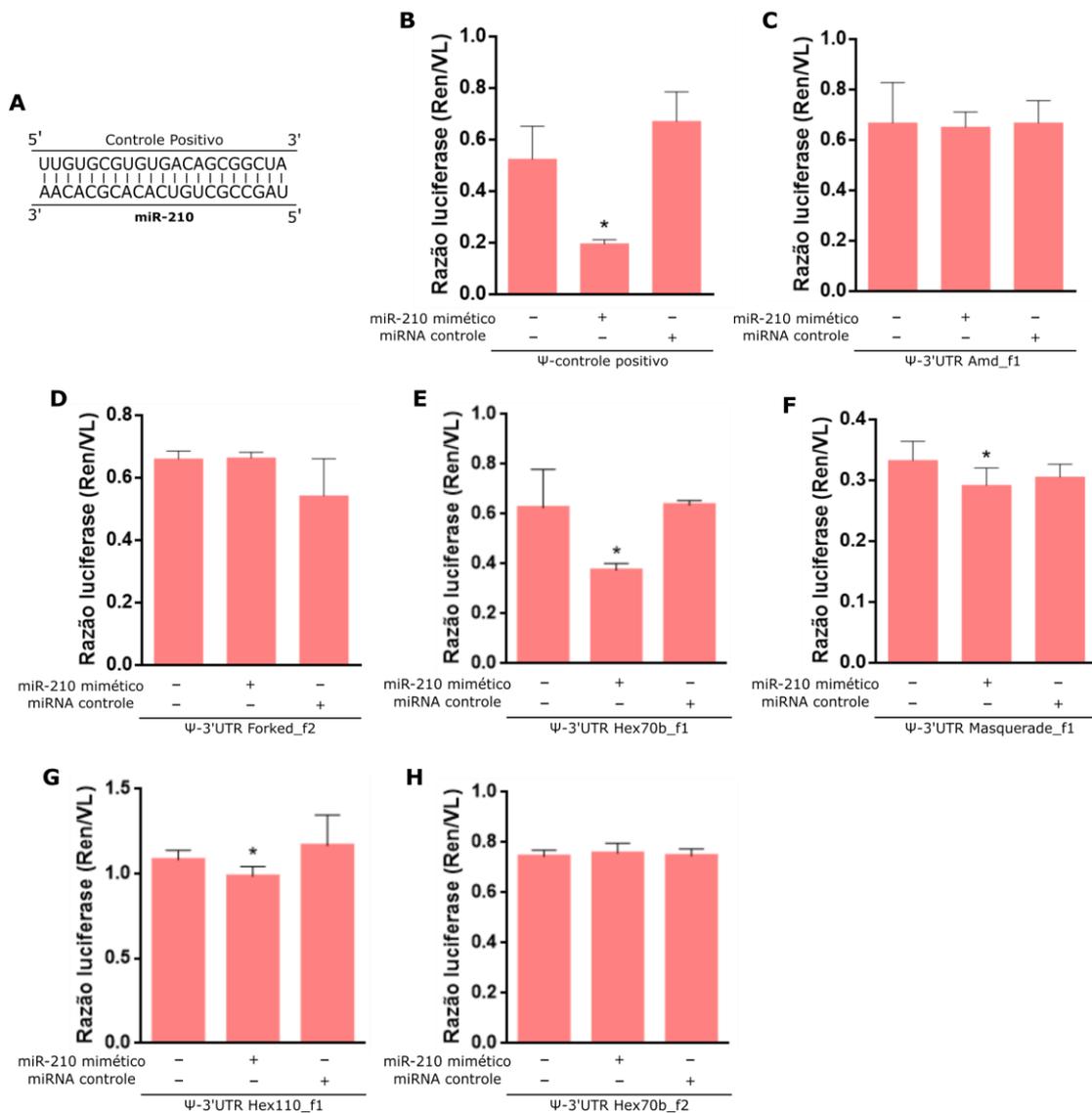
Figura 34. Validação dos sítios de ligação preditos para o *miR-34* na 3'UTR pelo ensaio da luciferase.



Fonte: Da autora.

Nota: Mudanças na razão da atividade da luciferase quimérica da Renilla (Ren) e da luciferase do vaga-lume (VL). A luciferase quimérica Ren está ligada a 3'UTR dos genes-alvo que contém os sítios de ligação preditos para o *miR-34*. Representação esquemática do controle positivo, pareamento perfeito com a sequência do *miR-34* (A). O controle positivo (B) e as 3'UTRs dos genes *hex70b* (C), *takeout* (E), *amci* (F), *hex70c* (G), *hex110* (H) e *nt-1* (J) foram diretamente reguladas pelo *miR-34*. A 3'UTR dos genes *amd* (D) e *forked* (I) não foram reguladas pelo *miR-34*. miRNA controle: sequência randômica. Test-t, \*:  $p < 0,05$ .

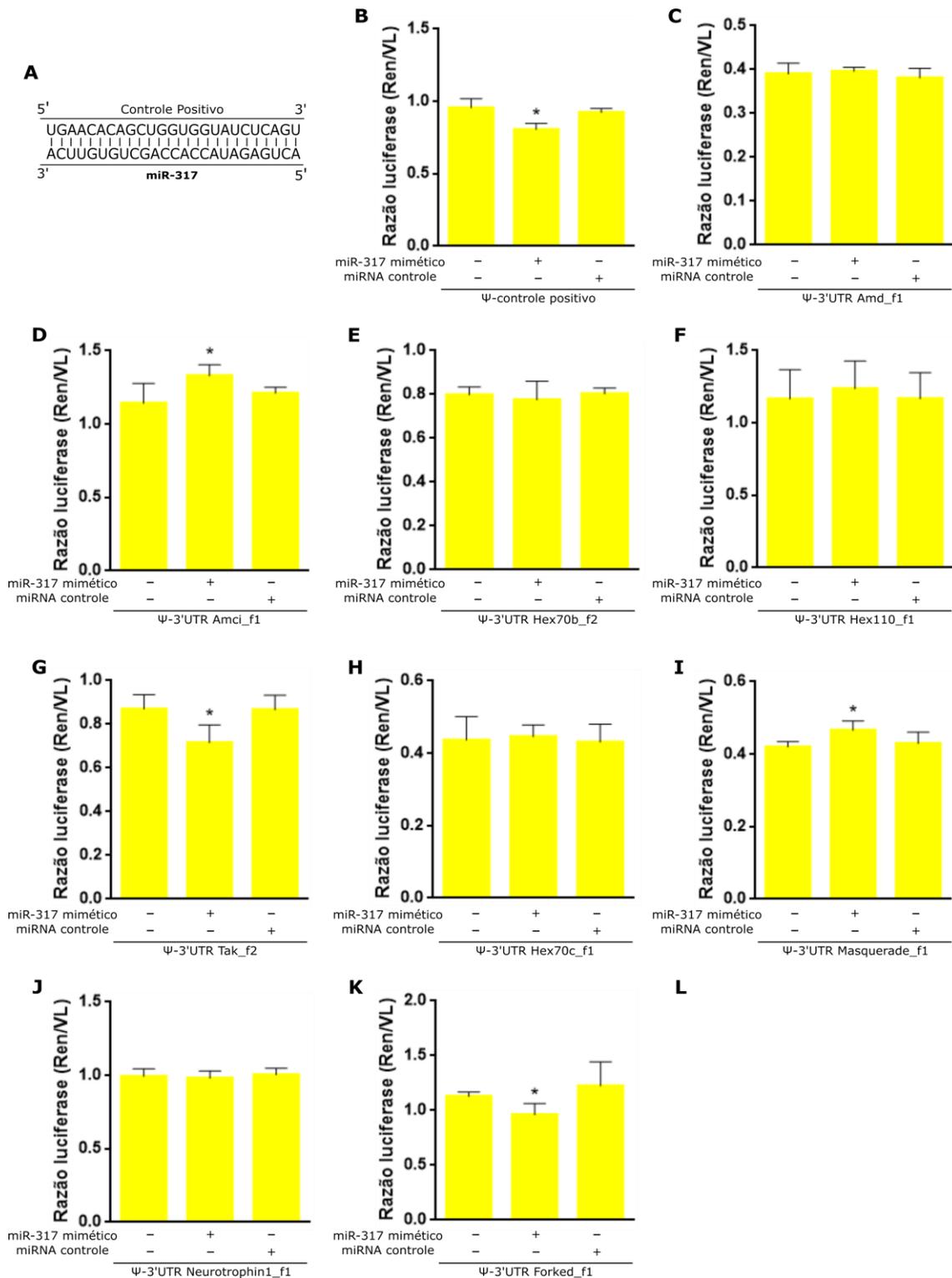
Figura 35. Validação dos sítios de ligação preditos para o *miR-210* na 3'UTR pelo ensaio da luciferase.



Fonte: Da autora.

Nota: Mudanças na razão da atividade da luciferase quimérica da Renilla (Ren) e da luciferase do vaga-lume (VL). A luciferase quimérica Ren está ligada a 3'UTR dos genes-alvo que contém os sítios de ligação preditos para o *miR-210*. Representação esquemática do controle positivo, pareamento perfeito com a sequência do *miR-210* (A). O controle positivo (B) e as 3'UTRs dos genes *hex70b* (E), *mas* (F) e *hex110* (G) foram diretamente reguladas pelo *miR-210*. A 3'UTR dos genes *amd* (C), *forked* (D) e o segundo sítio de *hex70b* (H) não foram reguladas pelo *miR-210*. miRNA controle: sequência randômica. Test-t, \*:  $p < 0,05$ .

Figura 36. Validação dos sítios de ligação preditos para o *miR-317* na 3'UTR pelo ensaio da luciferase.



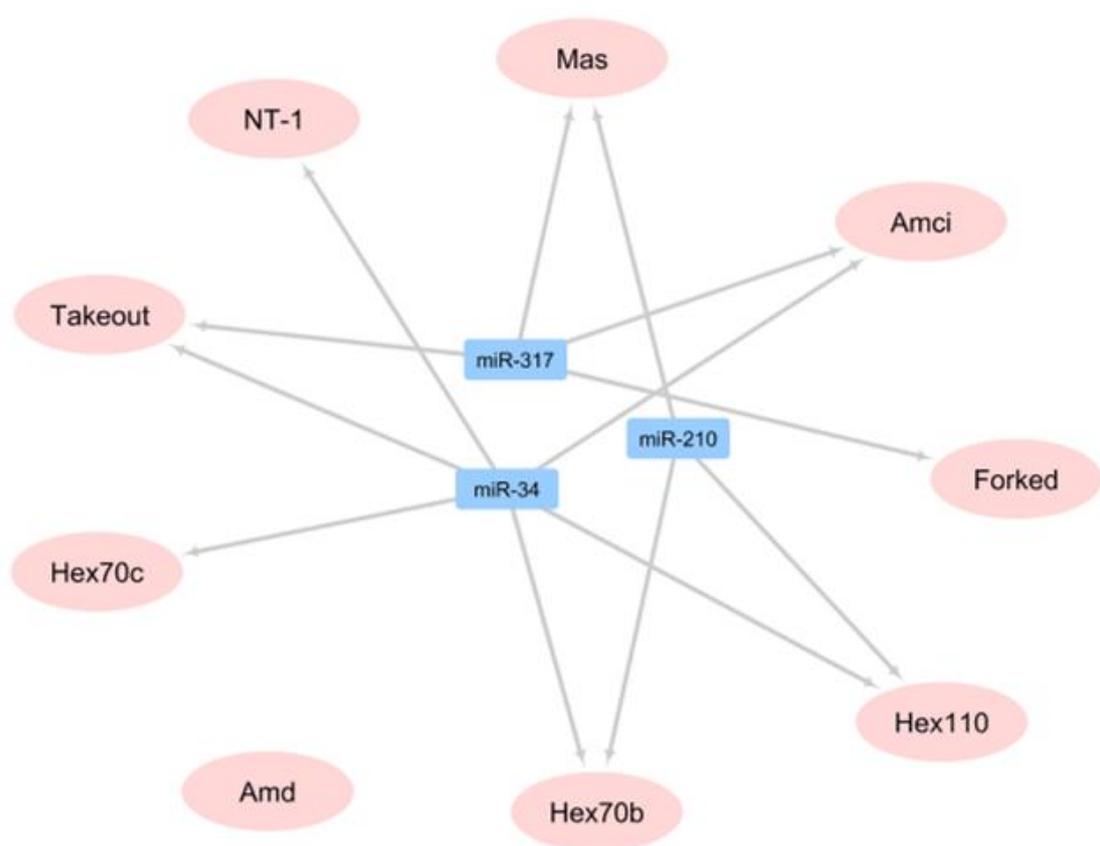
Fonte: Da autora.

Nota: Mudanças na razão da atividade da luciferase quimérica da Renilla (Ren) e da luciferase do vagalume (VL). A luciferase quimérica Ren está ligada a 3'UTR dos genes-alvo que contém os sítios de ligação preditos para o *miR-317*. Representação esquemática do controle positivo, pareamento perfeito com a sequência do *miR-317* (A). O controle positivo (B) e as 3'UTRs dos genes *amci* (D), *takeout* (G), *mas* (I) e *forked* (K) foram diretamente reguladas pelo *miR-317*. A 3'UTR dos

genes *amd* (C), *hex70b* (E), *hex110* (F), *hex70c* (H) e *nt-1* (J) não foram reguladas pelo *miR-317*.  
miRNA controle: sequência randômica. Test-t, \*:  $p < 0,05$ .

As validações das potenciais interações entre miRNAs-mRNAs estão resumidas na rede representada na Figura 37, onde as linhas cinzas representam as interações validadas (test-t  $p < 0,05$ ) pelo ensaio de luciferase.

Figura 37. Rede interação mRNA-miRNA.



Fonte: Da autora.

Nota: As elipses rosas representam os mRNAs, os retângulos azuis representam os miRNAs, as linhas cinzas representam as interações mRNA-miRNAs previstas pelo software RNAhybrid e validadas pelo ensaio de luciferase.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Genes neurogênicos clássicos e a evolução da socialidade

Existem dados que apoiam a ideia de que as diferenças morfológicas (tamanho, por exemplo) entre as castas de abelhas aumentam junto com o nível de socialidade (MICHENER, 1974; PACKER, 1992). As abelhas altamente eusociais (como as dos gêneros Apini e Meliponini; ver Sakagami 1982) apresentam diferenças no tamanho corporal das castas que se refletem nas diferenças no tamanho do cérebro. O desenvolvimento cerebral na abelha altamente eussocial pode, portanto, representar um subproduto da evolução da divisão do trabalho reprodutivo em espécies com dimorfismo de tamanho feminino. O modelo do cérebro social afirma que as interações com indivíduos específicos representam desafios cognitivos para os animais e que qualquer aumento na complexidade social favorece o desenvolvimento de cérebros maiores (DUNBAR; SHULTZ, 2007).

Para determinar o grupo de genes que classicamente são associados a funções neurogênicas e permitiriam um alto grau de desenvolvimento cerebral, os identificamos nos genomas de onze abelhas, cujas sequências se encontram disponíveis, e no genoma de um modelo invertebrado (*D. melanogaster*) e em um modelo vertebrado (*H. sapiens*). *D. melanogaster* nos serviria de referência como invertebrado solitário e *H. sapiens* de referência como vertebrado social.

Nossas análises mostram que *A. mellifera*, um organismo altamente social, apresenta 717 genes neurogênicos (equivalente a 4,68% do total de genes para essa espécie), *M. rotundata*, organismo solitário, apresenta o mesmo número de genes neurogênicos (717, equivalente a 5,61% dos genes totais para essa espécie), *D. melanogaster*, organismo solitário, mostra 954 genes neurogênicos (equivalente a 5,36% dos genes totais para essa espécie) e *H. sapiens* apresenta 1586 genes neurogênicos (equivalente a 7,94% dos genes totais para essa espécie). Surpreendentemente, uma espécie também altamente social, *F. varia* demonstra proporção de genes neurogênicos mais próxima à encontrada em *H. sapiens*, entre todas as espécies analisadas. Isto pode sugerir a existência de alguma singularidade nervosa

em *F. varia* permitindo uma organização social que lembra às possibilidades disponíveis em *H. sapiens*. Por outro lado, pode refletir o fato da sequência do genoma de *F. varia* estar sendo analisada ainda, com anotações iniciais.

Quando analisamos os genes neurogênicos em comum entre as espécies *A. mellifera*, *F. varia*, *D. melanogaster* e *H. sapiens*, notamos que 222 genes são compartilhados entre as quatro espécies, o que reflete a conservação de genes. Além disso, 435 genes neurogênicos são compartilhados apenas pelos insetos e 538 estão presentes apenas em humanos (diferença nas funções). Estudos comparativos do desenvolvimento cerebral em vertebrados e invertebrados mostraram notáveis semelhanças na expressão gênica, proliferação neural e formação de circuitos cerebrais (REICHERT, 2009; REICHERT; BOYAN, 1997). Isso sugere que muitos dos mecanismos moleculares envolvidos na construção do cérebro são conservados, e que o uso flexível do produto gênico, como a introdução de reguladores, aumenta as possibilidades de interações moleculares das proteínas, permitindo que ocorram diferentes morfologias cerebrais a partir de um mesmo conjunto de genes. Os genes neurogênicos em comum às espécies estudadas neste trabalho podem ter sido ponto de partida da evolução dos diversos mecanismos morfológicos da neurogênese.

Em conjunto, os resultados de genômica comparativa não permitem sugerir a existência de uma associação entre proporção de genes neurogênicos e nível de socialidade em insetos. Eles mostram, porém, que existe um conjunto gênico conservado evolutivamente responsável pela geração de aspectos básicos da estrutura cerebral. A determinação das características dos membros deste conjunto e de seus comportamentos transcricionais durante o desenvolvimento permitirá compreender melhor aspectos evolutivos do desenvolvimento cerebral.

## 5.2 Expressão gênica diferencial e a morfogênese do cérebro larval em castas de abelhas

As larvas fêmeas de *A. mellifera* se desenvolvem em rainhas ou operárias adultas de acordo com a alimentação que recebem a partir da 3ª fase larval. Essa diferença nutricional altera o perfil transcricional de cada uma das castas, levando ao difenismo das fêmeas, o que inclui o desenvolvimento diferencial do cérebro. Para uma maior

compreensão dos aspectos moleculares da neurogênese diferencial em resposta ao diferencial nutricional, estudamos os genes com expressão diferencial no cérebro entre as castas na fase L3. De acordo com as análises de RT-qPCR realizadas com amostras de cérebros de rainhas e operárias, os nove genes selecionados confirmaram os resultados obtidos nos experimentos de RNA-Seq (VIEIRA, 2014). Além da validação dos experimentos de RNA-Seq, determinamos os perfis transcricionais destes nove genes no período larval, mais precisamente nas fases L3, L4 e L5F2. Os resultados demonstraram três tipos de comportamento transcricional relativo a esses genes: 1) Apresenta maior expressão em cérebros de rainha na fase L3, e já na fase L4 inverte-se sendo a maior expressão em cérebros de operárias. Isto ocorre para os genes *forked* e *ntl*. 2) Os genes se mostram mais expressos em cérebros de operárias nas fases L3 e L4, enquanto na fase L5F2 não há diferença de expressão entre as castas. Esta situação é obtida para os genes *amci*, *hex70b*, *hex70c* e *hex110*. 3) O último tipo de perfil mostra uma maior expressão em cérebros de rainhas na fase L3, e nas fases posteriores não há diferença significativa das expressões entre as castas. Os genes deste grupo são *amd*, *takeout* e *mas*. Além dessa divisão, as proteínas codificadas pelos genes *takeout*, *hex70b*, *hex70c* e *hex110* apresentam provável ligação ao HJ, regulando a disponibilidade deste hormônio de forma diferencial para as castas de *A. mellifera*. Detalhes da expressão de cada gene serão expostos e discutidos nos itens a seguir.

### 5.2.1 ALPHA-METHYLDOPA HYPERSENSITIVE PROTEIN-LIKE (AMD)

Os genes eucarióticos que desempenham funções relacionadas estão frequentemente agrupados no genoma. Com base em evidências genéticas foi sugerido que a região do genoma de *D. melanogaster* em torno do gene *ddc* (*Dopa-decarboxilase*) contém um grupo de genes relacionados funcionalmente à síntese de cutícula e ao metabolismo das catecolaminas, dentre eles o gene *amd* (EVELETH; MARSH, 1986). Em *A. mellifera* os genes ortólogos de *ddc* e *amd* se localizam no cromossomo 16 em posição bastante próxima um do outro, com cerca de 45 kb de distância entre eles. Além disso, o sentido de leitura deles é oposto, assim como ocorre em *Drosophila* (EVELETH; MARSH, 1986; TATARENKOV; SÁEZ; AYALA, 1999).

O grau de identidade entre as proteínas codificadas por esses genes em *A. mellifera* é de 52%, enquanto em *Drosophila* é de 50%. A proximidade e semelhança estrutural e bioquímica se deve ao fato de serem genes parálogos, intimamente relacionados, surgidos por uma antiga duplicação do gene *Ddc* (EVELETH; MARSH, 1986; TATARENKOV; SÁEZ; AYALA, 1999).

Em experimentos realizados com *Drosophila* foi observado que as marcações de mRNA de *Amd* no sistema nervoso deste inseto no estágio larval estavam muito semelhantes às marcações para *Ddc* (WANG; MARSH, 1995). Estes autores mostraram também que *Amd* é inibida por análogos de dopa, o que confirmaria o papel no metabolismo das aminas biogênicas. Estas moléculas são substâncias neuroativas que induzem diferenças comportamentais e fisiológicas em insetos, atuando como neurotransmissores, neuromoduladores e neurohormônios nos sistemas nervosos central e periférico (LANGE, 2009; ROEDER, 2005).

As descarboxilases participam do metabolismo das catecolaminas, que está envolvido na produção de neurotransmissores, como a dopamina e a serotonina (DEWHURST et al., 1972; WRIGHT; BEWLEY; SHERALD, 1976; LIVINGSTON; TEMPEL, 1983). A síntese de dopamina, serotonina e receptores adrenérgicos em fases específicas do desenvolvimento do cérebro é importante para o desenvolvimento motor e cognitivo normal (VERNEY; LEBRAND; GASPAS, 2002; GASPAS; CASES; MAROTEAUX, 2003). Um trabalho realizado por Vitalis; Panvanelas (2003) mostrou que os neurotransmissores dopamina e serotonina possuem papel crítico no início do desenvolvimento do córtex pela regulação da proliferação, migração e diferenciação neuronal. Shih et al. (2013) mostraram em seu trabalho que a repressão do gene *ddc* em embriões de *zebrafish* (*Danio rerio*) causa redução no número total de neurônios e, também, no tamanho da região do cérebro constituída por substância branca. Houve também um aumento no número de apoptose cerebral. Outros estudos realizados com *zebrafish*, e também com ratos, mostraram que a dopamina e a serotonina desempenham um papel importante no crescimento do cérebro durante a fase inicial de desenvolvimento (CRANDALL et al., 2007; ARAKI; SIMS; BHIDE, 2007; RUSSEK-BLUM et al., 2008; FLINN et al., 2009; AIRHART et al., 2012).

O *aadc*, gene homólogo ao *ddc* em humanos, tem sido associado a diversos distúrbios neurológicos, dentre eles está a doença de Parkinson (NEFF; HADJICONSTANTINO, 1995; KING et al., 2011). Paciente acometido por outras

patologias neurológicas como hiperatividade e transtorno de déficit de atenção, que apresentam função dopaminérgica insuficiente, mostraram cérebro diminuído (SWANSON et al., 2007).

O perfil de expressão do gene *amd* durante o estágio larval mostra um pico de expressão em rainha na fase L3, seguido de queda a níveis bem baixos nas fases seguintes (L4 e L5F2), enquanto em operárias a expressão se mantém baixa em todo o período larval analisado (L3-L5F2). Considerando o processo de neurogênese de *A. mellifera*, *Amd* poderia atuar na catalisação da conversão de substratos em dopamina e serotonina que têm papel no desenvolvimento do cérebro. O fato da sequência que codifica *Amd* ser mais transcrita em rainhas do que em operárias, na terceira fase larval, sugere o favorecimento do maior crescimento cerebral nas primeiras, uma vez que já foi constatado que o cérebro da casta reprodutora é mais desenvolvido no estágio larval (MODA et al., 2013). Nas fases que se seguem (L4 e L5F2), o gene se mostra transcrito na mesma proporção nas duas castas, o que deve significar que a necessidade de síntese dos neurotransmissores em maior quantidade no cérebro de rainha já não é mais necessária para a proliferação de neurônios e conseqüentemente desenvolvimento do cérebro. A atividade da *Amd* seria agora apenas para manutenção do nível mínimo desses neurotransmissores, uma vez que as larvas não precisam desenvolver tarefas complexas.

### 5.2.2 MASQUERADE (MAS) E CHYMOTRYPSIN INHIBITOR (AMCI)

Um dos genes mais expressos em rainhas codifica a proteína Masquerade, uma serino-protease também conhecida como SPH41 que possui um domínio conservado *Trypsin-like serine protease*, enquanto um gene mais expresso em operárias codifica a proteína inibidora da quimotripsina (*amci*) que possui o domínio conservado *Trypsin Inhibitor cysteine rich domain*. A função dessa última proteína está relacionada à inibição de serino-proteases, especificamente a tripsina, (CIERPICKI; BANIA; OTLEWSKI, 2000; SIMONET et al., 2002).

As enzimas do grupo serino-proteases, como trombina, tripsina e as proteases do tipo tripsina, estão distribuídas por todo o corpo humano e participam ativamente de

muitos processos fisiológicos e patológicos, dentre eles reprodução, resposta imune, digestão dos alimentos, homeostase, assim como em processos de transdução de sinais. Diversas serino-proteases se expressam no cérebro de humanos e desempenham papel no desenvolvimento, manutenção e patologia do sistema nervoso (GINGRICH; TRAYNELIS, 2000; LUO; WANG; REISER, 2007; WANG; LUO; REISER, 2008). No SNC, algumas serino-proteases, como trombina e plasmina, regulam os danos provocados por acidente vascular cerebral isquêmico, além de plasticidade sináptica, neurodegeneração e neuroregeneração (XI; REISER; KEEP, 2003; SHEEHAN; TSIRKA, 2005).

A tripsina foi primeiramente isolada do suco pancreático de animais, e mais tarde identificada em outros tecidos (COTTRELL et al., 2004). A tripsina desempenha um papel central na digestão de alimentos, assim como na transdução de sinal celular mediada através da ativação proteolítica dos receptores ativados por protease (PARs). No cérebro de humanos, a tripsina e tripsina-*like* extrapancreáticas, como neuropsina, neurotripsina, neurosina, mesotripsina/ tripsina IV, P22, estão envolvidas no desenvolvimento neuronal, plasticidade, neurodegeneração e neuroregeneração no cérebro (GSCHWEND et al., 1997; SAWADA et al., 2000). Um estudo com cultura neuronal cortical *in vitro* mostrou que a tripsina age como um fator neuroprotetivo do cérebro contra substâncias tóxicas (NIKOLAKOPOULOU; GEORGAKOPOULOS; ROBAKIS, 2016).

As ações das serino-proteases são reguladas por outra classe de proteínas, os inibidores de serino-proteases ou Serpinas (MIRANDA; LOMAS, 2006). Os efeitos da interação entre as serino-proteases e seus inibidores parecem desempenhar papel na fisiologia e fisiopatologia do cérebro (TOMIMATSU et al., 2002; MIRANDA; LOMAS, 2006; WANG; LUO; REISER, 2008). Especificamente a inibição da tripsina, poderia prejudicar o desenvolvimento cerebral.

O perfil de transcrição do gene *mas* apresenta expressão favorecendo as rainhas na fase L3, sofrendo queda de expressão nas fases seguintes (L4 e L5F2) igualando ao apresentado por operárias durante todo o período estudado neste trabalho. O gene *inibidor de serino-proteases (amci)*, por sua vez, mostra expressão alta nas fases L3 e L4 na casta de operárias, e na fase L5F2 apresenta queda igualando a expressão em rainhas. A expressão em rainhas é baixa na fase L3 e sobe gradativamente nas próximas fases larvais, se igualando ao nível de operária na fase L5F2.

Analisando em conjunto os perfis de expressão dos dois genes supramencionados, estes poderiam contribuir para o desenvolvimento diferencial entre as castas durante as primeiras fases de desenvolvimento larval. Como os trabalhos supramencionados mostram, as serino-proteases, como a Mas, estão envolvidas nos processos de desenvolvimento, remodelamento e neuroproteção do cérebro, enquanto seus inibidores, como o Amci, conseqüentemente atuam desfavorecendo estes processos. Considerando a pequena diferença de expressão do gene *mas* no cérebro privilegiando rainha na fase L3 e mesmo nível nas fases posteriores (L4 e L5F2) e a maior taxa de expressão do gene *amci* em operárias (fases L3 e L4), a proteína Amci atuaria na inibição de Mas em maior nível nos cérebros de operária, favorecendo um maior desenvolvimento no cérebro de rainhas, que pode ser observado a partir da fase larval L4 (MODA et al., 2013).

### 5.2.3 NEUROTROFINA-1

O gene que codifica a Neurotrofina-1 de *A. mellifera* também se apresenta mais expresso (transcrito) em cérebros de larvas L3 de rainhas. Essa proteína é ortóloga da Neurotrophin-1 (DNTP-1) de *D. melanogaster*. Inclusive estas proteínas neurotróficas de *Drosophila* chamadas de neurotrofinas foram originalmente nomeadas de Spätzle (Spz). Spz se assemelha a fatores de crescimento de mamíferos e, em particular, à família neurotrofina, como o fator de crescimento nervoso (NGF) (DELOTTO; DELOTTO, 1998) e sinalizam pela via Toll-like (BALLARD; MILLER; GANETZKY, 2014; ZHU et al., 2008). Spz contém um peptídeo sinal de endereçamento para secreção, um sítio de clivagem da enzima de processamento Easter/ Spätzle (SPE), e um domínio semelhante ao fator de crescimento NGF que adota uma dobra de cisteína para se ligar ao receptor Toll (JANG et al., 2006). Durante as condições de não sinalização, Spz é sintetizado e secretado como um precursor inativo. A clivagem proteolítica de Spz causa uma alteração conformacional que permite que se ligue e ative o receptor Toll induzindo sua dimerização (CHAMY et al., 2008; VALANNE; WANG; RÄMET, 2011; GANGLOFF et al., 2008). O receptor Toll atua nos sistemas nervoso e imunológico de *Drosophila* (NAKAMOTO et al., 2012). Um trabalho realizado por

McIrroy e colaboradores (2013) mostrou que os parálogos de Toll em *Drosophila* (Toll6 e Toll7) promovem direcionamento e sobrevivência neuronal.

Em vertebrados, os neurônios são produzidos em excesso, o qual é corrigido pelo processo de apoptose que ajusta inervação, direcionamento e conectividade, a fim de atingir o tamanho ideal do cérebro (LEVI-MONTALCINI, 1987). Dentre as moléculas que participam do processo de sobrevivência neuronal, as neurotrofinas (NTs) estão na primeira posição, sendo a maior classe destas. A proliferação celular e a diferenciação neuronal são controladas por essas moléculas, que também são solicitadas em elaborações axonais e dendríticas, plasticidade sináptica, excitabilidade e potenciação a longo prazo (LTP, a base da memória e aprendizado) (DAVIES, 2003; BLUM; KONNERTH, 2005; LU; PANG; WOO, 2005). O desenvolvimento e funcionamento cerebral dos vertebrados requerem a participações das NTs., cuja atuação anormal está ligada a distúrbios psiquiátricos (CHEN et al., 2006; ARANCIO; CHAO, 2007; MARTINOWICH; MANJI; LU, 2007). Além disso, existe conservação funcional entre as isoformas de neurotrofina de *D. melanogaster* (DNT1 e DNT2), Spz e as neurotrofinas de mamíferos que agem no sistema nervoso (ZHU et al., 2008).

Zhu et al. (2008) demonstraram que DNT1 promove a sobrevivência neuronal e direcionamento axonal, e a perda de sua função resulta no aumento de apoptose neuronal. A interferência na função de DNT1, afeta a orientação de axônios motores embrionários. O gene *dnt1* é expresso no cérebro, nos centros de aprendizagem e de memória, o que sugere possíveis funções neuronais mais elevadas. De acordo com estudos realizados por Sutcliffe et al. (2013), as DNTs são necessárias nos neurônios para a sinaptogênese.

Um trabalho realizado por Coutinho-Budd; Sheeman; Freeman (2017) identificou uma isoforma de Spz em *Drosophila*, a Spz3. Esta isoforma está relacionada com a manutenção da interação glia-neurônios do córtex cerebral de *Drosophila*. As células da glia fornecem suporte metabólico e nutrientes chave para os neurônios (VOLKENHOFF et al., 2015). A perda da associação entre córtex glial e corpos celulares de neurônios resultou em morte celular neuronal e comprometimento comportamental. Spz3 teria, então, papel na regulação do crescimento e manutenção da morfologia do córtex glial e implicaria na sinalização de sobrevivência neuronal (COUTINHO-BUDD; SHEEMAN; FREEMAN, 2017).

O gene *nt-1* é mais expresso em cérebros de rainhas na fase L3 quando comparados aos cérebros de operárias na mesma fase. Na fase seguinte (L4) ocorre inversão da expressão, ficando a expressão de *nt-1* maior em operária, o que se mantém até a fase L5F2. Os resultados apresentados aqui sugerem que o controle de sobrevivência e orientação da célula pela superfamília NT é um mecanismo antigo de desenvolvimento do sistema nervoso. Outras funções das NTs também poderiam incluir a atividade sináptica e neuronal, aprendizado e memória. Assim, a maior expressão de *nt-1* no cérebro de rainhas na fase L3 garante uma resposta rápida aos diferenciais nutricional e hormonal (HJ, ver figura 1) observados nesta fase permitindo uma maior taxa de proliferação celular no cérebro de rainhas na fase subsequente (L4), levando ao maior e mais rápido desenvolvimento deste órgão que, também, foi observado na fase L4 (MODA et al., 2013). A inversão da expressão de *nt-1* provavelmente ocorre para garantir uma quantidade adequada de células no cérebro de operárias, uma vez que até a fase L4 há uma baixa taxa de proliferação celular no cérebro desta casta. Já em L5F2, *nt-1* passa a ser expresso em mesmo nível, garantindo a sobrevivência das células neuronais até o estágio pupal, quando sofrerão apoptose de forma diferencial entre as castas para ajustar o tamanho cerebral específico de cada casta (BARCHUK et al., 2017).

#### 5.2.4 FORKED

Os filamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos são componentes do citoesqueleto, e participam de diversas funções celulares, dentre as quais estão divisão celular, sinalização, motilidade, adesão, transporte e tráfico por endocitose, como também na regulação da morfologia celular e de organelas e suas distribuições (AKHMANOVA; STEARNS, 2013). A actina é altamente encontrada nos neurônios e relativamente fácil de visualizar pela coloração de rotina com sondas de ligação a filamentos de actina, como a faloidina. No desenvolvimento de neurônios, o citoesqueleto de actina tem um papel fundamental na orientação dos axônios, na extensão/ ramificação de neuritos e na formação de sinapses. A actina existe em duas formas: globular (G) e filamentosa (F). A G-actina é a subunidade monomérica que

polimeriza para formar um filamento helicoidal assimétrico de duas fileiras chamado F-actina (DILLON; GODA, 2005).

As proteínas Forked em *Drosophila* são proteínas de ligação à actina, como Scruin, Singed, Fimbrina e Vilina (FATH; BURGESS, 1995; SANDERS et al., 1996). Estas proteínas são importantes para a formação de estruturas de actina. Forked é essencial para a formação de grandes feixes paralelos de actina, necessários para a construção de cerdas neurosensoriais em *Drosophila* (PETERSEN et al., 1994; WULF-KUHLE; PETERSEN; OTTO, 1998). Em cerdas, a proteína Forked se concentra em suas pontas, em momento anterior a actina ser detectada por coloração com faloidina (PETERSEN; QIN, 1996). Diante do exposto a proteína Forked aparentemente está envolvida no início da formação de feixe de actina.

Griehaber e Petersen (1999) demonstraram que a proteína Forked A, quando expressa em células de mamífero, induz a formação de grandes feixes de actina, aumenta a quantidade total de F-actina na célula, e co-localiza com estes feixes grandes de fibras de actina. O trabalho sugere que Forked além de ser essencial para a construção do feixe de actina, também está envolvida no processo de iniciar a formação destes feixes. Estes mesmos pesquisadores mostraram que a ligação de Forked à actina se deve a uma sequência de aminoácidos que é suficiente para ligação à actina e condução da polimerização desta (GRIESHABER; PETERSEN, 1999).

Em um trabalho mais recente, Onkeve-Ramon e Llimargas (2014) estudaram as proteínas de ligação à actina responsáveis pela formação de filopódios nas traquéias de *Drosophila*. Em seus experimentos observaram que Forked em conjunto com Singed são necessárias para agrupar e alongar vários filamentos de actina e dar-lhes força suficiente para projetar-se e alongar-se vários microns. Os mutantes para *forked* apresentavam feixes de actina mais curtos, corroborando a ideia de que Forked participa do processo de polimerização da actina. Claramente, o citoesqueleto tem um papel essencial durante o crescimento axonal. Além disso, o citoesqueleto participa ativamente do processo de divisão celular.

O gene *forked* apresenta perfil transcrricional oscilatório, sendo mais expresso no cérebro de rainha na fase L3, caindo sua taxa de expressão na fase subsequente, e voltando a se elevar em L5F2, quando atinge o mesmo nível de expressão encontrado em operárias. Nos cérebros de operária ocorre exatamente o inverso, apresenta baixas taxas em L3 e L5F2, e um pico de expressão na fase L4. Baseado nos trabalhos sobre

Forked e no perfil de transcrição deste gene em ambas as castas, este gene, com maior nível de expressão em cérebros de rainha na fase L3, poderia atuar na formação inicial dos feixes de actina que permitem o prolongamento dos axônios até seu alvo e nos processos de divisão celular, indo de encontro ao maior índice de precursores de células nervosas em proliferação no cérebro de rainhas L4 (MODA et al., 2013). Nas fases subsequentes, a expressão não apresenta diferença entre as castas, o que pode ser reflexo de encontrarmos o mesmo número de células em proliferação a partir da fase larval L5 (MODA et al., 2013)

### 5.2.5 TAKEOUT

O gene que codifica a proteína Takeout de *A. mellifera* também se apresenta mais expresso em cérebros de larvas L3 de rainhas. O gene *takeout* codifica uma família de proteínas específica de insetos que foi primeiramente descoberta em *Drosophila* (SAROV-BLAT et al., 2000). A proteína Takeout é do tipo secretória e possui um peptídeo sinal de 18 aminoácidos na porção N-terminal. Essa proteína apresenta o domínio conservado JHBP, que está presente numa família de proteínas que se liga a HJ da hemolinfa de insetos. O HJ regula a embriogênese, mantém o *status quo* do desenvolvimento larval e estimula a maturação reprodutiva no inseto adulto. O HJ é transportado dos locais de sua síntese para os tecidos-alvo por um portador de hemolinfa chamado proteína ligadora de hormônio juvenil (JHBP) (MARCHLER-BAUER et al., 2017).

A maioria das proteínas Takeout tem dois resíduos de cisteína (Cys) altamente conservados na porção N-terminal (SAROV-BLAT et al., 2000; ZHU et al., 2008). Estas proteínas fazem parte da regulação fisiológica e comportamental, participam de vias fisiológicas e bioquímicas e realizam várias funções metabólicas (DAUWALDER et al., 2002; HAMIAUX et al., 2009). São abundantemente distribuídas nas estruturas quimiossensora e nutricional de moscas. Como transportadores de moléculas, tem função importante na transdução de sinal. Participam da regulação rítmica do inseto, atuando em sua alimentação e período de atividade (SAROV-BALT et al., 2000; SO et

al., 2000), e são também associadas à diferenciação de sexo e cortejo masculino (DAUWALDER et al., 2002; LAZAREVA et al., 2007).

O RNA e a proteína Takeout ciclam conforme o ritmo circadiano, com um pico no final da noite/madrugada e uma queda ao final da manhã (SAROV-BALT et al., 2000; SO et al., 2000). As abelhas melíferas comuns (*A. mellifera*) tem seu relógio circadiano envolvido em comportamentos complexos, como memória ligada ao tempo, comunicação por dança e orientação pelo sol (BLOCH, 2010). Ademais, estes insetos mostram plasticidade natural marcada em ritmos circadianos, os quais estão associados com a divisão do trabalho que organiza suas sociedades complexas. As operárias forrageiras mostram fortes ritmos circadianos, sendo ativas durante o dia, e descansando durante a noite, se encaixando aos ritmos diários de disponibilidade de néctar floral e pólen, dos quais as abelhas são dependentes. Já as operárias nutrizes, que cuidam da ninhada, não apresentam ritmos circadianos claros (BLOCH, 2010). A organização anatômica do relógio circadiano não foi descrita em detalhes para as abelhas ou para qualquer outro inseto social. No entanto, é seguro assumir que o marca-passo central controlando o comportamento rítmico está localizado no cérebro, como em todos os outros insetos estudados até agora (SAUNDERS, 2002; HELFRICH-FÖRSTER, 2004).

A proteína Takeout possui um domínio putativo de ligação ao HJ (JHBD), assim como as proteínas ligantes de HJ (JHBP). Chamseddin et al. (2012) propuseram uma função para a ligação de Takeout ao HJ. As proteínas JHBP, como Takeout, podem ligar-se ao HJ circulante e proteger estas moléculas de hidrólise e inativação por esterases presentes na hemolinfa do inseto. A redução dos níveis de HJ é associada ao aumento da longevidade, sendo que a ablação dos *Corpora allata* está associada ao aumento da expectativa de vida em gafanhotos (TATAR, YIN, 2001), e moscas expostas aos vapores de metopreno (molécula análoga ao HJ) diminuíram sua expectativa de vida (FLATT; KAWECK, 2007). Assim, uma possível função alternativa de Takeout pode ser a ligação a HJ, reduzindo sua disponibilidade e subsequente sinalização de HJ, ou seja, Takeout regularia negativamente a função do HJ, agindo como um reservatório deste hormônio, hipótese corroborada por experimentos realizados por Chamseddin e colaboradores (2012) utilizando *D. melanogaster* como modelo. Apoiando esta noção, Lin; Zhang; Jiang (2017) mostraram que em *Nilaparvata lugens* (cigarrinha marrom do arroz) os genes *takeout* são regulados pela via de sinalização do HJ, mas o mecanismo pelo qual a proteína Takeout regula funções

fisiológicas permanece desconhecida. Experimentos mostraram que *takeout* da cigarrinha foi induzida após 1 h ou 1 dia após aplicação tópica de HJ-III, enquanto o nível de expressão foi reduzido após 2-3 dias da aplicação. Isso indica um possível mecanismo de feedback negativo na regulação dos genes *takeout* após síntese de HJ (LIN; ZHANG; JIANG, 2017).

A taxa de transcrição do gene *takeout* se mantém baixa nos cérebros de operárias em todo o período larval estudado (L3-L5F2), enquanto nos cérebros de rainha, a taxa transcrição é vista com uma parábola com ponto alto nas fases L3 e L5F2 e um vale na fase L4 (Figura 26). Essa queda da expressão do gene *takeout* na fase L4 está em conformidade com os trabalhos que mostram o *feedback* negativo produzido pelo HJ sobre este gene, uma vez que é justamente nesta fase larval (L4) que este hormônio apresenta um pico de síntese em rainhas (Figura 27). Os níveis de expressão deste gene em operárias não sofrem grandes alterações no estágio larval, assim como ocorre com a produção do HJ, na fase considerada neste estudo. Esta proteína poderia atuar na regulação do desenvolvimento cerebral pela ligação ao HJ, regulando a quantidade disponível nos cérebros de rainhas e consequentemente a ativação e inativação de genes regulados por HJ, favorecendo o desenvolvimento deste órgão nas larvas de rainhas.

### 5.2.6 HEXAMERINAS

Três dos genes mais expressos no cérebro de operárias codificam para proteínas da família das hexamerinas (Hex70b, Hex70c e Hex110) que, tradicionalmente, foram associadas a funções estruturais próprias do corpo gorduroso (CG) (UENO; OSHAWA; NATORI, 1983). Elas receberam este nome devido a serem compostas de 6 subunidades polipeptídicas. Com poucas exceções, estas proteínas apresentam peso molecular em torno de 500 quilodaltons (kDa). Em *Drosophila*, proteínas comparáveis são chamadas de proteínas de estocagem larval (Lsp) (SEKERIS et al., 1977).

As hexamerinas são sintetizadas em grandes quantidades pelas células do CG durante a fase de crescimento das larvas e são secretadas para a hemolinfa onde se acumulam (TELFER; KUNKEL, 1991). Durante a metamorfose, estas proteínas de estocagem são retiradas da hemolinfa pelo CG onde elas são compactadas em grânulos

de proteína para posterior reciclagem. Isso foi demonstrado primeiramente no lepidóptero *Calpodetes ethlius* (LOCKE; COLLINS, 1968), mas é o que acontece em geral nos insetos (WYATT; PAN, 1978).

As proteínas codificadas pelos genes de hexamerinas são monômeros que recebem o nome de acordo com seu peso molecular, sendo quatro encontradas em *A. mellifera*: 70a, 70b, 70c e 110 (DANTY et al., 1998). A Hex110 é codificada pelo gene que está presente em uma única cópia no genoma, no grupo 11.18, e está separado dos genes das outras três hexamerinas que são dispostos em tandem no grupo 8.21 na montagem do genoma de *A. mellifera* versão 4.5. (MARTINS et al., 2010). A Hex110 tem uma massa molecular de 110 kDa e mostra um alto conteúdo de resíduos de glutamina/ácido glutâmico (20,9%) (MARTINS et al., 2010). Isto também é mostrado por hexamerinas de outros himenópteros, como a vespa parasita *Nasonia vitripennis* (CRISTINO et al., 2010), outras espécies de vespa (HUNT; BUCK; WHEELER, 2003) e formigas (WHEELER; BUCK, 1995) e também por membros de outra família derivada das hemocianinas em *Drosophila*, o receptor de hexamerina FBP1 (BURMESTER; ANTONIEWSKI; LEPESANT, 1999).

Durante o desenvolvimento larval, os genes das três hexamerinas estudadas neste trabalho (Hex70b, Hex70c e Hex110) se mostraram com maior expressão em cérebros de operárias durante as fases larvais L3 e L4, tendo o nível de expressão nivelado ao observado em cérebros de rainhas na fase L5F2. Dentro dos estágios de desenvolvimento das abelhas *A. mellifera*, o estágio larval se caracteriza por intensa alimentação, e no estágio posterior (pupal) não há ingestão de alimentos. Assim, todos os nutrientes requeridos no estágio pupal/farato-adulto (período de desenvolvimento do inseto adulto) devem ser obtidos e armazenados durante o estágio larval. Estudos anteriores mostram que no estágio pupal ocorre uma inversão no tamanho do cérebro entre rainha e operária, ficando o da casta operária proporcionalmente maior que o de rainhas (MODA et al., 2013). Dessa forma, as operárias precisariam de maior quantidade de nutrientes para que seus cérebros se desenvolvam mais no estágio pupal. Como a expressão das três hexamerinas é maior no cérebro de operárias durante as fases L3 e L4 e depois iguala ao nível de rainhas, sugere-se que essas proteínas estariam atuando como reserva de aminoácidos que serão consumidos no estágio subsequente de desenvolvimento. Em um trabalho realizado por Cunha e colegas (2005) foi demonstrado que a Hex70b desempenha papel de fornecedora de aminoácidos quando

não há proteínas disponíveis, recrutando as Hex70b, com provável intuito de utilizá-las na biossíntese de proteínas. Mesmo como proteína de armazenamento, as Hexamerinas podem estar desempenhando um papel na sinalização nutricional, como é sugerido nos cupins (ZHOU; OI; SCHARF, 2006), permitindo que as larvas determinem quando estão prontas para iniciar sua metamorfose, o que pode explicar o nível de expressão destes genes se igualem na última fase analisada (L5F2). Essa hipótese é corroborada pelo trabalho realizado por Okada e colaboradores (2017) que mostra que a expressão de hexamerinas no cérebro de formigas está associada à detecção de nutrientes.

Ainda que a função clássica das hexamerinas esteja relacionada a estocagem de aminoácidos, a hexamerina parece desempenhar outras funções, como transporte de HJ e ecdisteróides, resposta imune e no processo de diferenciação de castas (BRAUN; WYATT, 1996; POOPATHI et al., 2014; LI et al., 2017). Cameron; Duncan; Dearden (2013) mostraram que estas proteínas são indispensáveis para o desenvolvimento da casta operária. Algumas hexamerinas se ligam a HJ (ZHOU; TARVER; SCHARF, 2007; BRAUN; WYATT, 1996), acreditando-se que essas proteínas possam se ligar a HJ em insetos sociais para modular os títulos deste hormônio (ZHOU; OI; SCHARF, 2006). Um trabalho realizado por Calkins e colaboradores (2018) aplicou um mimético do HJ (S-hidropreno) em rainhas virgens e acasaladas da formiga *Solenopsis invicta* e observou que a expressão das hexamerinas diminuía após a aplicação, sugerindo que o HJ regula negativamente a expressão destes genes. Analisando o gráfico de título de HJ no período larval de *A. mellifera*, é possível perceber que em rainhas o título de HJ é mais alto que em operárias no estágio larval, enquanto a expressão das *hex70b*, *hex70c* e *hex110* é mais alta no cérebro de operárias, corroborando a hipótese de que o HJ regula negativamente a expressão de *hexamerinas*. Assim, é possível que as hexamerinas estejam associadas ao HJ em duas situações no cérebro das abelhas: sua expressão seria regulada negativamente por HJ e também se ligaria a este hormônio (assim como ocorre com Takeout), controlando sua disponibilidade e, assim, participando indiretamente na regulação de genes regulados por HJ, contribuindo para o difenismo cerebral entre as castas de *A. mellifera* no período larval.

Recentemente, as quatro hexamerinas foram encontradas em núcleos de células do corpo cogumelar de larvas e pupas de abelhas operárias (MARTINS; BITONDI, 2012), o que sugere funções adicionais a esta proteína de estocagem. Outros estudos detectaram transcritos de *hex110* no CG de operárias adultas, em gônadas em

desenvolvimento de operárias e zangões, e nos ovários de rainhas em oviposição (MARTINS et al., 2010). Outro trabalho mostra a presença de Hex110 em cérebros de operárias adultas (HERNÁNDEZ et al., 2012). Neste sentido, apesar de ter sido estudada a princípio apenas no corpo corduroso, a expressão de *hex110* foi mostrada em outros órgãos e nosso grupo mostrou que este gene é transcrito no cérebro de larvas L3. Sua expressão no cérebro foi corroborada por nossos experimentos de imunolocalização. Neste ensaio, visualizou-se uma maior marcação da proteína Hex110 em cérebros de operária L4 em comparação ao mesmo órgão em rainhas L4, mas não parece haver diferença de marcação entre os cérebros das castas na fase L3 (Figura 15). Estes resultados indicam que mesmo o transcrito sendo produzido em níveis diferentes entre castas em L3, sua tradução não é simultânea à sua transcrição. Isto sugere um papel de Hex110 na morfogênese diferencial cerebral a partir de L4.

A distribuição da marcação de Hex110 na estrutura cerebral na fase L4 se mostra homogênea em todo o cérebro de operárias, enquanto que em rainhas a marcação parece se concentrar nas regiões onde estão os lobos antenais (LA) e lobos ópticos (LO), estando em menor concentração nos corpos cogumelares (CC). Moda e colaboradores (2013) demonstraram que as estruturas dos CC, cálices e pedúnculos, se desenvolvem mais rapidamente nos cérebros de rainhas em comparação a operárias no período larval. Estes resultados tomados em conjunto com o possível papel das Hex110 como regulador da divisão celular, poderiam explicar o desenvolvimento mais rápido de estruturas dos CC em cérebros de rainha, uma vez que esta é a região com menor marcação de Hex110 e, portanto, estaria sofrendo maior número de divisões celulares.

Estes ensaios também mostram a Hex110 presente no núcleo. Ela deve ser transportada pelo envelope nuclear de forma passiva, uma vez que proteínas de até 110 kD conseguem entrar no núcleo por difusão passiva pelo poro nuclear (WANG; BRATTAIN, 2007). Elas também podem entrar por transporte mediado por uma sequência sinal de localização nuclear (NLS) que foi encontrada na Hex110 em análises *in silico* (MARTINS; BITONDI, 2016), o que indica que estas proteínas são transportadas após sua síntese.

Em trabalhos realizados com células de ovários de *A. mellifera*, a Hex110 foi encontrada em nucléolos em co-localização com a pironina Y, uma sonda fluorescente usada para marcar RNA (mRNA, tRNA e rRNA) (MARTINS; BITONDI, 2016). O nucléolo é composto por DNA, RNA e proteínas. O DNA presente nessa organela

origina RNA ribossômico que, juntamente com as proteínas presentes no nucléolo, formam a estrutura dos ribossomos. O nucléolo também tem papel no transporte e modificação do RNA e regulação do ciclo celular (ANDERSEN et al., 2002). Experimentos realizados por Martins; Bitondi (2016) mostraram que a Hex110 é sensível ao tratamento com RNase e tem potenciais locais de ligação ao RNA. Estas características dão suporte à associação da Hex110 com o RNA, participando da regulação do ciclo celular, e conseqüentemente da proliferação neuronal. Poderia essa proteína atuar no processo de desenvolvimento diferencial do cérebro entre as castas de *A. mellifera* regulando o número de divisões celulares que ocorrem no cérebro de operárias durante o período larval.

### 5.3 A regulação da expressão diferencial de mRNAs por miRNAs e a morfogênese do cérebro larval em castas de abelhas

Embora há pouco tempo acreditava-se que os RNAs teriam apenas o papel de servir de molde para a síntese proteica, hoje sabe-se que estes desempenham uma grande variedade de funções estruturais, catalíticas e regulatórias. Recentemente, estas moléculas têm se destacado por sua atuação em mecanismos regulatórios pós-transcricionais, de forma que RNAs de diferentes comprimentos são conhecidos por intermediar o silenciamento da expressão gênica (GARIBAY; JARQUIN, 2014). Essa descoberta permitiu entender muitas questões regulatórias, mas, também, tornou o fenômeno da regulação gênica muito mais complexo e de difícil elucidação.

A identificação de mRNAs com sítios alvos para miRNAs é frequentemente associada com a supressão pós-transcricional destes genes alvo, sendo a experimentação direta necessária, não só para confirmar a capacidade de miRNAs para afetar genes alvos previstos, mas também para verificar os efeitos em condições fisiologicamente relevantes. Dessa forma, a confirmação das interações miRNA-mRNA é importante para a melhor compreensão da regulação da tradução e conseqüentemente de sistemas biológicos (LUCAS; RAIKHEL, 2013), ou ainda para aplicações práticas como no melhor conhecimento das bases moleculares de certas doenças. Casos em que, por exemplo, se entender a regulação de uma proteína carcinogênica por um miRNA é

importante para se entender como um câncer pode se desenvolver (LI et al., 2015; WANG et al., 2015). Em nosso trabalho, fizemos a predição de interações entre os nove genes diferencialmente expressos entre as castas de *A. mellifera*, especificamente no cérebro, e três miRNAs já conhecidos por regular genes envolvidos na neurogênese.

Um trabalho realizado por Liu et al. (2012) mostrou que o *miR-34* é altamente conservado entre as espécies animais. O *miR-34a* de mamíferos é conhecido por inibir a proliferação celular, induzir apoptose e aumentar a diferenciação celular (HERMEKING, 2010). A perda de expressão de *miR-34* leva à ocorrência de uma variedade de tumores, incluindo meduloblastoma, cancro do cólon, carcinoma hepatocelular e cancro gástrico. Em ratos, o *miR-34a* está implicado na diferenciação de células estaminais neuronais, e a sua expressão ectópica promove a formação de neurônios pós-mitóticos (ARANHA et al., 2011). No *zebrafish*, o padrão espacial de expressão de *miR-34* concentra-se na parte posterior do cérebro, ao passo que no cérebro de ratos em desenvolvimento e adultos sua expressão é elevada no cerebelo (KAPSIMALI et al., 2007; OLSEN et al., 2009). Experimentos com cultura de células realizados por Jauhari et al. (2017) mostraram que os cérebros e as células cerebrais expressam a quantidade máxima de *miR-34*, e aumenta ainda mais com a maturação dos neurônios e o envelhecimento do cérebro, sendo este miRNA muito importante para o desenvolvimento neuronal. Dessa forma, *ame-miR-34* poderia atuar na regulação de genes relacionados à neurogênese entre as castas.

Wang et al. (2013) relatou a expressão de *miR-210* em células progenitoras neurais e identificaram a proteína 3 (BNIP3) que promove a morte celular, como alvo funcional direto do *miR-210*. Em outro estudo, realizado por Zhang et al. (2015), analisando tecidos do cérebro saudável e tecido de glioblastoma multiforme de humanos, foi mostrado que a maior expressão de *miR-210* induziu proliferação celular e diminuição da apoptose celular. O *miR-210* é altamente transcrito nas células Kenyon dos corpos cogumelares e em células que rodeiam os lobos antenais em *A. mellifera* (CRISTINO et al., 2014). Assim, este miRNA pode desempenhar papéis no desenvolvimento do sistema nervoso, participando na regulação da proliferação e morte celular.

O miRNA *ame-miR-317* é codificado no mesmo *host gene* que o *ame-miR-34*, e tem funções neurais em *A. mellifera* (HORI et al., 2010). O *miR-317* está envolvido na regulação de *ocelliless* (RAJEWSKI; SOCCI, 2004), que tem sido implicado no

desenvolvimento da ponte protocerebral, um componente do complexo central associado à locomoção (HIRTH et al., 1995). Este miRNA apresenta potenciais ainda não explorados de regulação do sistema nervoso e seria um ótimo candidato a estudos no desenvolvimento do cérebro de *A. mellifera*.

Os três miRNAs selecionados para este trabalho apresentaram-se em maior quantidade nos cérebros de rainhas na fase L3, ao contrário do que se previa considerando que a geleia de operária é composta por maior quantidade desses miRNAs quando comparada à geleia real. Assim, os maiores níveis de miRNA endógeno nos cérebros de rainhas na fase L3 nos sugere que há síntese *in loco* desses miRNAs. As discussões sobre as interações miRNA-mRNA se darão considerando a regulação que os miRNAs podem acarretar na fase em que foram quantificados e na fase posterior (L4).

Nosso trabalho fornece evidência experimental de que os miRNAs *miR-34* e *miR-210*, encontrados em maior quantidade nos cérebros de rainhas na fase L3, se ligam a elementos de regulação dos mRNAs das *hex70b* e *hex110*, que são mais transcritos nos cérebros de operárias nas fases L3 e L4. Essas interações poderiam aumentar a diferença na quantidade de transcritos de *hex70b* e *hex110* entre os cérebros de rainhas e operárias nas fases larvais L3 e L4, contribuindo para uma maior participação das respectivas proteínas na inibição comparativa do desenvolvimento do cérebro de operárias, seja pela função de sinalização nutricional, ligação ao HJ ou regulação da divisão celular. Nos ensaios da luciferase, também foi possível testar as ligações entre o miRNA-34 e o gene *hex70c*, que também se encontram em maiores níveis no cérebro de rainhas e operárias, respectivamente. Interessantemente, esta interação foi positiva, ou seja, aumentou a quantidade de luminescência medida nos experimentos, o que demonstra que o miRNA atuou aumentando a tradução da proteína, agindo de forma contrária à função clássica do miRNA. A regulação positiva de alvos pelos miRNAs vem ganhando crescente corpo de evidências (VASUDEVAN, 2012; CAMPOS-MELO et al., 2014). Os *miR-34* e *miR-210* atuando sobre as três *hexamerinas* devem participar do balanço na quantidade de tradução destas proteínas, aumentando ou diminuindo, garantindo que as hexamerinas possam desempenhar suas funções no desenvolvimento do sistema nervoso de *A. mellifera*.

Outros dois genes que mostraram resultados interessantes são *mas* e *amci*, cujas proteínas exercem funções opostas no desenvolvimento cerebral, como discutido

anteriormente. *Mas* apresenta transcrição nos cérebros de rainhas praticamente no mesmo nível nas três fases analisadas neste trabalho. A interação validada para o *miR-210* mostrou regulação negativa, enquanto para o *miR-317* a regulação foi positiva. O balanço da regulação pelos dois miRNAs pode refletir-se na manutenção do nível de transcritos praticamente igual nas fases analisadas. Por outro lado, o gene *amci*, que apresenta nível de transcrição mais elevado nos cérebros de operárias nas fases L3 e L4 e perfil crescente de transcrição nos cérebros de rainhas em todo o período larval analisado, teve regulação positiva validada para os *miR-34* e *miR-317*. Essa regulação positiva, poderia indicar que esses miRNAs atuam nos cérebros de rainhas garantindo uma variação ascendente na quantidade de transcritos de *amci* no período larval. As validações das interações dos miRNAs entre *mas* e, principalmente, *amci*, sugerem que estes miRNAs participam da regulação da quantidade de transcrito, e conseqüentemente de proteínas, durante o período larval, permitindo que *Mas* não esteja inibida por *Amci* nos cérebros de rainhas nas fases L3 e L4, e contribua para o maior desenvolvimento cerebral dessa casta, observado a partir da fase L4.

As interações entre *nt-1* e *miR-34* e *forked* e *miR-317* também foram validadas e apresentaram regulação negativa. Os dois genes, *nt-1* e *forked*, apresentam mais transcritos na fase L3 em cérebros de rainhas, ocorrendo inversão favorecendo operárias na fase seguinte (L4). A regulação negativa, validada para ambos, sugere que a interação dos miRNAs com seus alvos entre as fases L3 e L4 nos cérebros de rainhas resultem na queda de transcritos desses genes observada na fase L4. Situação semelhante ocorre com o gene *takeout*. Em cérebros de rainhas, podemos perceber que o número de transcritos sofre queda na fase L4 e volta a subir na fase L5. A interação deste gene com o *miR-34* (interação validada neste trabalho), poderia atuar garantindo essa queda na quantidade de transcritos observada na fase L4, o que resultaria em menor quantidade da proteína disponível, que deixaria de se ligar ao HJ, favorecendo o pico desse hormônio observado na mesma fase em rainhas.

Evidências crescentes sugerem que os miRNAs conferem robustez genética por meio do reforço de programas transcricionais, garantindo o perfil transcricional espaço-temporal correto, o que permitiria a diferenciação tecidual adequada durante cada estágio do desenvolvimento (ASGARI, 2013). Muitos trabalhos já foram realizados na validação e elucidação das interações miRNA-mRNA na regulação de comportamento de insetos (LUCAS; RAIKHEL, 2013; PICAOSORIO et al., 2015; CHEN et al.,

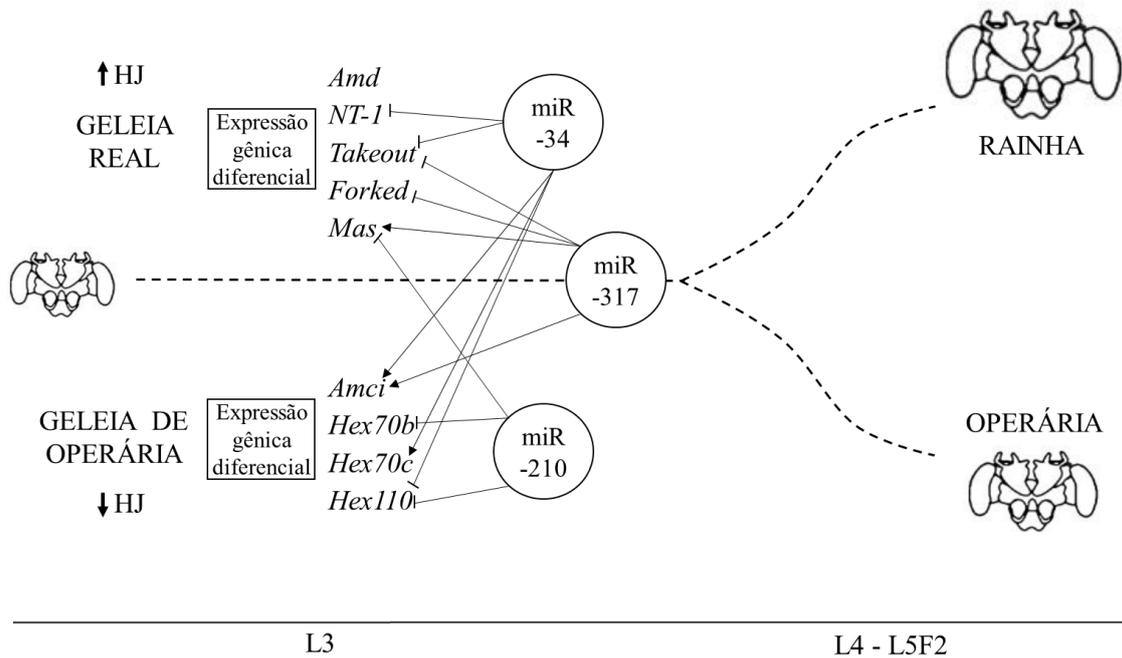
2014; YANG et al., 2014), mas pouco se sabe sobre o papel destes na neurogênese de insetos. Um trabalho recente (MENZEL et al., 2019) investigou os miRNAs com funções putativas na neurogênese de *Drosophila melanogaster*, mas sabe-se pouco ainda sobre o papel destas moléculas no processo de desenvolvimento do cérebro. Um estudo realizado por Ashby e colaboradores (2016) mostrou que o perfil de expressão de miRNAs é distinto entre as castas de *A. mellifera*, podendo fazer parte integral da estrutura molecular subjacente ao desenvolvimento desta espécie. Também demonstraram que as interações miRNA-mRNA formam uma rede altamente interconectada na regulação de processos celulares envolvidos na diferenciação neuronal, sinalização celular e formação de estruturas casta-específicas. Nossos estudos, além de enriquecer o entendimento dos miRNAs deste organismo modelo, mostra que estes participam da regulação de genes envolvidos no desenvolvimento cerebral de *A. mellifera* e traz novos dados experimentais para estudos da relação de miRNAs e mRNAs no desenvolvimento cerebral inicial das abelhas.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados das análises comparativas dos genes neurogênicos clássicos não refletem uma associação entre proporção destes e o nível de socialidade em insetos (hipótese do cérebro social), não havendo maior proporção de genes neurogênicos para as espécies sociais e menor para as solitárias.

Os cérebros de rainhas e operárias de *A. mellifera* mostram-se diferencialmente desenvolvidos a partir da fase larval L4, favorecendo rainhas durante a fase larval. O estabelecimento desse dimorfismo cerebral inicia-se na fase L3, momento em que a alimentação das larvas se torna casta-específica. Isto promove maiores níveis de síntese de HJ em larvas de rainhas, levando à expressão diferencial de genes codificadores de proteínas efetoras (*Amd*, *NT-1*, *Forked*, *Mas*, *Amci*), e também de proteínas que se ligam ao HJ e podem regular sua disponibilidade no organismo de *A. mellifera* (*Takeout*, *Hex70b*, *Hex70c* e *Hex110*). Além disso, a *Hex110* parece estar associada a regulação da divisão celular, alterando o número de proliferação celular no cérebro durante o período larval. Os nove genes estudados neste trabalho, exceto *amd*, são regulados pelos miRNAs *miR-317*, *miR-34* e *miR-210*. Assim, o dimorfismo cerebral observado claramente a partir de L4 pode dever-se a um complexo sistema de regulação que inclua transcrição diferencial regulada pela ação de miRNAs em genes alvos, que está resumido na Figura 38.

Figura 38. Esquema proposto para explicar os aspectos moleculares do processo de morfogênese cerebral diferencial no período larval de castas de *A. mellifera*.



Fonte: Da autora.

Nota: A partir da fase L3 a alimentação das larvas passa a ser casta específica, o que resulta em síntese de HJ e quantidades diferentes entre as castas. Esses fatores levam a expressão diferencial dos nove genes estudados neste trabalho: *amd*, *nt-1*, *takeout*, *forked* e *mas*, com maior expressão no cérebro de rainha na fase L3 e *amci*, *hex70b*, *hex70c* e *hex110*, com maior expressão nos cérebros de operárias na fase L3. Como mostrado na figura, oito destes genes são regulados negativamente (—) ou positivamente (→) pelos miRNAs *miR-34*, *miR-317* e *miR-210*. Em conjunto, esses aspectos moleculares promovem morfogêneses diferenciais favorecendo as larvas de rainhas de *A. mellifera*.

**REFERÊNCIAS**

AIRHART, M. J. et al. Adverse effects of serotonin depletion in developing *zebrafish*. **Neurotoxicol Teratol.**, v. 34, p. 152-160, 2012.

AKHMANOVA A.; STEARNS, T. Cell architecture: putting the building blocks together. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 25, p. 3-5, 2013.

ALTENHEIN, B. Glial cell progenitors in the *Drosophila* embryo. **Wiley Online Library**, v. 63, p.1291–1302, 2015.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, p. 350–355, 2004.

ANDERSEN, J. S. et al. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. **Curr Biol**, v. 12, p. 1–11, 2002.

ARAKI, K. Y.; SIMS, J. R.; BHIDE, P. G. Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre- and postnatal development. **Brain Res.**, v. 1156, p. 31-45, 2007.

ARANCIO, O.; CHAO, M. Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. **Curr Opin Neurobiol**, v. 17, p. 325–330, 2007.

ARANHA, M. M. et al. *miR-34a* regulates mouse neural stem cell differentiation. **PLoS ONE**, v. 6, p. e21396, 2011.

ASGARI, S. MicroRNA functions in insects. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 43, p. 388-397, 2013.

ASHBY, R. et al. MicroRNAs in Honey Bee Caste Determination. **Sci Rep.**, v. 6, p. 18794, 2016.

BALLARD, S. L.; MILLER, D. L.; GANETZKY, B. Retrograde neurotrophin signaling through Tollo regulates synaptic growth in *Drosophila*. **J Cell Biol.**, v. 204, p. 1157-1172, 2014.

BARCHUK, A. R. et al., The ontogenetic saga of a social brain. **Apidologie**, v. 11, p 1-17, 2017.

BARCHUK, A. R. et al. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. **BMC Dev Biol**, v. 7, p. 70, 2007.

BARTEL, D. P. Metazoan MicroRNAs. **Cell.**, v. 173, p. 20-51. 2018

BLOCH, G. The social clock of the honeybee. **J Biol Rhythms.**, v. 25, p. 307-317, 2010.

BLUM, R.; KONNERTH, A. Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. **Physiol.**, v. 20, p. 70-78, 2005.

BOMTORIN, A. D. et al. Hox gene expressions leads to differential hind leg development between honeybee castes. **Plos One.**, v. 7, n. 7, p. e40111, 2012.

BOONE, J. Q.; DOE, C. Q. Identification of *Drosophila* type II neuro-blast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. **Dev Neurobiol**, v. 68, p. 1185–1195, 2008.

BRANDT et al. Three-dimensional average-shape atlas of honey bee brain and its applications. **J. Comp. Neurol.** v. 492, p. 1-19, 2005.

BRAUN, R. P.; WYATT, G. R. Sequence of the hexameric juvenile hormone-binding protein from the hemolymph of *Locusta migratoria*. **J Biol Chem.**, v. 271, p. 31756-31762, 1996.

BURMESTER, T.; ANTONIEWSKI, C.; LEPESANT, J. A. Ecdysone-regulation of synthesis and processing of fat body protein 1, the larval serum protein receptor of *Drosophila melanogaster*. **Eur J Biochem.**, v. 262, p. 49-55, 1999.

CAMERON, R. C.; DUNCAN, E. J.; DARDEN, P. K. Biased gene expression in early honeybee larval development. **BMC Genomics.**, v. 14, p. 903, 2013.

CAMPOS-MELO, D. et al. Comprehensive luciferase-based reporter gene assay reveals previously masked up-regulatory effects of miRNAs. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, p. 15592-15602, 2014.

- CHAMSEDDIN, K. H. et al. takeout-dependent longevity is associated with altered Juvenile Hormone signaling. **Mech Ageing Dev.**, v. 133, p. 637-646, 2012.
- CHAMY, L. et al. Sensing of 'danger signals' and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways 'upstream' of Toll. **Nat Immunol.**, v. 9, p. 1165-1170, 2008.
- CHAWLA, G. et al. A let-7-to-miR-125 microRNA switch regulates neuronal integrity and lifespan in *Drosophila*. **PLoS Genetics**, v. 12, p. e1006247, 2016.
- CHEN, Z-Y. et al. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. **Science**, v. 314, p. 140–143, 2006.
- CHEN, X. et al. Transcriptome comparison between honey bee queen- and worker-destined larvae. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 42, p. 665-673, 2012.
- CHEN, Y. W. et al. Systematic study of *Drosophila* microRNA functions using a collection of targeted knockout mutations. **Dev Cell.**, v. 31, p. 784-800, 2014.
- CHO, K. J. et al. MicroRNA-Let-7a regulates the function of microglia in inflammation. **Mol Cell Neurosci.**, v. 68, p. 167–176, 2015.
- CIERPICKI, T.; BANIA, J.; OTLEWSKI, J. NMR solution structure of *Apis mellifera* chymotrypsin/cathepsin G inhibitor-1 (AMCI-1): structural similarity with *Ascaris* protease inhibitors. **Protein Sci.**, v. 9, p. 976-84, 2000.
- COLEMAN, L. G. JR.; ZOU, J.; CREWS, F. T. Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7. **J Neuroinflammation**, v. 14, p. 22, 2017.
- COTTRELL, G. S. et al. Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. **J Biol Chem.**, v. 279, p. 13532-13539, 2004.
- COUTINHO-BUDD, J. C.; SHEEMAN, A. E.; FREEMAN, M. R. The secreted neurotrophin Spätzle 3 promotes glial morphogenesis and supports neuronal survival and function. **Genes Dev.**, v. 31, p. 2023-2038, 2017.

- CRANDALL, J. E. et al. Dopamine receptor activation modulates GABA neuron migration from the basal forebrain to the cerebral cortex. **J Neurosci.**, v. 27, p. 3813-3822, 2007.
- CRISTINO, A. S. et al. Neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders represent an interconnected molecular system. **Mol Psychiatry**, v. 19, p. 294-301, 2014.
- CRISTINO, A. S. et al. Organization, evolution and transcriptional profile of hexamerin genes of the parasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Insect Mol Biol**, v. 1, p. 137-146, 2010.
- CUBAS, P. et al. Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. **Genes Dev.**, v. 5, p. 996-1008, 1991.
- CUNHA, A. D. et al. Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera*. **J Insect Physiol.**, v. 51, p. 1135-1147, 2005.
- DANTY, E. et al. Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. **Insect Biochem Mol Bio**, v. 28, p. 387-397, 1998.
- DAUWALDER, B. et al. The *Drosophila* takeout gene is regulated by the somatic sex-determination pathway and affects male courtship behavior. **Genes Dev.**, v. 16, p. 2879-2892, 2002.
- DAVIES, A. M. Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. **EMBO J**, v. 22, p. 2537-2545, 2003.
- DAVIS, R.L. Mushroom bodies, Ca<sup>2+</sup> oscillations, and the memory gene amnesiac. **Neuron**, v. 30, p. 653-656, 2001.
- DELOTTO, Y.; DELOTTO, R. Proteolytic processing of the *Drosophila* Spatzle protein by easter generates a dimeric NGF-like molecule with ventralising activity. **Mech. Dev.**, v. 72, p. 141-148, 1998.
- DEWHURST, S. A. et al. Metabolism of biogenic amines in *Drosophila* nervous tissue. **Comp Biochem Physiol B.**, v. 43, p. 975-981, 1972.

DIDIANO D, HOBERT O. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA target interactions. **Nat Struct Mol Biol.**, v. 13, p. 849-851, 2006.

DIDIANO D, HOBERT O. Molecular architecture of a miRNA-regulated 3' UTR. **RNA**, v. 14, p. 1297-1317, 2008.

DILLON, C.; GODA, Y. The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. **Annu Rev Neurosci.**, v. 28, p. 25-55, 2005.

DOENCH, J. G.; SHARP, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. **Genes Dev.**, v. 18, p. 504-511, 2004.

DRAPEAU et al. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. **Genome Res**, v. 16, p. 1385–1394, 2006.

DU PRAW, E. J. **The honeybee embryo**. New York: Crowell, 1967.

DUNBAR, R. I.; SHULTZ, S. Evolution in the social brain. **Science**, v. 317, p. 1344-1347, 2007.

DUNBAR, R. I. M. The social brain hypothesis. **Evol. Anthropol.**, v. 6, p. 178-190, 1998.

ELSIK, C. G. et al. Hymenoptera Genome Database: integrating genome annotations in HymenopteraMine. **Nucleic Acids Research**, v. 44(D1), p. D793-800, 2014.

EVELETH, D. D.; MARSH, J. L. Evidence for evolutionary duplication of genes in the dopa decarboxylase region of *Drosophila*. **Genetics.**, v. 114, p. 469-483, 1986.

FARRIS, S. M. et al. Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. **J Comp Neurol**, v. 414, p. 97–113, 1999.

FARRIS, S. M.; SINAKEVITCH, I. Development and evolution of the insect mushroom bodies: towards the understanding of conserved developmental mechanisms in a higher brain center. **Arthropod Struct Dev**, v. 32, p. 79–101, 2003.

FASANARO, P. et al. ROD1 is a seedless target gene of hypoxia-induced *miR-210*. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44651, 2012.

FATH, K. R.; BURGESS, D. R. Microvillus assembly. Not actin alone. **Curr Biol.**, v. 5, p. 591-593, 1995.

FINEBERG, S. K.; KOSIK, K. S.; DAVIDSON, B. L. MicroRNAs potentiate neural development. **Neuron**, v. 64, p. 303–309, 2009.

FLATT, T.; KAWECK, T. J. Juvenile hormone as a regulator of the trade-off between reproduction and life span in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, v. 61, p. 1980-1991, 2007.

FLEIG, R.; SANDER, K. Embryogenesis of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): an SEM study. **J Insect Morphol Embryol**, v. 15, p. 449–462, 1986.

FLINN, L. et al. Complex I deficiency and dopaminergic neuronal cell loss in parkin-deficient *zebrafish* (*Danio rerio*). **Brain**, v. 132, p. 1613-1623, 2009.

FREITAS, F. C. P. **Análise do transcriptoma do desenvolvimento embrionário de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) e a regulação dos genes *eve*, *hairy*, *ftz-f1* e *act5C* pelo *miR-34***. 2014. 157f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2014.

FREITAS F.C.P. et al. The nuclear and mitochondrial genomes of *Frieseomelitta varia* – a highly eusocial stingless bee (Meliponini) with a permanently sterile worker caste. **BMC Genomics** (under review).

FRIEDMAN, R.C. et al. Most mammalian RNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res**, v. 19, p. 92–105, 2009.

GANGLOFF, M. et al. Structural insight into the mechanism of activation of the Toll receptor by the dimeric ligand Spätzle. **J Biol Chem.**, v. 283, p. 14629-14635, 2008.

GARCIA-BELLIDO, A.; DE CELIS, J. F. The complex tale of the achaetescute complex: a paradigmatic case in the analysis of gene organization and function during development. **Genetics**, v. 182, p. 631-639, 2009.

GARIBAY, T. J. D.; JARQUIN, A. G. Transcriptional regulation mechanism mediated by miRNA-DNA•DNA triplex structure stabilized by Argonaute. **Biochim Biophys Acta**, v. 1839, n. 11, p. 1079-1083, 2014.

GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nat Rev Neurosci.**, v. 4, p. 1002-1012, 2003.

GERBER, B.; TANIMOTO, H.; HEISENBERG. An engram found? Evaluating the evidence from fruit flies. **Curr Opin Neurobiol**, v. 14, p. 737-744, 2004.

GINGRICH, M. B.; TRAYNELIS, S. F. Serine proteases and brain damage - is there a link? **Trends Neurosci.**, v. 23, p. 399-407, 2000.

GRIESHABER, S.; PETERSEN, N. S. The *Drosophila* forked protein induces the formation of actin fiber bundles in vertebrate cells. **J Cell Sci.**, v. 112, p. 2203-2211, 1999.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: tools for microRNA genomics. **Nucleic Acids Res**, v. 36, p. D154-8, 2008.

GSCHWEND, T. P. et al. Neurotrypsin, a novel multidomain serine protease expressed in the nervous system. **Mol Cell Neurosci.**, v. 9, p. 207-219, 1997.

GUO, X. Q. The development and molecular mechanism of queen-worker differentiation, the miRNAs of royal jelly make a difference to queen-worker differentiation. National Science Library, **Chinese Academy of Sciences**, 156p, 2010.

GUO, X. et al. Recipe for a busy bee: microRNAs in honey bee caste determination. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e81661, 2013.

HÄHNLEIN, I.; BICKER, G. Glial patterning during postembryonic development of central neuropiles in the brain of the honeybee. **Dev Genes Evol**, v. 207, p. 29-41. 1997

HAMIAUX, C. et al. Crystal structure of Epiphyas postvittana takeout 1 with bound ubiquinone supports a role as ligand carriers for takeout proteins in insects. **J Biol Chem.**, v. 284, p. 3496-3503, 2009.

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. Social insect polymorphism hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. **Current Topics in Dev. Biol.** v. 40, p. 45-77, 1998.

HE, L.; HANNON, G.J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nat Rev Genet**, v. 5, p. 522–531, 2004.

HELFRICH-FÖRSTER, C. The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.**, v. 190, p. 601-613, 2004.

HERMEKING, H. The *miR-34* family in cancer and apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 17, p. 193–199, 2010.

HERNANDES, N. H. Moléculas reguladoras do crescimento larval e da metamorfose em abelhas operárias *Apis mellifera*. 2013. 73f. Monografia - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2013.

HERNÁNDEZ, L. G. et al. Worker honeybee brain proteome. **J Proteome Res.**, v. 11, p. 1485–1493, 2012.

HIRTH, F. et al. Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes *orthodenticle* and *empty spiracles* in *Drosophila*. **Neuron**, v. 15, p. 769–778, 1995.

HOMEM, C.; REPIC, M.; KNOBLICH, J. A. Proliferation control in neural stem and progenitor cells. **Nat. Rev.**, v. 16, p. 647–65, 2015.

HORI, S. et al. Expression of two microRNAs, *ame-mir-276* and *-1000*, in the adult honeybee (*Apis mellifera*) brain. **Apidologie**, v. 42, p. 89–102, 2010.

HORRIDGE, A. Generalization in visual recognition by the honeybee (*Apis mellifera*): a review and explanation. **J Insect Physiol**, v. 55, p. 499-511, 2009.

HUNT, J. H.; BUCK, N. A.; WHEELER, D. E. Storage proteins in vespidae wasps: characterization, developmental pattern, and occurrence in adults. **J Insect Physiol**, p. 49, p. 785–794, 2003.

JANG, I. H. et al. A Spätzle-processing enzyme required for toll signaling activation in *Drosophila* innate immunity. **Dev Cell.**, v. 10, p. 45-55, 2006.

JAUHARI, A. et al. Regulation of *miR-34* Family in Neuronal Development. **Mol Neurobiol**, doi: 10.1007/s12035-016-0359-4, 2017.

JINEK, M.; DOUDNA, J. A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. **Nature**, v. 457, p. 405-412, 2009.

JOPLING, C. L. et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. **Science**, v. 309, p. 1577-1581, 2005.

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, v. 473, p. 478-483, 2011.

KAPSIMALI, M et al. MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. **Genome Biol**, v. 8, p. R173, 2007.

KENYON, F. C. The brain of the bee. A preliminary contribution to the morphology of the nervous system of the Arthropoda. **J Comp Neurol**, v. 6, p. 133–210, 1896.

KING, J. M. et al. L-Dihydroxyphenylalanine modulates the steady-state expression of mouse striatal tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine and its metabolites in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Life Sci.**, v. 89, p. 638-643, 2011.

KONISZEWSKI, N. D. B. et al. The insect central complex as model for heterochronic brain development—background, concepts, and tools. **Dev. Genes Evol**, v. 3, p. 209–219, 2016.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, p. 68-73, 2014.

KREK, A. et al. Combinatorial microRNA target predictions. **Nat Genet.**, v. 37, p. 495-500, 2005.

KRUGER, J.; REHMSMEIER, M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. **Nucleic Acids Res**, v. 34, p. W451-4, 2006.

KUCHARSKI, R. et al. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. **Science**, v. 319, p. 1827–1830, 2008.

KUCHERENKO, M. M. et al. Steroid-induced microRNA let-7 acts as a spatio-temporal code for neuronal cell fate in the developing *Drosophila* brain. **The EMBO Journal**, v. 31, p. 4511–4523, 2012.

LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. **Current biology**, v. 12, p. 735-739, 2002.

LANGE, A. B. Neural mechanisms coordinating the female reproductive system in the locust. **Front Biosci (Landmark Ed)**., v. 14, p. 4401-4415, 2009.

LAZAREVA, A. A. et al. A role for the adult fat body in *Drosophila* male courtship behavior. **PLoS Genet.**, v. 3, p. e16, 2007.

LEE, J., SEROOGY, K.B., MATTSON, M.P. Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. **J Neurochem**, v. 80, p. 539–547, 2002.

LEIMAR, O., et al. Development and evolution of caste dimorphism in honeybees - a modeling approach. **Ecol Evol**, v. 2, p. 3098-3109, 2012.

LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor 35 years later. **Science**, v. 237, p. 1154–1162, 1987.

LEWIS, B. P. et al. Prediction of mammalian microRNA targets. **Cell**, v. 115, p. 787-798, 2003.

LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, v. 120, p. 15–20, 2005.

LI, X. et al. MicroRNA-592 targets DEK oncogene and suppresses cell growth in the hepatocellular carcinoma cell line HepG2. **Int J Clin Exp Pathol.**, v. 8, p. 12455-12463, 2015.

LI, Y. et al. RNA-Seq Comparison of Larval and Adult Malpighian Tubules of the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* Reveals Life Stage-Specific Changes in Renal Function. **Front Physiol.**, v. 8, p. 283, 2017.

LIFE TECHNOLOGIES. Poor Efficiency of PCR. 2014

LIM, L. P. et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. **Genes Dev.**, v. 17, p. 991-1008, 2003.

LIN, X.; ZHANG, L.; JIANG, Y. Distinct Roles of Met and Interacting Proteins on the Expressions of takeout Family Genes in *Brown Planthopper*. **Front Physiol.**, v. 8, p. 100, 2017.

LINKSVAYER, T. A. et al. Larval and nurse worker control of developmental plasticity and the evolution of honey bee queen-worker dimorphism. **J Evol Biol.**, v. 24, p. 1939-1948, 2011.

LIU, N. et al. The microRNA *miR-34* modulates aging and neurodegeneration in *Drosophila*. **Nature**, v. 482, n. 7386, p. 519–523, 2012.

LIU, L. et al. Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. **Nature**, v. 400, p. 753-756, 1999.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods.**, v. 25, n. 4, p. 402408, 2001.

LIVINGSTON, M. S.; TEMPEL, B. L. Genetic dissection of monoamine neurotransmitter synthesis in *Drosophila*. **Nature**, v. 303, p. 67-70, 1983.

LOCKE, M.; COLLINS, J. V. Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. **J Cell Biol.**, v. 36, p. 453-483, 1968.

LOCKETT, G. A.; HELLIWELL, P.; MALESZKA, R. Involvement of DNA methylation in memory processing in the honey bee. **Neuroreport.**, v. 21, p. 812-816, 2010.

LOURENÇO, A. P. et al. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. **Apidologie.**, v. 39, p. 372-385, 2008.

LU, B.; PANG, P. T.; WOO, N. H. The yin and yang of neurotrophin action. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, p. 603–614, 2005.

LUCAS, K.; RAIKHEL, A. S. Insect MicroRNAs: Biogenesis, expression profiling and biological functions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, p. 24–38, 2013.

LUO, W.; WANG, Y.; REISER, G. Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. **Brain Res Rev.**, v. 56, p. 331–345, 2007.

MALESZKA, J. et al. Effect of age, behaviour and social environment on honey bee brain plasticity. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.**, v. 195, p. 733–740, 2009.

MALESZKA, R.; MASON, P. H.; BARRON, A. B. Epigenomics and the concept of degeneracy in biological systems. **Brief Funct. Genom.**, v. 13, p. 191–202, 2014.

MALESZKA, R. The social honey bee in biomedical research: realities and expectations. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 12, p. 7–13, 2014.

MALESZKA, R. Beyond Royalactin and a master inducer explanation of phenotypic plasticity in honey bees. **Commun Biol.**, v. 1, p. 8, 2018.

MALUN, D. Early development of mushroom bodies in the brain of the honeybee *Apis mellifera* as revealed by BrdU incorporation and ablation experiments. **Learn Mem**, v. 5, p. 90–101, 1998.

MARCHETTI, G.; TAVOSANIS, G. Steroid hormone ecdysone signaling specifies mushroom body neuron sequential fate via chinmo. **Curr Biol**, v. 27, p. 1–8, 2017

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic Acids Res.**, v. 45, p. D200–D203, 2017.

MARTINOWICH, K.; MANJI, H.; LU, B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. **Nat Neurosci**, v. 10, p. 1089–1093, 2007.

MARTINS, J. R.; BITONDI, M. M. The HEX 110 Hexamerin Is a Cytoplasmic and Nucleolar Protein in the Ovaries of *Apis mellifera*. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0151035, 2016.

MARTINS, J. R.; BITONDI, M. M. Nuclear Immunolocalization of Hexamerins in the Fat Body of Metamorphosing Honey Bees. **Insects**, v. 4, p. 1039-1055, 2012.

MARTINS, J. R. et al. The four hexamerin genes in the honeybee: Structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. **BMC Mol Biol**, v. 11, p.23, 2010.

MCIRLROY, G. et al. Toll-6 and Toll-7 function as neurotrophin receptors in the *Drosophila melanogaster* CNS. **Nat Neurosci.**, v. 16, p. 1248-1256, 2013.

MCCLOUGHLIN, H. S. et al. Dicer is required for proliferation, viability, migration and differentiation in corticoneurogenesis. **Neurosci**, v. 223, p. 285–295, 2012.

MCNEILL, E.; VAN VACTOR, D. MicroRNAs shape the neuronal landscape. **Neuron**, v. 75, p. 363-379, 2012.

MEDVED, V.; HUANG, Z. Y.; POPADIC, A. Ubx promotes corbicular development in *Apis mellifera*. **Biol. Lett.** v. 10, n. 1, p. 20131021, 2014.

MENZEL, P. et al. Transcriptional dynamics of microRNAs and their targets during *Drosophila* neurogenesis. **RNA Biol.**, v. 16, p. 69-81, 2019.

MENZEL, R. The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. **Nat Rev Neurosci.**, v. 13, p. 758-768, 2012.

MENZEL, R. Learning in honeybees in an ecological and behavioral context. In: Hölldobler B, Lindauer M (eds) *Experimental behavioral ecology and sociobiology*. Fischer, Stuttgart, pp 55–74, 1985.

MENZEL, R.; GREGGERS, U.; HAMMER, M. Functional organization of appetitive learning and memory in a generalist pollinator, the honeybee. In: Papaj D, Lewis AC (eds) *Insect learning: ecological and evolutionary perspectives*. Chapman and Hall, New York, pp 79–12, 1993.

MICHELETTE, E. R.; SOARES A. E. E. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honeybee workers (*Apis mellifera L.*). **Apidologie**, v. 24, p. 431-440, 1993.

MICHENER, C.D. Comparative social behavior of bees. **Annual Review Entomology**. v. 14, p. 299-342, 1969.

MICHENER, C. D. **The social behavior of the bees: a comparative study**. Cambridge: Harvard University Press, 1974.

MIRANDA, E.; LOMAS, D. A. Neuroserpin: a serpin to think about. **Cell Mol Life Sci.**, v. 63, v. 709-722, 2006.

MIZUNAMI, M.; WEIBRECHT, J. M.; STRAUSFELD, N. J.: A new role for the insect mushroom bodies: place memory and motor control. Edited by Beer RD, Ritzman R, McKenna T. **Academic Press**, p. 199-225, 1993.

MOBBS, P. G. The brain of the honeybee *Apis mellifera L.* The connections and spatial organization of the mushroom bodies. **Philos Trans R. Soc. Lond.** v. 298, p. 309-354, 1982.

MODA L. M. R. et al. Nutritionally driven differential gene expression leads to heterochronic brain development in honeybee castes. **PLoS ONE**, v. 8, p. e64815, 2013.

NAKAMOTO, M. et al. Virus recognition by Toll-7 activates antiviral autophagy in *Drosophila*. **Immunity.**, v. 36, p. 658-667, 2012.

NEFF, N. H.; HADJICONSTANTINO, M. Aromatic L-amino acid decarboxylase modulation and Parkinson's disease. **Prog Brain Res.**, v. 106, p. 91-97, 1995.

NELSON, J. A. **The embryology of the honeybee**. New York: Princeton, 1915.

NIJHOUT, H.F.; WHEELER D.E. Juvenile hormone and the physiological bases of insect polymorphisms. **Quart. Rev. Biol.** v. 57, p.109-133, 1982.

NIKOLAKOPOULOU, A. M.; GEORGAKOPOULOS, A.; ROBAKIS, N. K. Presenilin 1 promotes trypsin-induced neuroprotection via the PAR2/ERK signaling pathway. Effects of presenilin 1 FAD mutations. **Neurobiol Aging.**, v. 42, p. 41-49, 2016.

- NIVEN, J. E.; GRAHAM, C. M.; BURROWS, M. Diversity and evolution of the insectventral nerve cord. **Annu. Rev. Entomol.** v. 53, p. 253-271, 2008.
- OKADA, Y. et al. Social dominance alters nutrition-related gene expression immediately: Transcriptomic evidence from a monomorphic queenless ant. **Mol Ecol**, v. 26, p. 2922–2938, 2017.
- OKONECHNIKOV, K. et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**, v. 28, p. 1166-1167, 2012.
- OLSEN, L., et al. MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats. **PLoS ONE**, v. 4, p. e7225, 2009.
- ONKEVE-RAMON, P.; LLIMARGAS, M. Fascin, may the Forked be with you. **Fly (Austin)**, v. 8, p. 157-164, 2014.
- OROM, U. A.; NIELSEN, F. C.; LUND, A. H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. **Mol Cell**, v. 30, p. 460-471, 2008.
- PACKER, L. The social organisation of *Lasioglossum (Dialictus) laevissimum* (Smith) in Southern Alberta. **Can J. Zool**, v. 70, p. 1767–1774, 1992.
- PAGE, R. E. JR.; AMDAM, G. V. The making of a social insect: developmental architectures of social design. **Bioessays**, v. 29, p. 334–343, 2007.
- PASQUINELLI, A. E. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, v. 408, p. 86-89, 2000.
- PETERSEN, N. S. et al. forked proteins are components of fiber bundles present in developing bristles of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 136, p. 173-182, 1994.
- PETERSEN, N. S.; QIN, H. FORked is na actin binding protein involved in actin fiber formation in *Drosophila* bristles. **Mol Biol.**, v. 7, p. 514, 1996.
- PETERSON, S. M. et al. Common features of microRNA target prediction tools. **Front Genet**, v.5, p. 23, 2014.

PICAO-OSORIO, J. et al. MicroRNA-encoded behavior in *Drosophila*. **Science**, v. 350, p. 815-820, 2015.

PIERRE, J. **Apicultura Conocimientos de la Abeja, manejo de la colmena**. 2 ed. México: Mundi-Prensa, 1981.

POOPATHI, S. et al. Hexamerin a novel protein associated with *Bacillus sphaericus* resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Appl Biochem Biotechnol.**, v. 172, p. 2299-2307, 2014.

RACHINSKY, A. et al. Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. **Gen. Comp. Endocrinol.** v.79, p. 31-38, 1990.

RACHINSKY, A.; ENGELS, W. Caste development in honeybees (*Apis mellifera*): Juvenile hormone turns on ecdysteroids. **Naturwissenschaften**, v. 82, p. 378-379, 1995.

RACHINSKY, A.; HARTFELDER, K. Corpora allata activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titre in honeybee larvae (*Apis mellifera carnica*). **Journal of Insect Physiology**, v. 66, p. 189-194, 1990.

RAJEWSKI, N.; SOCCI, N. D. Computational identification of microRNAs targets. **Dev Biol**, v. 267, p. 529–535, 2004.

REHMSMEIER, M. et al. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. **RNA**, v. 10, p. 1507-1517, 2004.

REICHERT, H. Evolutionary conservation of mechanisms for neural regionalization, proliferation and interconnection in brain development. **Biol. Lett.**, v. 5, p. 112–116, 2009.

REICHERT, H.; BOYAN, G. Building a brain: Developmental insights in insects. **Trends Neurosci.**, v. 20, p. 258–264, 1997.

ROEDER, T. Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. **Annu Rev Entomol.**, v. 50, p. 447-477, 2005.

ROUX, J.; GONZALEZ-PORTA, M.; ROBINSON-RECHAVI, M. Comparative analysis of human and mouse expression data illuminates tissue-specific evolutionary patterns of miRNAs. **Nucleic Acids Res**, v. 40, p. 5890–5900, 2012.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol Biol**, v. 132, p. 365-86, 2000.

RUSSEK-BLUM, N. et al. Dopaminergic neuronal cluster size is determined during early forebrain patterning. **Development**, v. 135, p. 3401-3413, 2008.

RUTHERFORD, K. et al. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v. 16, p. 944-945, 2000.

RYBAK, J.; MENZEL, R. Integrative properties of the Pe1-neuron, a unique Mushroom body output neuron. **Learn Mem**, v. 5, p. 133–145, 1998.

SAKAGAMI, S. F. **Stingless bees**. In: HERMANN, H. R. (Ed.). 3 rd. Social insects. New York: Academic Press, p. 361–423. 1982.

SANDERS, M. C. et al. Characterization of the actin cross-linking properties of the scruin-calmodulin complex from the acrosomal process of *Limulus sperm*. **J Biol Chem**, v. 271, p. 2651-2657, 1996.

SAROV-BLAT, L. et al. The *Drosophila* takeout gene is a novel molecular link between circadian rhythms and feeding behavior. **Cell**, v. 101, p. 647-656, 2000.

SAUNDERS, D. S. 2002. **Insect clocks**. 3<sup>rd</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2002.

SAWADA, K. et al. Purification and characterization of a trypsin-like serine proteinase from rat brain slices that degrades laminin and type IV collagen and stimulates protease-activated receptor-2. **J Neurochem**, v. 74, p. 1731-1738, 2000.

SCHMITTGEN, T. D. et al. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. **Nucleic Acids Res**, v. 32, p. e43, 2004.

SEKERIS, C. et al. Translation of mRNA from *Calliphora vicina* and *Drosophila melanogaster* larvae into calliphorin and calliphorin-like proteins of *Drosophila*. **Insect Biochem**, v. 7, p. 5-9, 1977.

SHEEHAN, J. J.; TSIRKA, S. E. Fibrin-modifying serine proteases thrombin, tPA, and plasmin in ischemic stroke: a review. **Glia**, v. 50, p. 340-350, 2005.

SEMPERE, L. F. et al. The expression of the let-7 small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. **Dev Biol**, v. 244, p. 170–179, 2002.

SHENOY, A.; DANIAL, M.; BLELLOCH, R. H. Let-7 and miR-125 cooperate to prime progenitors for astroglialogenesis. **EMBO J**, v. 34, n.9, p. 1180–94, 2015.

SHIH, D. F. et al. Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) is crucial for brain development and motor functions. **PLoS One**, v. 8, p. e71741, 2013.

SHKUMATAVA, A. et al. Coherent but overlapping expression of microRNAs and their targets during vertebrate development. **Genes Dev**, v. 23, p. 466-481, 2009.

SIMONET, G. et al. cDNA cloning of two different serine protease inhibitor precursors in the migratory locust, *Locusta migratoria*. **Insect Mol Biol.**, v. 11, p. 249-256, 2002.

SNODGRASS, R. E. **Anatomy of honey bee**. 4 ed. Washington: Cornell University, 1984.

SNODGRASS, R. E. **Principles of insect morphology**. Michigan: Cornell, 1935.

SO, W. V. et al. Takeout, a novel *Drosophila* gene under circadian clock transcriptional regulation. **Mol Cell Biol.**, v. 20, p. 6935-6944, 2000.

SRINIVASAN, M. V. Honeybees as a model for the study of visually guided flight, navigation, and biologically inspired robotics. **Physiol Rev**, v. 91, p. 413-460, 2011.

STARK, A. et al. Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. **PLoS Biol**, v. 1, p. e60, 2003.

STRAUSFELD, N. J. Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. **J Comp Neurol.**, v. 450, p. 4-33, 2002.

STRAUSS, R. The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. **Curr. Opin. Neurobiol.** v. 12, p. 633-638, 2002.

SUTCLIFFE, B. et al. Neuron-Type Specific Functions of DNT1, DNT2 and Spz at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, p. e7590, 2013.

SUZUKI, H. Convergence of olfactory inputs from both antennae in the brain of the honeybee. **J Exp Biol**, v. 62, p. 11-26, 1975.

SWANSON, J. M. et al. Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis. **Neuropsychol Rev.**, v. 17, p. 39-59, 2007.

TATAR, M.; YIN, C. Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. **Exp Gerontol.**, v. 36, p. 723-738, 2001.

TATARENKOV, A.; SÁEZ, A. G.; AYALA, F. J. A compact gene cluster in *Drosophila*: the unrelated Cs gene is compressed between duplicated *amd* and *ddc*. **Gene**, v. 231, p. 111-120, 1999.

TAY, Y. et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. **Nature**, v. 455, p. 1124-1128, 2008.

TELFER, W. H.; KUNKEL, J. G. The function and evolution of insect storage hexamers. **Annu Rev Entomol.**, v. 36, p. 205-228, 1991.

TOMIMATSU, Y. et al. Proteases involved in long-term potentiation. **Life Sci.**, v. 72, p. 355-361, 2002.

UENO, K.; OSHAWA, F.; NATORI, S. Identification and activation of storage protein receptor of *Sarcophaga peregrina* fat body by 20-hydroxyecdysone. **J Biol Chem.**, v. 258, p. 12210-12214, 1983.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115, 2007.

VALANNE, S.; WANG, J. H.; RÄMET, M. The *Drosophila* Toll signaling pathway. **J Immunol.**, v. 186, p. 649-56, 2011.

VASUDEVAN, S. Functional validation of microRNA-target RNA interactions. **Methods**, v. 58, n. 2, p. 126-134, 2012.

VELLA, M. C. The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. **Genes Dev**, v. 18, p. 132-137, 2004.

VERNEY, C.; LEBRAND, C.; GASPAR, P. Changing distribution of monoaminergic markers in the developing human cerebral cortex with special emphasis on the serotonin transporter. **Anat Rec.**, v. 267, p. 87-93, 2002.

VIEIRA, J. **Determinantes moleculares da diferenciação inicial do cérebro em castas de abelhas *Apis mellifera***. 2014. 133 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas. 2014.

VITALIS, T.; PANVANELAS, J. G. The role of serotonin in early cortical development. **Dev Neurosci.**, v. 25, p. 245-256, 2003.

VOLKENHOFF, A. et al. Glial Glycolysis Is Essential for Neuronal Survival in *Drosophila*. **Cell Metab.**, v. 22, p. 437-447, 2015.

WANG, Y. et al. Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 47, p. 48-56, 2016.

WANG, M. et al. Roles of miR-186 and PTTG1 in colorectal neuroendocrine tumors. **Int J Clin Exp Med.**, v. 8, p. 22149-22157, 2015.

WANG, R., BRATTAIN, M. G. The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60 kDa. **FEBS Lett**, v. 581, p. 3164–3170, 2007.

WANG, Y.; LUO, W.; REISER, G. Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. **Cell Mol Life Sci.**, v. 65, p. 237-252, 2008.

WANG, F. et al. *miR-210* suppresses BNIP3 to protect against the apoptosis of neural progenitor cells. **Stem Cell Res**, v. 11, p. 657-667, 2013.

WANG, D.; MARSH, J. L. Developmental regulation of the alpha-methyl-dopa hypersensitive gene of *Drosophila melanogaster*. **Dev Biol.**, v. 168, p. 598-612, 1995.

WHEELER, D. E. Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. **American Naturalist**, v. 128, p. 13-34, 1986.

WHEELER, D. E., BUCK, N. A. Storage proteins in ants during development and colony founding. **J Insect Physiol**, v. 41, p. 885–894, 1995.

WHEELER, W. V. Neuroblasts in the arthropod embryo. **J. Morph**, v. 4, p. 337–343, 1891.

WILSON, E. O. **The insects societies**. Cambridge: Harvard University, 1971.

WILSON, E. O. One giant leap: how insects achieved altruism and colonial life. **BioScience**, v. 58, p. 17-25, 2008.

WINSTON, M. L. **The biology of the honeybee**. Cambridge: Harvard University, 1987.

WRIGHT, T. R.; BEWLEY, G. C.; SHERALD, A. F. The genetics of dopa decarboxylase in *Drosophila melanogaster*. II. Isolation and characterization of dopa-decarboxylase-deficient mutants and their relationship to the alpha-methyl-dopa-hypersensitive mutants. **Genetics**, v. 84, p. 287-310, 1976.

WU, Y. C. et al. Let-7-complex microRNAs regulate the temporal identity of *Drosophila* mushroom body neurons via chinmo. **Dev Cell.**, v. 23, p. 202-209, 2012.

WU, A.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats, **J Neurotrauma**, v. 21, p.1457–1467, 2004.

WULF-KUHLE, J. D.; PETERSEN, N. S.; OTTO, J. J. Changes in the F-actin cytoskeleton during neurosensory bristle development in *Drosophila*: the role of singed and forked proteins. **Cell Motil. Cytoskel.**, v. 40, p. 119-132, 1998.

WYATT, G. R.; PAN, M. L. Insect plasma proteins. **Annu Rev Biochem.**, v. 47, p. 779-817, 1978.

XI, G.; REISER, G.; KEEP, R. F. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? **J Neurochem.**, v. 84, p. 3-9, 2003.

YANG, M. et al. MicroRNA-133 inhibits behavioral aggregation by controlling dopamine synthesis in locusts. **PLoS Genet.**, v.10, p. e1004206, 2014.

ZHANG, S. et al. MicroRNA-210 regulates cell proliferation and apoptosis by targeting regulator of differentiation 1 in glioblastoma cells. **Folia Neuropathol**, v. 53, n.3, p. 236-244, 2015.

ZHOU, X. G.; OI, F. M.; SCHARF, M. E. Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, p. 4499–4504, 2006.

ZHOU, X.; TARVER, M. R.; SCHARF, M. E. Hexamerin-based regulation of juvenile hormone-dependent gene expression underlies phenotypic plasticity in a social insect. **Development.**, v. 134, p. 601–610, 2007.

ZHU, Q. S. et al. Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, p. 6650–6655, 2008.

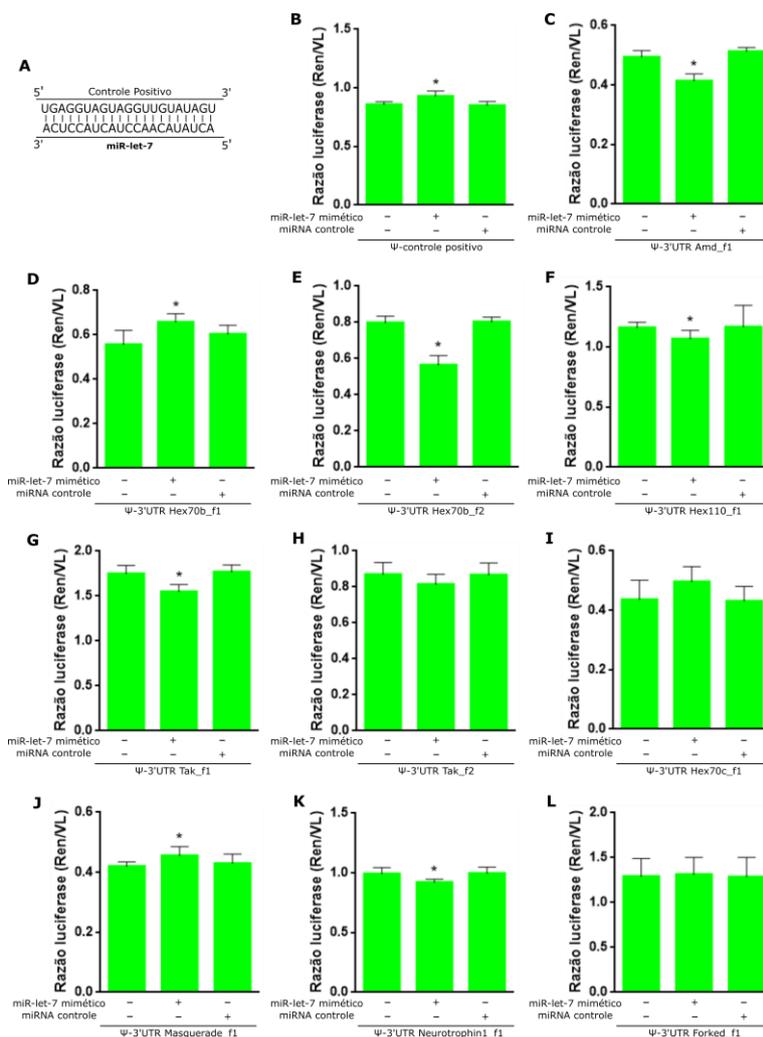
## APÊNDICE A - EXPERIMENTOS LET-7

No Sistema nervoso central (SNC), let-7 limita a ativação da microglia (CHO et al., 2015) e promove a diferenciação de células progenitoras gliais em astrócitos (SHENOY; DANIAL; BLELLOCH, 2015). Além disso, durante um dano ou em doenças neurodegenerativas, let-7 pode ser liberado após a morte de neurônios no espaço extracelular, onde atua como um DAMP (Padrão molecular associado a danos) (COLEMAN; ZOU; CREWS, 2017). Em *Drosophila melanogaster*, let-7 está envolvido na cronologia do desenvolvimento pela via do ecdisteróide (PASQUINELLI et al., 2000; SEMPERE et al., 2002), e regula a neurogênese e a cronologia do estabelecimento dos neurônios de nascimento tardio no cérebro em desenvolvimento, via sinalização de EcR e regulação da expressão de *chinmo* (KUCHERENKO et al., 2012; WU et al., 2012; CHAWLA et al., 2016; MARCHETTI; TAVOSANIS, 2017). Assim, o ame-let-7 pode atuar regulando genes que promovem o desenvolvimento neuronal inicial, sendo escolhido para os estudos de interação miRNA-mRNA realizados neste trabalho.

Ao realizarmos o ensaio de luciferase para este miRNA encontramos uma situação atípica: o mimético aumentava a relação de luminescência (RVL) medida nos ensaios realizados com o controle positivo, o que não foi demonstrado em outros trabalhos. Por esse motivo, preferimos não apresentar os resultados para este miRNA no corpo da Tese. Estes resultados são importantes dados para futuras investigações do papel do miRNA com regulador positivo de mRNAs.

Os resultados estão apresentados na Figura 1S deste apêndice.

Figura 1S- Validação dos sítios de ligação preditos para o miR-let-7 na 3'UTR pelo ensaio da luciferase.



Fonte: Da autora.

Nota: Mudanças na razão da atividade da luciferase quimérica da Renilla (Ren) e da luciferase do vaga-lume (VL). A luciferase quimérica Ren está ligada a 3'UTR dos genes-alvo que contém os sítios de ligação preditos para o miR-let-7. Representação esquemática do controle positivo, pareamento perfeito com a sequência do miR-let-7 (A). O controle positivo (B) e as 3'UTRs dos genes *amd* (C), *hex70b* (D e E), *hex110* (F), o primeiro sítio da *takeout* (G), *masquerade* (J) e *nt-1* (K) foram diretamente reguladas pelo miR-let-7. A 3'UTR dos genes *hex70c* (I), *forked* (L) e o segundo sítio da *takeout* (H) não foram reguladas pelo miR-let-7. Test-t, \*:  $p < 0,05$ .

Para confirmarmos a existência dos sítios de miR-let-7 nas regiões 3'UTR do gene *amd* (Figura 1-C), *hex70b* sítios 1 e 2 (Figura 1S-D e E), *hex110* (Figura 1S-F), *takeout* sítio 1 (Figura 1S-G), *mas* (Figura 1S-J) e *nt-1* (Figura 1S-K). No entanto, os

sítios preditos para os genes *hex70c* (Figura 1S-I), *forked* (Figura 1S-L) e *takeout* sítio 2 (Figura 1S-H) não responderam à presença do miR-let-7 mimético, sugerindo que esses sítios não sejam funcionais.

## APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO

Abaixo estão as primeiras páginas do artigo submetido para a revista BMC Genomics.

### **The nuclear and mitochondrial genomes of *Frieseomelitta varia* – a highly eusocial stingless bee (Meliponini) with a permanently sterile worker caste**

**Authors** (first name, mid name initials, last name, institutional affiliation number, ORCID ID)

Flávia C. de Paula Freitas<sup>1,2</sup> ORCID 0000-0002-3162-4890, Anete P. Lourenço<sup>1,3</sup> ORCID 0000-0001-6929-7277, Francis M. F. Nunes<sup>4</sup> ORCID 0000-0002-7769-3058, Alexandre R. Paschoal<sup>5</sup> ORCID 0000-0002-8887-0582, Fabiano C.P. Abreu<sup>1</sup> ORCID 0000-0003-0112-2520, Fábio O. Barbin<sup>1</sup> ORCID 0000-0001-7668-2851, Luana Bataglia<sup>1</sup> ORCID 0000-0002-8408-738X, Carlos A.M. Cardoso-Júnior<sup>6</sup> ORCID 0000-0002-5039-8358, Mário S. Cervoni<sup>6</sup> ORCID 0000-0003-1178-6144, Saura R. Da Silva<sup>8</sup> ORCID 0000-0002-6333-5268, Fernanda Dalarmi<sup>7</sup> ORCID 0000-0001-7594-758X, Marco A. Del Lama<sup>4</sup>, Thiago S. Depintor<sup>1</sup> ORCID 0000-0003-2610-867X, Kátia M. Ferreira<sup>4</sup> ORCID 0000-0003-1387-7066, Paula S. Gória<sup>4</sup> ORCID 0000-0002-2654-6808, Michael C. Jaskot<sup>4</sup> ORCID 0000-0001-9420-2137, Denyse C. Lago<sup>1</sup> ORCID 0000-0002-6585-4619, Danielle Luna-Lucena<sup>1</sup> ORCID 0000-0002-1492-236X, Livia M. Moda<sup>2</sup> ORCID 0000-0001-6381-7788, Leonardo Nascimento<sup>7</sup>, Matheus Pedrino<sup>4</sup> ORCID 0000-0003-0687-4692, Franciene O. Rabiço<sup>1</sup> ORCID 0000-0003-4382-9823, Fernanda C. Sanches<sup>4</sup> ORCID 0000-0002-3012-2709, Douglas E. Santos<sup>6</sup> ORCID 0000-0001-9850-4554, Carolina G. Santos<sup>6</sup> ORCID 0000-000108538-4303, Joseana Vieira<sup>2</sup> ORCID 0000-0003-0476-7359, Tiago Falcon Lopes<sup>1</sup> ORCID [0000-0002-8936-0381](https://orcid.org/0000-0002-8936-0381), Angel R. Barchuk<sup>2</sup> ORCID [0000-0001-8417-2763](https://orcid.org/0000-0001-8417-2763), Klaus Hartfelder<sup>6</sup> ORCID [0000-0001-7981-8427](https://orcid.org/0000-0001-7981-8427), Zilá L.P. Simões<sup>7</sup> ORCID 0000 0003 2363 6178, Márcia M.G. Bitondi<sup>7</sup> ORCID 0000-0002-5619-6378, Daniel G. Pinheiro<sup>8</sup> ORCID 0000-0001-7062-5936

#### **Institutional affiliations**

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil.

<sup>5</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Cornélio Procópio, PR, Brazil.

<sup>6</sup>Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>7</sup>Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

<sup>8</sup>Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, Brazil.

**Corresponding author:** Klaus Hartfelder, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. E-mail: klaus@fmrp.usp.br

## Abstract

**Background:** Most of our understanding on the social behavior and genomics of bees and other social insects is centered on the Western honey bee, *Apis mellifera*. The genus *Apis*, however, is a highly derived branch of less than 10 species, four of which are genomically characterized. In contrast, for the equally highly eusocial, yet taxonomically and biologically much more diverse Meliponini, a full genome sequence was, so far, available for a single *Melipona* species only. We present here the genome sequence of *Frieseomelitta varia*, a stingless bee that has, as a peculiarity, a completely sterile worker caste.

**Results:** The assembly of 243,974,526 high quality Illumina reads resulted in a predicted genome size of 275 Mb composed of 2,173 scaffolds. A BUSCO analysis for the 10,526 predicted genes showed that these represent 96.6% of the expected hymenopteran orthologs. We also predicted 2,083 putative transposable elements and 1,946 genes for noncoding RNAs, largely representing long noncoding RNAs. The mitochondrial genome comprises 15,144 bp, encoding 13 proteins, 22 tRNAs and 2 rRNAs. Interestingly, we observed considerable rearrangement in the mitochondrial gene order compared to other bees. For an in-depth analysis of genes related to social biology we manually checked the annotations for 533 automatically predicted gene models, including transcription factors, 127 genes related to reproductive processes, and

174 immunity-related gene. We also performed specific searches for genes related to neurogenesis and olfactory communication.

**Conclusions:** The total genome size for *F. varia* is similar to the sequenced genomes of other bees. Using specific prediction methods, we identified a large number of transposable elements and, especially, long noncoding RNAs, which could provide the molecular basis for gene regulatory plasticity, including with respect to worker reproduction. The remarkable reshuffling in gene order in the mitochondrial genome suggests that stingless bees may be a hotspot for mtDNA evolution. Hence, while being just the second stingless bee genome sequenced, we expect that subsequent targeting of a well selected set of species from this diverse clade of highly eusocial bees will reveal relevant evolutionary signals and trends related to eusociality in these important pollinators.

**Keywords:** Social insect, Meliponini, Illumina sequencing, genome assembly, synteny, transposable elements, noncoding RNA, reproductive process genes, immunity genes.

## Background

The ecological and economic importance of bees as pollinators and their millennial association with man, especially of the highly eusocial honey bees (Apini) and stingless bees (Meliponini) as providers of honey, pollen, wax, and propolis, has, not surprisingly, been a key factor for including the Western honey bee *Apis mellifera* in a top priority position for genome sequencing at the beginning of this century. In fact, the honey bee nuclear genome was the third insect genome to be sequenced [1], and is now one of the best annotated ones with over 15,000 predicted protein-coding genes [2]. As such, it generally serves as a major backbone for sequencing and annotation efforts of other genomes, especially so within the Hymenoptera, the phylogenetically most ancient branch within the holometabolous insects [3].

*Apis mellifera* is a model organism for understanding social organization, especially so the permanent caste systems of highly eusocial insects. Nonetheless it is actually a member of the smallest branch within the monophyletic clade of corbiculate bees [4,5] that comprises the highly eusocial Apini and Meliponini [6], as well as the primitively eusocial bumble bees (Bombini) and the solitary to incipiently social orchid

bees (Euglossini). The tribe Apini has only a single genus, *Apis*, composed of 7-11 species, depending on taxonomic status [7,8], with *A. mellifera* being the most prominent one among these. *A. mellifera* has an African origin [9,10] and has undergone a worldwide distribution. With another three now fully sequenced genomes for *Apis* species of Asian origin (*A. florea* [11], *A. cerana* [12], *A. dorsata*, NCBI BioProject PRJNA174631), the genus *Apis* can, thus, truly be considered as one of the genomically best studied insect genera.

This stands in strong contrast with the stingless bees (Meliponini), which comprise over 500 species classified into 48-61 genera [6,13]. The largest number of genera and species occurs in the Neotropics, with 32 genera and 417 recognized species [14], and recent population genetics studies indicate that species numbers are likely to be even higher. Nonetheless, only one of these stingless bee species, *Melipona quadrifasciata*, has a fully sequenced and annotated genome, as it was included in a comparative genomics study of bees aimed at providing insights into genomic traces of social evolution [11]. A second species, *Lepidotrigona ventralis*, a Southeast Asian species recently had raw genome sequence data deposited in GenBank [PRJNA387986], but genomic annotation is still lacking.

Stingless bees are not only species rich, they are also phylogenetically much older than the Apini, with origins dating back to 75-80 million years ago (mya) [13], compared to the origin of Apini, which is set at 22 mya. The Gondwana origin of the Meliponini can be seen reflected in the vicariance of their biogeographical, pantropical distribution [13].

In the tropical and subtropical Americas, the stingless bees were the main pollinators until the introduction of the honey bee, *A. mellifera*, in the 18<sup>th</sup> century. They have higher population densities than the solitary or primitively eusocial bees, and they are generalist plant visitors [15], which makes them also ideal pollinators for economically valuable crops, including greenhouse crops [16]. The management of stingless bees (meliponiculture) has a long history, and Pre-Colombian documents, such the Mayan Codex, record such practices for the *Melipona* species from Mesoamerica, and over the last decades, meliponiculture has gained new momentum as part of subsistence agriculture.

Stingless bees are also highly varied in important biological aspects, including colony size, nesting sites, communication systems, and colony defense, as well as caste

determination and reproductive biology. For instance, while colonies of the tiny, fruit fly-size *Leurotrigona* species can fit into a matchbox, colonies of the open-nesting *Trigona* species can be of a size comparable to that of very large honey bee colonies. In terms of nesting sites, most stingless bees are cavity nesters, mostly so in trees, but they can use pretty much any kind of cavity, including underground ones [16,17].

With respect to caste determination, the genus *Melipona* has long drawn attention, as it was the first social insect species for which a genetic mechanism of queen/worker determination was proposed [18], with underlying mechanisms still under investigation [19-21]. Nonetheless, it is in their reproductive biology in general that the stingless bees differ most drastically from the honey bees, and in this respect they are actually much closer to the bumble bees, with which they have a sister group relationship [4,5]. The queens of most stingless bees mate with a single male only, and in many species, the workers contribute to the production of males in a colony [22]. In contrast, in the genera *Frieseomelitta* and *Leurotrigona*, the workers are completely sterile, and for *Frieseomelitta varia* it has been shown that the ovaries of workers undergo programmed cell death during pupal development [23].

In the previous comparative genomics study on sociality in bees [11], *M. quadrifasciata* was included not only for being the first among the stingless bees to have its genome sequenced, but also because of its emblematic genetic mode of caste determination. Furthermore, *M. quadrifasciata* and *F. varia*, are the two only stingless bee species for which RNA-Seq data had previously been generated in a comparative transcriptomics study [24]. Hence, we chose here the species *Frieseomelitta varia* for genome sequencing of a third candidate of this largest clade of highly eusocial bees, the Meliponini.

## **Materials and Methods**

### **Sampling and DNA extraction**

Brood cells were removed from *F. varia* colonies kept in the apiary of the Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, and screened for the presence of male brood. The use of haploid males, as done in previous

bee genome projects [1,11], presents a considerable advantage for genome assembly. So we also opted to use DNA from a single pharate-adult male specimen with still unpigmented wings. Genomic DNA was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) resulting in a sample of 9.7 µg total DNA.

### **Genomic DNA library preparation and sequencing**

The DNA sample was sent to *Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida* (LaCTAD, UNICAMP, Campinas, Brazil) for quality check (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA), library preparation, and sequencing. Library preparation was done using Illumina Nextera kits (Illumina, San Diego, CA), and paired-end and mate pair sequencing was done on a HiSeq 2500 platform (Illumina).

### **Genome assembly**

Raw reads were submitted to quality analysis using FastQC software ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)). Next, to exclude low quality sequences, the paired-end reads were further treated using Trimmomatic software [25] (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>), and the reads were treated using NxTrim software [26] (<https://github.com/sequencing/NxTrim>) to retrieve only the genuine mate pair reads.

An initial assembly into scaffolds was obtained using SPAdes software version 3.9.0 [27] (<http://bioinf.spbau.ru/spades>), with error correction by means of kmers 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77 and 81. This strategy generated the genome assembly Fvar1.0. This assembly was subsequently improved by aligning the scaffolds using HISAT2 software [28] with default parameters, followed by reassembly using the BESST tool [29], which is recommended for the reorganization of fragmented assemblies. The scaffold size distribution was calculated by using functions implemented in R Statistical Software [30]. The assembly version thus generated was named Fvar1.1.