



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas/MG. CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



GABRIELE DAVID DOS SANTOS

Testando a hipótese do cérebro social: modelo *Frieseomelitta varia*

Alfenas/MG,
2019

GABRIELE DAVID DOS SANTOS

Testando a hipótese do cérebro social: modelo *Frieseomelitta varia*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, Área de concentração: Neurociências e Comportamento, Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk

Alfenas/MG
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Santos, Gabriele David dos

S237t Testando a hipótese do cérebro social: modelo *Frieseomelitta varia* /
Gabriele David dos Santos. – Alfenas/MG, 2019.
89 f.: il. -

Orientador: Angel Roberto Barchuk.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, 2019
Bibliografia.

1. *Frieseomelitta varia*. 2. Neurogênese. 3. Cérebro social. 4. Expressão
gênica diferencial. I. Barchuk, Angel Roberto . II. Título.

CDD- 612.8

GABRIELE DAVID DOS SANTOS

Testando a hipótese do cérebro social: modelo *Frieseomelitta varia*

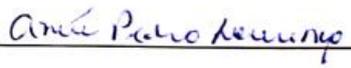
A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada com parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde. Área de concentração: Neurociência e comportamento.

Aprovada em: 31/07/2019

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

Assinatura: 

Profª. Dra. Anete Pedro Lourenço
Instituição: Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri
– UFVJM

Assinatura: 

Prof. Dr. Bruno Zavan
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares por todo amor e dedicação, que contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal. Obrigada por acreditarem no meu potencial.

Ao meu companheiro Rafael Mitsuo por todo carinho, apoio, pela paciência de sempre, e pela ajuda nos momentos de desespero.

Agradeço ao meu orientador Prof^o. Dr^o. Angel Roberto Barchuk, pelo apoio constante, sempre esclarecendo minhas dúvidas e por todo o ensinamento transmitido desde que entrei para o grupo de pesquisa, em 2014.

Agradeço aos velhos e bons amigos, e aos amigos que aqui fiz, em especial à Marina de Oliveira, Kamilla Pacheco Govêa, Matheus Espanha e Cícero Domingues, que entre conversas sérias e momentos descontraídos deram-me força e motivação para concluir este trabalho. Obrigada por compartilharem os melhores e os piores momentos da pós-graduação, que sempre serão lembrados com muito carinho e saudade!

Aos demais colegas de laboratório e aos amigos do Grupo de Pesquisa Biologia da Socialidade, pela troca de experiências, dicas, e momentos de descontração. Um agradecimento especial aos meus amigos Valdeci, Délcio, Bianca e Joseana, que se tornaram muito especiais tanto nas horas de trabalho quando nas horas de lazer, pelas conversas agradáveis, companheirismo, carisma e ajuda nos experimentos. À nossa técnica de laboratório, Juliana Ramos Martins, por esclarecer minhas dúvidas com relação aos experimentos e pelas dicas de sempre.

À Prof^a. Dr^a. Talita Sarah Mazzoni, por toda a ajuda dada com relação à corte em historresina, e por ter nos cedido navalhas de para conclusão da etapa morfológica deste trabalho.

Ao professor do Instituto de Ciências Biomédicas, Rômulo Dias Novaes, por ter nos dado a oportunidade de usufruir do espectrofotômetro do laboratório de Histologia.

Agradeço à Prof^a. Zilá Luz Paulino Simões e à Prof^a. Márcia Bitondi por cederem o espaço do Meliponário Experimental da USP – Ribeirão Preto e do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas (LBDA) para que fosse possível a execução deste trabalho. Agradeço ao aluno de doutorado Ivan de Castro, pelos ensinamentos na técnica de produção de rainhas *in vitro*.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela bolsa concedida nestes dois anos (Código de Financiamento 001), e ao CNPq pelo Auxílio Financeiro (#406734/2018-6).

RESUMO

A hipótese do cérebro social afirma que o cérebro de espécies sociais teria evoluído em resposta a influências ambientais, tais como competição, proteção e procura de alimento, resultando assim na cooperação entre os indivíduos e aumento da complexidade social. Desta forma, têm-se desafios cognitivos que espécies solitárias não enfrentam. Esta hipótese tem sido bem estudada em vertebrados, particularmente no ser humano e em aves. Os insetos sociais possuem algumas características em comum quanto à sua biologia. Uma delas é a existência de divisão do trabalho reprodutivo, com uma ou umas poucas fêmeas encarregando-se da produção de ovos (rainhas) e o resto desenvolvendo atividades de manutenção da colônia (operárias). Em abelhas *Apis mellifera*, as operárias adultas possuem cérebros e regiões cerebrais proporcionalmente maiores que as rainhas, o que sugere que nessa espécie a hipótese do cérebro social é válida, já que o investimento no desenvolvimento do cérebro permite que os membros desta casta desenvolvam funções bem variadas dentro da colônia. Além disso, estudos do nosso laboratório mostraram que um grupo de genes diferencialmente expressos entre as castas medeiam a neurogênese diferencial nestes insetos. Neste trabalho, avaliamos os alcances da hipótese do cérebro social em abelhas, testando-a na abelha nativa sem ferrão *Frieseomelitta varia*, outra espécie social. Hipotetizamos que nesta abelha as diferenças de castas sejam promovidas por *trade-off* morfofisiológicos do desenvolvimento, como ocorre em abelhas africanizadas. Assim, nosso objetivo foi determinar os padrões morfogenéticos e moleculares do desenvolvimento cerebral pós-embriônico em castas de *F. varia*, por meio de técnicas histológicas de inclusão em historesina para morfometria, e ensaios de biologia molecular para determinar o perfil transcricional dos genes selecionados. Nossos resultados morfológicos mostraram que o volume total do cérebro em operárias Re é maior quando comparado a rainhas na mesma fase. Os corpos cogumelares e os corpos pedunculares também mostraram resultados interessantes, sendo o volume das neurópilas do hemisfério esquerdo maiores que as do direito em operárias. Alguns estudos apontam que o hemisfério esquerdo estaria relacionado à memória a longo prazo, fato interessante por se tratar de operárias, que desempenham inúmeras funções dentro de uma colônia. Três dos nove genes neurogênicos que em *A. mellifera* são casta-específicos (*amci*, *amd* e *SPH41*) são possíveis candidatos a genes ortólogos entre *F. varia* e humanos. Estes genes podem atuar na manutenção e desenvolvimento sistema nervoso já no início da embriogênese, e na síntese de metabólitos envolvidos em processos nervosos e cognitivos de abelhas, como dopamina e serotonina. Nossos dados moleculares revelaram que

hex70b e *hex70c* são mais transcritos no cérebro de operárias no início do desenvolvimento pupal (Pp), sugerindo que estas proteínas, em *F. varia*, guiam o desenvolvimento de operárias mesmo nas fases pós-larva; o *amci* também se mostrou mais expresso em operárias Pp, permanecendo assim até Pbm. Este resultado evidencia o papel das serina proteases durante a formação do sistema nervoso, podendo este gene contribuir para o maior desenvolvimento do cérebro de operárias e possivelmente participando como regulador das funções sinápticas necessárias para o desenvolvimento e melhoramento da cognição em operárias. Nossos resultados permitem concluir que a hipótese do cérebro social é aplicada tanto a abelhas *A. mellifera* quanto a *F. varia* e que as diferenciações morfológicas do cérebro são promovidas pela expressão diferencial de genes neurogênicos, alguns deles, funcionalmente conservados em abelhas e vertebrados.

Palavras-chave: *Frieseomelitta varia*. Neurogênese. Cérebro social. Expressão gênica diferencial.

ABSTRACT

The social brain hypothesis states that the brain of social species would have evolved in response to environmental influences, such as competition, protection, and food demand, resulting in cooperation between individuals and increased social complexity. In this way, there are cognitive challenges that solitary species do not face. This hypothesis has been studied in vertebrates, particularly in humans and birds. Social insects have some commonalities in their biology, like the existence of division of reproductive labor, with one or a few females taking care of eggs production (queens) and the rest developing activities in maintenance of the colony (workers). In *Apis mellifera* bees, adult female workers have brains and brain regions proportionally larger than queens, suggesting that in this species the social brain hypothesis is valid, since the investment in brain development allows the members of this caste to perform well varied within the colony. In addition, studies from our laboratory have shown that a group of differentially expressed genes among the castes mediate the differential neurogenesis in these insects. In this work we evaluate the reach of the social brain hypothesis in bees, testing it on the native bee *Frieseomelitta varia*, another social species. We hypothesized that in this bee caste differences are promoted by morphological and developmental trade-off, as occurs in Africanized bees. Thus, our goal was to determine the morphogenetic and molecular patterns of post-embryonic brain development in *F. varia*, using histological inclusion techniques for morphometry, and molecular biology assays to determine the transcriptional profile of the selected genes. Our morphological results showed that the total brain volume in Ne workers is higher when compared to queens in the same phase. Mushroom bodies and peduncular bodies also showed interesting results, the volume of left hemisphere neurons being larger than those of workers. Some studies indicate that the left hemisphere would be related to long-term memory, an interesting fact because it is workers, who perform many functions within a colony. Three of the nine neurogenic genes that in *A. mellifera* are casta-specific (*amci*, *amd* and *SPH41*) are possible candidates for orthologous genes between *F. varia* and human. These genes can act in the maintenance and development nervous system already in the beginning of the embryogenesis, and in the synthesis of metabolites involved in nervous and cognitive processes of bees like dopamine and serotonin. Our molecular data showed that *hex70b* and *hex70c* are more transcribed in workers' brain at early pupal development (Pp), suggesting that these proteins in *F. varia* guide the development of workers even in the post-larva stages; the *amci* was also more expressed in workers Pp, thus remaining until Pbm. This result evidences the role of serine

proteases during the formation of the nervous system, which may contribute to the greater development of the brain of workers and possibly participate as a regulator of the synaptic functions necessary for the development and improvement of cognition in workers. Our results allow us to conclude that the social brain hypothesis is applied to both *A. mellifera* and *F. varia* and the morphological differentiations of the brain are promoted by the differential expression of neurogenic genes, some of them functionally conserved in bees and vertebrates.

Keywords: *Frieseomelitta varia*. Neurogenesis. Social brain. Diferencial gene expression.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-HT** – Serotonina
- AAAD** – aromatic-L-amino acid decarboxylase
- ACh** - Acetilcolina
- Amci* - *chymotrypsin inhibitor*
- Amd* - *alpha-methyldopa hypersensitive protein-like*
- BDNF** - Fator neurotrófico derivado do cérebro
- BOD** – Bio-Oxygen Demand
- CC** - Corpo cogumelar
- CCD** - Corpo cogumelar direito
- CCE** - Corpo cogumelar esquerdo
- ChAC** – Coreia acantocitose
- CP** - Corpo peduncular
- CPD** - Corpo peduncular direito
- CPE** - Corpo peduncular esquerdo
- DA** - Dopamina
- DDC** – Dopa decarboxylase
- DNT1** - Fator neurotrófico em *Drosophila*
- dntm* – *DNA-metiltransferase*
- EcR** – Receptor de ecdisteróides
- GABA** – Ácido gama - aminobutírico
- GDEs** - Genes diferencialmente expressos
- GHPs** – Glândulas hipofaríngeas
- GlcAT-P* - *glucuronyltransferase*
- Hex* - *hexamerina*
- HJ** - Hormônio juvenil
- LSP1* - *larval serum protein 1 gamma*
- LSP2* - *larval serum protein 2*
- LTP** - Potenciação a longo prazo
- mas* - *masquerade*

MIP - *myoinhibiting peptide precursor*

NPV - Núcleo paraventricular

NTs – Neurotrofinas

PK – Plasma kallikrein

REP – Reflexo de extensão da propóscide

Rpl-32 - *proteína ribossomal l-32*

Ser - Serotonina

SPH41 - *serine protease homolog-41*

Spz2 - *spatzle2*

TGF – β – Fator de transcrição do crescimento beta

Thr - Treonina

TOR - *target of rapamycin*

Trk – Receptor de tirosina quinases

V1aR - Receptor de vasopressina

Vg – Vitelogenina

VPS13A - *vacuolar protein sorting 13 homologA*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico relacionando o tamanho do grupo com o aumento do neocórtex.....	21
Figura 2. Anatomia do cérebro humano.....	22
Figura 3. Diferenças no tamanho do cérebro durante o desenvolvimento de castas de abelhas <i>A. mellifera</i>	25
Figura 4. Exemplos das células de cria da espécie <i>F. varia</i>	28
Figura 5. Placa de Elisa utilizada na transferência para produção de rainhas de <i>F. varia</i>	33
Figura 6. Desenho esquemático das principais estruturas cerebrais medidas com o auxílio do Software ImageJ.....	35
Figura 7. Abelhas recém-emergidas, resultado das transferências larvais utilizando-se 50µL de alimento larval.....	40
Figura 8. Cérebro de rainha e operária na fase Pp, Pbm e Re.....	41
Figura 9. Volume total do cérebro de rainhas e operárias de <i>F. varia</i> em desenvolvimento...41	
Figura 10. Desenvolvimento dos corpos cogumelares dos hemisférios esquerdo e direito de operárias e rainhas de abelhas <i>F. varia</i>	42
Figura 11. Desenvolvimento dos corpos pedunculares dos hemisférios direito (A) e esquerdo (B) em operárias e rainhas de abelhas <i>F. varia</i>	43
Figura 12. Volume dos corpos cogumelares (A e C) e corpos pedunculares (B e D) dos hemisférios esquerdo e direito de operárias e rainhas de <i>F. varia</i> com relação ao volume do cérebro total.....	44
Figura 13. Estrutura dos genes relacionados à neurogênese selecionados e do <i>rpl-32</i>	46
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 3% de produtos de amplificação de fragmentos de cDNA dos 9 genes neurogênicos estudados.....	54
Figura 15. Curvas de <i>melting</i> dos nove genes neurogênicos escolhidos.....	56
Figura 16. Níveis relativos de expressão de <i>hex110</i> , <i>hex70b</i> e <i>hex70c</i> obtidos mediante PCR Tempo real em diferentes estágios pupais em castas de <i>F. varia</i>	57

Figura 17. Níveis relativos de expressão de *amd*, *espin-like* e *SPH41* obtidos mediante PCR
Tempo real em diferentes estágios pupais em castas de *F. varia*.....58

Figura 18. Níveis relativos de expressão de *spz2*, *takeout* e *amci* obtidos mediante PCR
Tempo real em diferentes estágios pupais em castas de *F. varia*.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das fases de adulto-farato e indivíduos adultos de <i>F. varia</i> com base na intensidade da pigmentação do olho e do corpo.....	31
Tabela 2. Sequência dos <i>Primers foward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) utilizados nos experimentos da qPCR em Tempo real.....	36
Tabela 3. Volume de alimento larval fornecido às larvas no mês de janeiro de 2018.....	39
Tabela 4. Resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos (BLASTp) dos genes de <i>F. varia</i> com <i>A. mellifera</i> , <i>M. quadrifasciata</i> , <i>D. melanogaster</i> e <i>H. sapiens</i> , e suas respectivas proteínas ortólogas, identificação (ID) e <i>E-value</i>	50
Tabela 5. Resultado do alinhamento global realizado entre <i>F. varia</i> , <i>A. mellifera</i> e <i>M. quadrifasciata</i> , indicando a quantidade de aminoácidos de cada sequência e scores.....	32
Tabela 6. Parâmetros obtidos da curva de eficiência para cada um dos genes selecionados.....	55

ANEXO A – Análises de alinhamento global e alinhamento múltiplo realizados entre as espécies <i>Frieseomelitta varia</i> , <i>Apis mellifera</i> e <i>Melipona quadrifasciata</i>	101
--	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 ORIGEM E EVOLUÇÃO DA SOCIALIDADE.....	18
1.2 O CÉREBRO SOCIAL	21
1.3 O CÉREBRO SOCIAL EM INSETOS - MOTIVAÇÃO	25
1.4 A BIOLOGIA DA ESPÉCIE <i>Frieseomelitta varia</i>	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	32
4.1.1 Produção de rainhas “ <i>in vitro</i> ”.....	33
4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS CÉREBROS	34
4.2.1 Desidratação e inclusão em Histoiresina.....	34
4.2.2 Cortes em micrótomo e coloração.....	35
4.2.3 Análises dos cortes e Análise estatística	35
4.3 ANOTAÇÃO GÊNICA E DESENHO DE <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS.....	36
4.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO GÊNICA.....	37
4.4.1 Extração de RNA total.....	37
4.4.2 Ensaios de PCR convencional e de PCR em Tempo Real	38
5 RESULTADOS	40
5.1 RAINHAS PRODUZIDAS ARTIFICIALMENTE.....	40
5.2 ANÁLISES MORFOLÓGICAS DOS CÉREBROS DE ABELHAS <i>Frieseomelitta varia</i>	41
5.3 ANÁLISES DE CONSERVAÇÃO DOS GENES ENTRE AS ESPÉCIES.....	45
5.3.1 Organização gênica	45
5.3.2 Análises comparativas das sequências nucleotídicas dos transcritos de <i>F. varia</i>	49
5.4 TESTE DE <i>PRIMERS</i> POR PCR CONVENCIONAL E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	54
5.5 TESTE DE EFICIÊNCIA DE <i>PRIMERS</i> PARA qPCR.....	55
5.6 AS HEXAMERINAS 110, 70b E 70c SÃO EXPRESSAS EM CÉREBROS DE <i>F. varia</i>	58
5.7 DEMAIS GENES ANALISADOS	59
6 DISCUSSÃO	61
6.1 PRODUÇÃO ARTIFICIAL DE RAINHAS DE <i>Frieseomelitta varia</i>	61
6.2 AS OPERÁRIAS RECÉM-EMERGIDAS POSSUEM VOLUME CEREBRAL E DE NEURÓPILAS ESQUERDAS MAIORES QUE RAINHAS	62
6.3 A ASSIMETRIA CEREBRAL DURANTE A NEUROGÊNESE	65
6.4 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DOS GENES NEUROGÊNICOS.....	66
6.5 <i>amci</i> , <i>amd</i> E <i>SPH41</i> : POSSÍVEIS ORTÓLOGOS EM VERTEBRADOS	69
6.6 OS GENES <i>hex70b</i> E <i>amci</i> SÃO MAIS TRANSCRITOS EM CÉREBROS DE OPERÁRIAS DURANTE O INÍCIO DO DESENVOLVIMENTO PUPAL	72
7 CONCLUSÕES	77
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 ORIGEM E EVOLUÇÃO DA SOCIALIDADE

A origem da socialidade é marcada por mudanças decorrentes de processos evolutivos, e este fenômeno ainda desperta interesse científico e filosófico (WILSON, 1971, 1975; MAYNARD-SMITH; SZATHMARY, 1995; WEST-EBERHARD, 2003). Baseada em características relacionadas à sua história natural, as espécies são classificadas em categorias, sendo elas: solitárias, subsociais, sociais e eussociais (WILSON, 1975). As características deste último estágio se resumem em: 1) indivíduos da mesma espécie cooperando na criação da prole; 2) distinção de tarefas e de castas, sendo as rainhas responsáveis pela reprodução e as operárias desempenhando as demais funções para manutenção da colônia; 3) sobreposição de gerações (WILSON, 1971).

Durante alguns anos, estudiosos como Darwin e William Morton Wheeler (1928) tentaram explicar a origem evolutiva da eussocialidade em insetos, onde a seleção da hierarquia na colônia explicaria por que as operárias desistiram da reprodução individual e passaram a apresentar algumas particularidades que diferem das rainhas e dos zangões. Além disso, a prole não seria somente alimentada e protegida pela mãe, mas cooperaria com ela na criação de novas crias, gerando grupos em que os pais e descendentes convivem socialmente (WHEELER, 1928). Esta teoria passou a ser questionada, uma vez que em algumas abelhas eussociais as células de cria para a geração de um novo indivíduo são operculadas logo após a postura dos ovos e permanecem assim durante todo o desenvolvimento, impossibilitando o contato entre as larvas e a mãe (BOOMSMA, 2009).

Pensando em como responder a esta questão, Michener (1958) propôs dois modelos que seriam os precursores da transição para a eussocialidade. Em insetos, o mais aceito é o “modelo subsocial”, no qual a prole se encontra sob cuidados de outros adultos que permanecem no ninho e, conseqüentemente, formam um agregado de indivíduos no qual as operárias não se reproduzem. O segundo modelo, denominado “modelo parasocial” consiste em um grupo de fêmeas férteis da mesma geração que desenvolveram relação de cooperação na alimentação e defesa de suas proles, e evoluiu para uma estrutura totalmente eusocial à medida que algumas destas fêmeas tornaram-se operárias estéreis (MICHENER, 1958; LIN; MICHENER, 1972; WEST EBERHARD, 1975). O que permanece incompreendido é o que

levou as operárias a abrirem mão de seu status reprodutivo, levando-as a colaborar na criação da prole e se encarregarem de outras funções (WEST et al., 2002).

Darwin, em “A origem das espécies” (1859), questionou a abrangência de sua teoria da seleção natural quando aplicada, por exemplo, a insetos que possuem fêmeas divididas em castas, e que especializações anatômicas, bem como comportamentais da casta estéril em insetos sociais teriam evoluído em consequência de benefícios conquistados pelos membros reprodutores, que ele considerava parentes próximos das operárias. Neste caso, existe uma certa dificuldade da seleção natural, que age a nível individual, em explicar como a relação altruísta foi selecionada nas castas inférteis ao decorrer dos anos. Têm-se, portanto, um paradoxo no ponto de vista clássico da evolução, uma vez que se um indivíduo não é capaz de se reproduzir, consequentemente não deixará descendentes e não terá nenhuma aptidão (RIBEIRO, 2009).

Hamilton (1964) publicou um estudo no qual procurava explicar o modo de vida eussocial em algumas espécies de animais sob o olhar da seleção natural. A base da teoria de Hamilton, chamada de seleção por parentesco (*kin selection*) é a aptidão (*fitness*) individual, que é a capacidade que um indivíduo possui de transmitir seus genes para as gerações futuras; de forma resumida, a contabilização dos efeitos do *fitness* forneceria respostas para a evolução do comportamento social (MARSHALL, 2016). Segundo o autor, a seleção natural favoreceu um conjunto de alelos que condicionaram determinados membros de um mesmo grupo a agirem de forma altruísta; esta ajuda dada aos parentes teria como consequências o aumento nas taxas de sobrevivência das irmãs, e seus genes seriam passados adiante mais facilmente, já que as novas crias carregam cópias dos mesmos genes de operárias. Isto é explicado pelo fato de que é mais vantajoso para as operárias cuidarem de suas irmãs, que compartilham 75% de seus genes contra 50% de genes compartilhados entre mães e filhas, potencializando assim a aptidão indireta (RIBEIRO, 2009).

Além disso, outra tendência da seleção por parentesco é a prole permanecer próximo aos seus parentes, ou seja, elas não deixam o ninho (HAMILTON, 1964). Esta hipótese fornece evidências para a compreensão de diversos processos de interação social (além do altruísmo), como, por exemplo, a cooperação, a agressão e o egoísmo (GRIFFIN; WEST, 2002). O que ainda gera dúvidas é se o parentesco realmente é um fator de influência que vai guiar o estabelecimento da eussocialidade (WILSON; HOLLOBLER, 2005).

Um modelo alternativo proposto por Wilson e Holldobler (2005) defende a ideia de que a seleção de um grupo de alelos que condicionam a cooperação e se expressam de forma variável são a chave para a ocorrência do comportamento social, direcionando indivíduos a se diferenciarem em rainhas ou operárias de acordo com características fisiológicas e comportamentais. Assim, a proximidade genética surge em decorrência da eussocialidade, não sendo essencialmente necessária para o estabelecimento da mesma (WILSON; HOLLDOBLER, 2005).

Atualmente já se sabe que existem vias genéticas relacionadas ao comportamento social, onde grupos de genes exercem efeitos claros tanto no surgimento do comportamento social do indivíduo quanto na organização social que irá se estabelecer dentro do grupo (BLOCK; GROZINGER, 2011). Em abelhas, a *vitelogenina* (*Vg*), proteína precursora do vitelo do ovo (WYATT; PAN, 1978; HAGERDON; KUNKEL, 1979) é um exemplo destes possíveis candidatos. Estudos envolvendo técnicas moleculares sugerem que a *Vg* possa ter adquirido variadas funções durante a evolução destes insetos e com o surgimento da eussocialidade, dentre elas a capacidade de se ligar a membrana das glândulas hipofaríngeas (GHPs) de operárias jovens, mostrando seu possível envolvimento na composição do alimento larval em *Apis mellifera*. Este achado fornece evidências de que a evolução para uma sociedade de inseto eusocial avançada tem sido guiada por uma utilização alternativa da *Vg* (ADAMS et al., 2003). A *Vg* parece atuar também na regulação do polietismo etário em operárias, especialmente no início do forrageamento; esta habilidade é regulada socialmente por processos que podem tanto atrasar quanto acelerar o início do forrageamento, afetando diretamente fatores fisiológicos que regulam essa transição, como é o caso da vitelogenina (TOTH; ROBINSON, 2007).

Um estudo comparativo do genoma de dez espécies de abelhas que apresentavam complexidade social distinta revelou que houve uma expansão da capacidade regulatória de genes das espécies solitárias para as eussociais, sugerindo que os responsáveis pela socialidade são os fatores de transcrição *cis* na geração de redes de interação diferentes (KAPHEIM et al., 2015). Modificações epigenéticas, como, por exemplo, a metilação do DNA, também têm sido apontadas como mediadoras extremamente importantes entre interações sociais e expressão gênica em certos grupos de animais (WEAVER ET al., 2004; FRANKLIN et al., 2010).

Um estudo realizado por Cardoso-Júnior e colaboradores (2018) testou a hipótese de que enzimas envolvidas em processos epigenéticos também participam da rede reguladora por trás da resposta das operárias às mudanças no contexto social. Mediante quantificação da expressão dos genes de DNA metiltransferase (*dnmt1a*, *dnmt2* e *dnmt3*) de abelhas *Apis mellifera* em diferentes condições demográficas (como presença ou ausência de novas crias e adultos jovens) foi constatado que a expressão dos três genes foi alterada, indicando que as interações sociais afetaram processos moleculares distintos (CARDOSO-JÚNIOR et al., 2018). Além disso, dados recentes indicam que alterações na demografia possuem efeitos diretos na expressão de genes envolvidos em processos como envelhecimento, vitelogenese, funcionamento do sistema endócrino e fisiologia nutricional (EYER et al., 2017).

Diante do apresentado, fica claro que a origem e a evolução da eussocialidade impuseram desafios cognitivos a estes animais, onde, de acordo com a condição social a que foram submetidos, têm-se a modulação de certos processos morfológicos/genéticos/fisiológicos, refletidos em fenótipos distintos.

1.2 O CÉREBRO SOCIAL

A hipótese do cérebro social foi inicialmente proposta por Humphrey (1976) que, a partir da observação de grupos sociais de gorilas e macacos, sugeriu que o processamento de informação, bem como a capacidade de reconhecer e memorizar, foram os eventos decorrentes da evolução que guiaram o início da inteligência primata, explicando o porquê de primatas (especialmente os humanos) possuírem um cérebro tão grande. Mais tarde, Dunbar e Shultz (2007) conceituaram esta hipótese, na qual grupos de indivíduos da mesma espécie interagem entre si, e estas relações constituem uma importante fonte de desafios cognitivos que animais solitários não enfrentam, aumentando assim a complexidade social, a qual promove a seleção de maiores investimentos em cérebros maiores.

Estudos com diversos modelos animais vêm sendo realizados a fim de melhor determinar as relações envolvidas no processo de sociabilidade. Algumas espécies de pássaros possuem a capacidade de esconder seus recursos para serem consumidos futuramente, confiando apenas em sua memória para mais tarde os resgatarem de seus “esconderijos” (DALLY et al., 2004). São aves extremamente protetoras e desempenham estratégias de alta complexidade para esta finalidade, uma vez que seus recursos podem ser roubados por outros

indivíduos (CLAYTON et al., 2007). Neste caso, ocorre uma grande “corrida de armamento cognitivo”, pois estas aves necessitam obrigatoriamente de estratégias de esconderijo melhorada para otimizar sua proteção de recursos; em contrapartida, o furtador também requer estratégias cada vez mais aperfeiçoadas para obter sucesso no roubo (CLAYTON et al., 2007). De maneira resumida, a habilidade cognitiva, juntamente com as pressões seletivas e exigências impostas pelas interações sociais, consolidaram a evolução de alguns órgãos e tecidos com o passar dos anos, especialmente do cérebro (DUNBAR, 1998, 2003).

A capacidade de reconhecer indivíduos da mesma espécie para assim estabelecer seu próprio lugar na sociedade, aprender com os outros e, conseqüentemente, ensinar novas tarefas aos outros é chamada de inteligência social (BYRNE; WHITEN, 1992; WHITEN; BYRNE, 1997). O comportamento social, então, é explicado essencialmente pelo funcionamento do cérebro, sendo este órgão encarregado pela capacidade da sociabilidade, apontada como responsável pelo desenvolvimento da inteligência (HUMPHREY, 1976).

O cérebro teria evoluído para resolver problemas sociais. O aumento deste órgão não foi produto da adaptação a um determinado ambiente, mas sim da complexidade social existente nos grupos de primatas, que culminou na sociedade humana (ADOLPHS, 1999). Evidências mostram que o tamanho do grupo social tem relação com tamanho do cérebro em primatas, mais especificamente de uma região chamada neocórtex (DUNBAR, 1998), responsável pelo domínio da cognição (MACLEAN, 1990) (Figura 1). O neocórtex também está relacionado com outros índices de complexidade social, como, por exemplo, a prevalência da brincadeira dos juvenis do grupo, a fim de maximizar o potencial da aprendizagem (LEWIS, 2000), bem como a frequência de aprendizagem social (READER; LALAND, 2002).

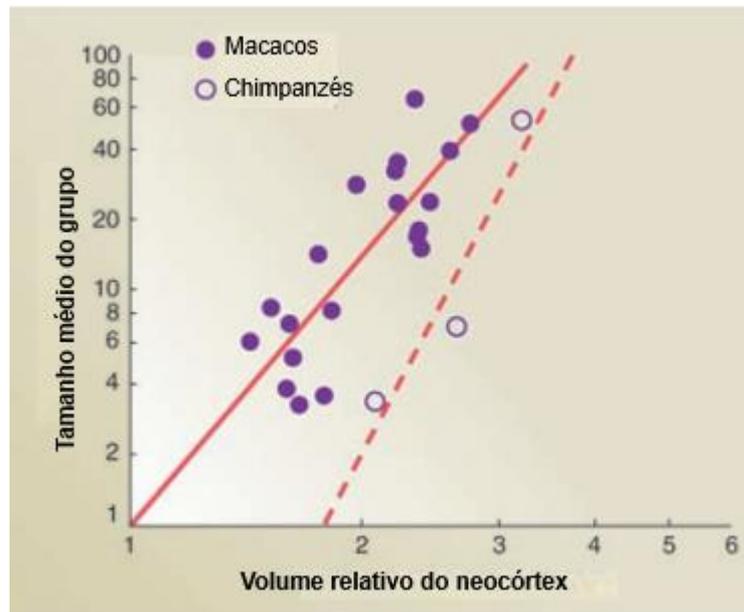


Figura 1 - Gráfico relacionando o tamanho do grupo com o aumento do neocórtex. O tamanho médio do grupo (eixo Y) aumenta proporcionalmente com o aumento relativo do neocórtex (eixo X) em primatas antropoides. Círculos preenchidos: macacos; círculos sem preenchimento: chimpanzés.

Fonte: Traduzido de DUNBAR; SHULTZ, 2007.

Em mamíferos carnívoros (BENSON-AMRAM et al., 2016), morcegos (BARON et al., 1996; PITNICK et al., 2006) e em baleias dentadas (RIDGWAY et al., 2017) também foi verificada tal relação: quanto maior o grupo social, maior o volume do cérebro. Além disso, acredita-se que o tamanho do neocórtex pode ser limitante nas relações sociais que um indivíduo pode estabelecer: se o grupo ao que ele pertence crescer demasiadamente, torna-se impossível para este indivíduo manter os vínculos sociais próximos com todos os membros pertencentes ao mesmo grupo (DUNBAR, 1992). Neste caso, podemos dizer que juntamente com o cérebro social surgem especializações anatômicas, como é o caso do neocórtex em primatas.

Em *Homo sapiens*, apesar de os seres humanos constituírem um grupo profundamente social, os mecanismos neuronais existentes por trás do comportamento e cognição social ainda permanecem pouco compreendidos (ADOLPHS, 1999). A cognição social, que é a habilidade que humanos e outros animais possuem de reconhecer sinais sociais e interpretá-los de maneira adequada (BUTMAN; ALLEGRI, 2001), teria evoluído a partir da cooperação existente em uma sociedade (ADOLPHS, 1999).

Um conjunto de estruturas neurais, como a amígdala, o córtex pré-frontal ventromedial, a ínsula e o córtex somatosensorial direito (Figura 2) desempenham um

importante papel na construção do comportamento e cognição social em humanos, que parecem intermediar processos relacionados aos estímulos sensoriais que são socialmente relevantes (BROTHERS, 1990). A amígdala está relacionada com as expressões que se manifestam na face, importantes para a interpretação correta de sinais sensoriais (HAXBY et al., 2000). O córtex pré-frontal ventromedial associa-se ao julgamento e raciocínio social (BECHARA et al., 1997), além de possuir relação com a vocalização em primatas (ROMANSKI; GOLDMAN-RAKIC, 2002). Um estudo feito por Damasio (1994) revelou que pacientes acometidos por lesões pré-frontais apresentam bloqueios no raciocínio social e na tomada de decisões, pois são encontradas falhas nos sinais que guiam a conduta. A ínsula se relaciona às experiências emocionais, e o córtex somatosensorial permite que as emoções expressas na face sejam o resultado adequado da manipulação da informação (ROSS, 1998).

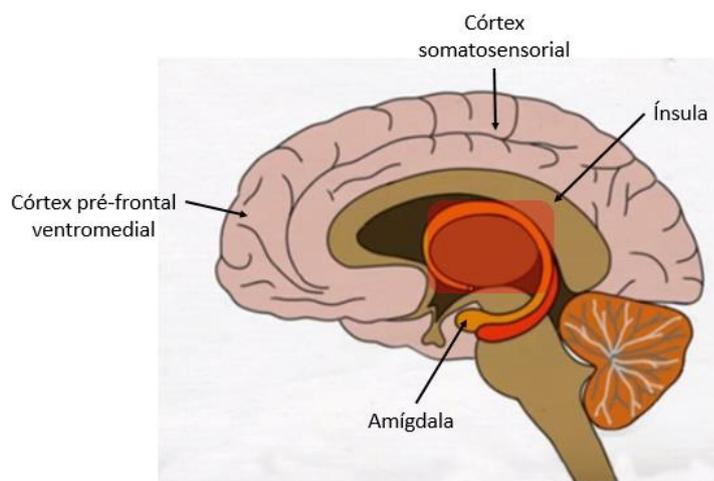


Figura 2 - Anatomia do cérebro humano. As setas indicam as estruturas neurais relacionadas aos processos de comportamento e cognição social.

Fonte: CHUSID, 1985

Molecularmente, sabe-se que a vasopressina, neuropeptídeo secretado pelo núcleo paraventricular (NPV), exerce função nos status reprodutivo e social em espécies de mamíferos, mais especificamente na comunicação social (INSEL; YOUNG, 2000). Um estudo realizado por van Wimersma Greidanus (1982) verificou que roedores com mutações nulas no receptor de vasopressina (V1aR) apresentaram uma ruptura total do reconhecimento social. Com a reexpressão do receptor, o reconhecimento social destes animais foi mais fácil, e como consequência houve o prolongamento da duração da memória social (LANDGRAF et al., 2003). De maneira interessante, foi demonstrado recentemente que a via mTOR (*target of rapamycin*) está involucrada em processos neuromorfo genéticos que possibilitam o

aprendizado em resposta a estímulos sonoros em aves (AHMADIANTEHRANI; LONDON, 2017). Em resumo, a hipótese do cérebro social parece se aplicar muito bem em vertebrados.

1.3 O CÉREBRO SOCIAL EM INSETOS - MOTIVAÇÃO

A hipótese do cérebro social também foi testada para explicar a evolução de insetos sociais (O'DONNELL et al., 2015). Conforme já citado (ver seção 1.1) a rainha possui função exclusivamente reprodutiva, cabendo às operárias a manutenção da colônia. Assim, as castas em insetos sociais possuem comportamentos distintos, incluindo diferenças nas necessidades cognitivas, que determinam o grau de investimento em tecidos cerebrais (O'DONNELL et al., 2015).

Em geral, o cérebro de insetos sociais possui um par de estruturas denominadas corpo cogumelar (CG), responsáveis pela memória espacial, aprendizagem, processamento e armazenamento da informação olfatória (STRAUSFELD, 1993; LIU et al., 1999; DAVIS, 2001). Cada corpo cogumelar é composto por neurópilas – ou cálices (RYBAK; MENZEL, 1998). Em vespas da tribo Epiponini foi verificado que o tamanho dos corpos cogumelares em relação ao cérebro total é maior em rainhas quando comparadas com operárias, sugerindo uma relação positiva entre o investimento no desenvolvimento dos corpos cogumelares com a dominância social (O'DONNELL et al., 2017). Um estudo em pupas de abelhas *A. mellifera* demonstrou que a proliferação dos neurônios existentes nos corpos cogumelares (chamados de células de Kenyon) e a morte celular diferiram entre as castas, ocorrendo em maiores proporções no cérebro de rainhas; isto indica diferenças morfológicas casta-específicas durante o desenvolvimento dos CGs (ROAT; CRUZ-LANDIM, 2010).

O cérebro sofre diferentes influências dependendo do ambiente em que o animal se encontra. Esta capacidade de “moldar” suas estruturas em decorrência de estímulos externos é chamada de plasticidade cerebral (BARTON et al., 1995). Por muito tempo acreditou-se que em insetos sociais ocorriam os mesmos processos que são vistos em outros animais, em que ambientes sociais complexos exigiriam habilidades cognitivas individuais, culminando no aumento no tamanho do cérebro. Porém, O'Donnell e colaboradores (2015) propuseram um modelo alternativo que explicaria a evolução do cérebro social em insetos, particularmente em vespas, nomeado “hipótese de cognição distribuída”. O autor realizou uma análise comparativa entre 29 espécies de vespas sociais e solitárias, e verificou que, conforme o

comportamento social evolui, ocorre uma diminuição do volume das áreas cerebrais responsáveis pelo processamento cognitivo, ou seja, dos corpos cogumelares. Isto é explicado pelo fato de que, quando um indivíduo vive em sociedade, existindo cooperação e interação, o alto investimento cerebral individual não se faz necessário, uma vez que é mais vantajoso investir na chamada “inteligência coletiva” e assim aumentar a sobrevivência da colônia, executando em conjunto as tarefas complexas (O’DONNELL et al., 2015). Já nas espécies solitárias, os corpos cogumelares se mostraram significativamente maiores. Portanto, com o aumento da complexidade social, estruturas cerebrais podem diferir anatomicamente durante o desenvolvimento, de acordo com o que é previsto na hipótese do cérebro social.

Em castas de abelhas *A. mellifera*, a saga do cérebro social tem início com o desenvolvimento distinto em favor das rainhas durante o estágio larval (MODA et al., 2013; BARCHUK et al., 2017). Nestas abelhas, a qualidade e a quantidade de alimento fornecido às larvas são de extrema importância para a diferenciação em rainhas ou operárias: as larvas de rainhas recebem doses maiores de alimento, e este possui uma composição diferenciada (BEETSMA, 1979). Trata-se da geleia real, que é utilizada por rainhas durante todo o ciclo de desenvolvimento, ao passo que as operárias são nutridas com tal alimento apenas até o terceiro estágio larval (L3), e deste período em diante o alimento passa a ser composto por mel, pólen e geleia real – a geleia de operária (MICHENER, 1969; REMBOLD et al., 1974; WEAVER, 1974; ASECOT; LENSKY, 1984; ver também LEIMAR et al., 2012).

A alimentação diferencial desencadeia várias cascatas gênicas, que interferem principalmente no desenvolvimento do cérebro entre as castas. Nosso grupo, utilizando PCRq em Tempo Real, hibridação *in situ*, ensaios de proliferação celular, e técnicas imunohistoquímicas, demonstrou, em *A. mellifera*, que a expressão dos genes *shot* e *GlcAT-P* é decisiva para a neurogênese diferencial em larvas favorecendo às futuras rainhas (MODA et al., 2013). Acredita-se estes dois genes, em conjunto, executam função fundamental no desenvolvimento do cérebro de rainhas na fase larval (FREIRE, 2012; MODA et al., 2013).

Ainda, através da técnica de sequenciamento de poli-A+, nosso grupo demonstrou que em *A. mellifera* existem 60 genes diferencialmente transcritos na fase larval L3, na qual tem início as diferenças morfológicas no sistema nervoso das castas destes insetos, decorrentes de diferenças moleculares provindas da alimentação diferencial neste período do desenvolvimento (VIEIRA, 2014). Destes, 29 são mais expressos em cérebros de rainhas, dentre os quais se encontram os genes *espin-like*, *SPH41*, *spz 2*, *takeout* e *amd*, relacionados à

atividade neuronal. Em operárias existem 31 genes mais expressos, sendo que a *Hex110*, *Hex70b*, *Hex70c* e *Amci* fazem parte deste listado; estes são genes relacionados à inibição de determinadas proteínas durante a neurogênese (VIEIRA, 2014). Neste estudo, queremos verificar se em pupas de *F. varia* estes genes seguem o mesmo padrão de expressão entre as castas.

Após a fase larval, durante a primeira parte do desenvolvimento adulto-farato, as operárias apresentam cérebros maiores do que os de rainhas, provavelmente devido às diferenças hormonais entre as castas (BARCHUK et al., 2017). Um estudo morfológico feito pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que, mesmo os tamanhos totais dos cérebros sendo estatisticamente iguais, a relação tamanho das neurópilas cognitivas/tamanho da área total favorece as operárias, estabelecendo que existe uma inversão na morfogênese do cérebro durante todo o período pupal e adulto-farato. Assim, o cérebro adulto das fêmeas nestes insetos termina sendo proporcionalmente maior em operárias do que em rainhas, o qual permite aos membros desta casta desenvolver as inúmeras atividades próprias da vida adulta (Figura 3).

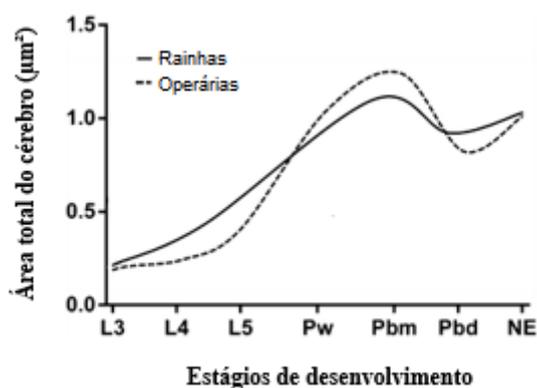


Figura 3 - Diferenças no tamanho do cérebro durante o desenvolvimento de castas de abelhas *A. mellifera*. Na fase larval, o cérebro de rainhas se desenvolvem mais rapidamente do que os de operária, situação que se inverte no período pupal e se mantém até a fase de recém emergidas.

Fonte: BARCHUK et al., 2017.

Atualmente, já existem dados na literatura que suportam a noção de que as diferenças de tamanho entre as abelhas aumentam juntamente com o nível de socialidade. Exemplos de destaques, como apresentado por Michener (1974), são a tendência crescente na variação do tamanho médio entre as operárias não fertilizadas e rainhas em *Augochloropsis sparsilis*

(espécie semi-social). Este estado é seguido pelo aparecimento de grandes diferenças de tamanho entre as castas em *Lasioglossum malachurum* (espécie primitivamente eusocial) e em *Lasioglossum imitatum* e *L. laevisium*. Nesta última espécie, a distinção de tamanho é acompanhada por uma alometria proporcional em relação ao desenvolvimento do ovário (ativado pela oogênese), incluindo o número de ovariolos (PACKER, 1992). Além disso, existem certas espécies do gênero *Bombus* (também primitivamente eusociais) com diferenças notáveis no tamanho das fêmeas, bem como na fisiologia, comportamento e até mesmo na coloração (citação).

O estágio final é representado por abelhas altamente eusociais (por exemplo, o gênero *Apis*, Apini e as abelhas sem ferrão, Meliponini, ver SAKAGAMI, 1982). Também existem diferenças refletidas no tamanho do cérebro. O desenvolvimento do cérebro nas abelhas altamente eusociais pode, desta maneira, ser um caso paradoxal que representa um subproduto da evolução da divisão reprodutiva do trabalho em espécies com difenismo no tamanho feminino. Assim, hipotetizamos que, evolutivamente, as diferenças de castas nas abelhas foram promovidas por *trade-offs* morfofisiológicos do desenvolvimento em que a casta especializada da reprodução investe no desenvolvimento e função dos ovários, enquanto que a casta operária, não reprodutiva, investe no desenvolvimento do cérebro, e consequentemente desfruta de uma cognição melhorada, resultado de interações complexas realizadas durante a vida.

Para testar se a evolução deste fenômeno ocorreu nas abelhas, e se está de acordo com a hipótese do cérebro social, devem ser realizados estudos com base nas relações alométricas entre regiões do corpo em abelhas de diferentes níveis de socialidade, bem como na conservação das redes de expressão gênica que medeiam o difenismo cerebral das castas destes animais. ***Neste trabalho, testamos a hipótese na abelha nativa sem ferrão *Frieseomelitta varia*, cujo genoma está sendo atualmente sequenciado e anotado.*** FALAR UM POUCO DAS ABELHAS SEM FERRÃO; filogenia; origem da socialidade em apinini e meliponini

1.4 A BIOLOGIA DA ESPÉCIE *Frieseomelitta varia*

Nosso modelo de estudo é uma espécie de abelha nativa, de nome popular marmelada-amarela (*Frieseomelitta varia*). Esta espécie de abelha é de distribuição Neotropical, e pode

ser encontrada no Brasil (Estados de Bahia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e Tocantins) e na Bolívia (SANTA CRUZ; ver CAMARGO; PEDRO, 2008). Nas espécies de abelhas sem ferrão, as funções que distinguem as castas são semelhantes às das abelhas *A. mellifera*, onde as rainhas são responsáveis unicamente pela reprodução e as operárias desempenham as demais funções dentro da colmeia – limpeza, forrageamento, cuidado da prole, entre outros (MICHENER, 1974).

Como em toda colônia de abelhas, a de *F. varia* é constituída de indivíduos machos e fêmeas. Em espécies eussociais, as fêmeas se dividem em uma rainha, encarregada da reprodução, e de operárias funcionalmente estéreis, que desenvolvem tarefas como forrageamento, cuidado da prole, nidificação e proteção da colônia (WEINSTOCK et al., 2006), havendo divisão de trabalho entre as castas. Assim, as funções desenvolvidas por cada uma delas se relacionam e são vantajosas para ambas (SANTOS, 2008). Existem também diferenças morfológicas, comportamentais ou fisiológicas que se manifestam de maneiras distintas de acordo com as suas respectivas tarefas (MICHENER, 1974).

Em *F. varia* (Lepeletier, 1836) os conjuntos de células de cria produzidas adotam formato de cacho (MICHENER, 1974). Acredita-se que este formato de ninho seja uma característica ancestral dos Meliponini, e que a partir dele teriam surgido células dispostas em favos em formato horizontal (MICHENER, 1961; 1974). As células de cria em que rainhas e operárias irão se desenvolver não diferem em tamanho, e, portanto, não ocorre a construção de células reais que geralmente são vistas em outras espécies (como *A. mellifera*) (SAKAGAMI, 1982; KERR et al., 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997; MICHENER, 2000; JARAU et al., 2010).

As rainhas se desenvolvem a partir da junção de duas células de tamanho normal, em que uma célula auxiliar contendo apenas alimento é criada ao lado de uma célula de cria já existente – contendo alimento e uma larva em fase final de alimentação (L4); se uma larva se alimenta apenas com o alimento presente em sua célula, ela originará uma operária. Caso a larva consuma uma dose extra de alimento larval provindo de uma célula adjacente, haverá a produção de uma rainha (TERADA, 1974; FAUSTINO et al., 2002; TEIXEIRA, 2007) (Figura 4). Deste modo, a quantidade de alimento ingerido pela larva é o fator determinante das castas nestas abelhas nativas.

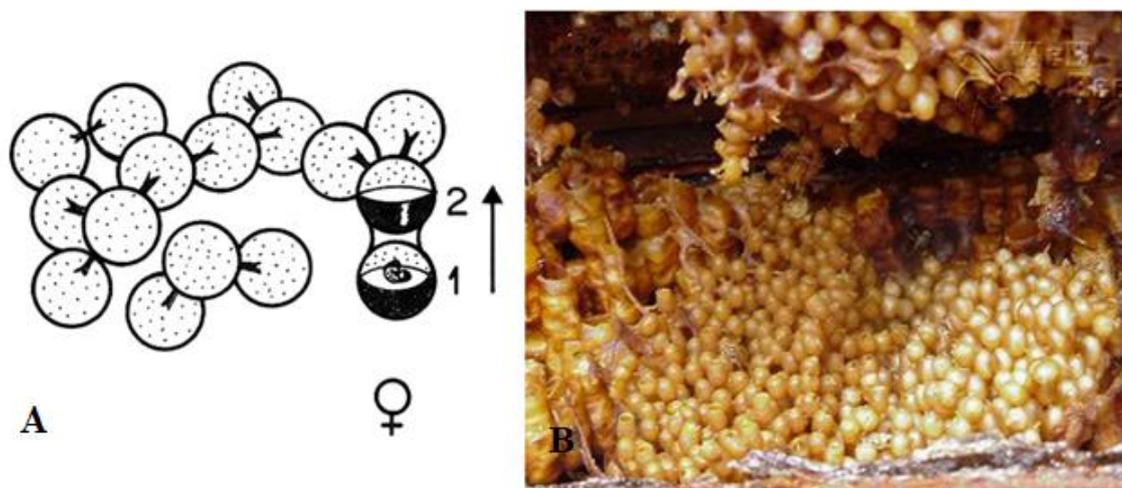


Figura 4 - Exemplos das células de cria da espécie *F. varia*. A: esquema de conjuntos de células de cria da abelha, com uma célula contendo larva (1) e uma célula auxiliar criada ao lado (2). Se a larva consumir o alimento da célula original e da adjacente, tornar-se-á rainha, se não, operária. B: ninho de *F. varia* em formato de cacho.

Fonte: figura A: HARTFELDER et al., 2006; Figura B: BAPTISTELLA et al., 2012.

Os ovos diploides fecundados resultarão no nascimento de fêmeas, capazes de se diferenciarem em rainhas ou operárias, de acordo com a quantidade de alimento fornecido às larvas. O desenvolvimento dos ovários em operárias também é um fator determinante na distinção casta-específica (LISBOA, 2005). De acordo com um estudo feito por Boleli e colaboradores (1999), nos estágios iniciais do desenvolvimento pupal, os ovários das operárias de *F. varia* são morfologicamente semelhantes aos de rainha, ambos possuindo a mesma constituição. Conforme a pupa avança de fase, os ovaríolos começam a sofrer apoptose, perdendo boa parte das estruturas antes presentes. Deste modo, ocorrem mudanças morfológicas simultâneas nos ovaríolos das operárias, sendo vista na adulta apenas uma massa celular amorfa. Assim, as operárias permanecem estéreis e não modificam seus ovários, mesmo na ausência da rainha (BOLELI et al., 1999; 2000; CRUZ-LANDIM, 2000).

Assim, para testar a hipótese do cérebro social em abelhas *F. varia*, primeiramente determinamos a dinâmica morfológica do cérebro e de regiões cerebrais de rainhas e operárias em desenvolvimento e em recém nascidas. Nas mesmas fases do desenvolvimento pós-embrionário, determinamos o perfil de transcrição de 9 genes neurogênicos que, em *A. mellifera*, possuem atividade casta-específica (VIEIRA, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral foi determinar os padrões morfogenéticos e moleculares do desenvolvimento cerebral pós-embrionário de rainhas e operárias de abelhas *Frieseomelitta varia*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar e comparar as dimensões do cérebro total e dos corpos cogumelares e pedunculares de operárias e rainhas de abelhas *F. varia* em desenvolvimento pós-embrionário;
- Determinar *in silico* a organização de genes neurogênicos com potencial participação na diferenciação de castas de *F. varia*.
- Determinar o perfil de transcrição de genes neurogênicos no cérebro de rainhas e operárias em desenvolvimento pós-embrionário.
- Identificar potenciais ortólogos de genes neurogênicos em outros grupos animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As abelhas sem ferrão *F. varia* que serviram de modelo para este estudo foram coletadas no Meliponário Experimental da Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto e no Meliponário Experimental do Grupo de Pesquisa Biologia da Socialidade, UNIFAL-MG, Campus Sede, Alfenas. As fases do desenvolvimento utilizadas foram: a fase pupal Pp, escolhida por ser uma fase do início do desenvolvimento pupal; a fase adulto-farato Pbm, por se tratar de uma fase tardia do desenvolvimento pupal, onde, após ela, foi observada uma inversão nos padrões morfométricos de *A. mellifera* (Barchuk et al., 2017); e abelhas recém-emergidas, de até 24h de vida adulta. As características das fases analisadas e das demais estão representadas na Tabela 1. Para as análises histológicas, as pupas foram colocadas em placa de petri com parafina, e então seus cérebros foram dissecados em fixador paraformaldeído 4%, com o auxílio de pinças cirúrgicas finas, Placa de Petri com fundo de parafina e uma lupa. Para as análises moleculares, os cérebros foram dissecados em solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada, também com o auxílio de pinças e lupa.

Tabela 1 - Caracterização das fases de adulto-farato e indivíduos adultos de *F. varia*, com base na intensidade da pigmentação do olho e do corpo. Em negrito, as fases utilizadas em nosso estudo.

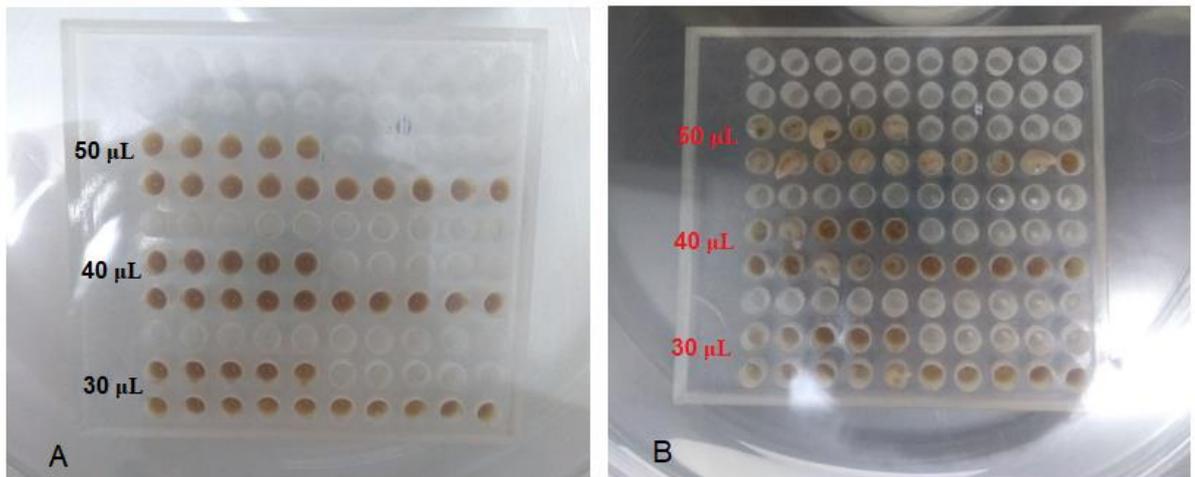
Fonte: HARTFELDER et al. (2006). COLOCAR IMAGENS DAS PUPAS

Fase	Característica
Pw	Olho branco; corpo sem pigmentação
Pp	Olho rosa; corpo sem pigmentação
Pb	Olho marrom; corpo sem pigmentação
Pbl	Olho marrom; corpo com apêndices alaranjados
Pbm	Olho marrom; corpo com apêndices medianamente pigmentados
Pbd	Olho marrom; corpo com apêndices bem pigmentados (tórax + abdômen claros)
Recém-emergida	Tórax e abdômen claros
Nutridora	Tórax melanizado e abdômen claros com linhas transversais
Forrageira	Tórax e abdômen escuros

4.1.1 Produção de rainhas “*in vitro*”

Desde que cada colônia de *F. varia* normalmente possui uma rainha, para a obtenção de um número suficiente de rainhas a serem utilizadas nos diferentes ensaios, foi desenvolvido um protocolo de criação artificial de indivíduos desta casta. Para isto, foi primeiramente necessário estabelecer qual o volume de alimento larval seria o ideal para que promovesse o desenvolvimento de uma rainha. Primeiramente, eram escolhidas colônias em ótimas condições para condução do estudo, com base no número de células recém-construídas, de coloração mais escura (indicando a presença de ovos), e que apresentavam maior número de operárias em atividade. Estas células de crias novas eram retiradas da colônia e em laboratório, em bancada e utensílios esterilizados (para assim evitar a contaminação do alimento larval, o que poderia interferir na eclosão dos ovos e posterior desenvolvimento das larvas), estas células eram abertas com a ajuda de uma pinça. Do fundo das células extraiu-se o alimento larval através de uma bomba de sucção adaptada. Este alimento foi acondicionado em freezer, com temperatura de -4°C.

O alimento, previamente descongelado, foi transferido para os poços de uma placa de Elisa de 96 poços, devidamente esterilizada, com o auxílio de uma micropipeta. Foram utilizados diferentes volumes (30, 40 e 50 µL), e então, os ovos de *F. varia* foram transferidos com a ajuda de uma agulha de transferência. No total, foram utilizados 45 ovos (15 em cada volume - Figura 5). Os volumes testados foram escolhidos a partir do trabalho publicado por Baptistella et al (2012). CITAR PQ REPETI OS EXPERIMENTOS (FASES LARVAIS). As mesmas colônias das quais o alimento foi retirado foram utilizadas para a transferência dos ovos. Após, a placa foi colocada em um recipiente de plástico com tampa envolto por filme PVC a fim de preservar a umidade interna, o qual foi acondicionado em estufa (BOD, *Bio-Oxygen Demand*) com temperatura de 30°C e com umidade controlada de 80%. FALAR DAS OPERÁRIAS (DIAS NA ESTUFA ETC)



A

Figura 5 - Placa de Elisa utilizada na transferência para produção de rainhas de *F. varia*. A = 1º dia de transferência, com os ovos embebidos em alimento larval; B = 8º dia da transferência, com praticamente todas as larvas já eclodidas.

Fonte: Da autora.

4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS CÉREBROS

4.2.1 Desidratação e inclusão em Histo-resina

A preparação histológica do material é uma etapa fundamental para posterior análise da morfologia. Depois de dissecados, os cérebros foram mantidos no fixador por 2 horas em tubo Eppendorf de 2 µL (de fundo arredondado) e, após esse período, foi realizada a desidratação das amostras: os cérebros passaram por uma bateria de álcool de concentrações 70%, 90% e 95%, sendo que cada troca de álcool ocorreu de 15 em 15 minutos e duas vezes a cada gradação, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.

Após a desidratação dos cérebros, os mesmos foram colocados em solução de pré-infiltração contendo de resina + álcool 95% (1:1), e deixados *overnight*. Posteriormente, foram colocados em resina líquida e armazenados até a etapa de inclusão em solução de metacrilato (Histo-resina *Leica*), e foram transferidos para histomoldes, contendo resina e polimerizador. Os histomoldes ficaram em temperatura ambiente por 24 horas; depois foram colocados em uma estufa a 40°C por 3 horas para uma polimerização mais efetiva do material.

4.2.2 Cortes em micrótomo e coloração

Os cérebros incluídos em resina foram fixados em blocos de madeira para que fosse possível realizar cortes em micrótomo (Leica RM 2135). Os cortes foram seriados (5 μm) e feitos com uma navalha de vidro. As lâminas foram lavadas com detergente e álcool para que qualquer impureza fosse retirada. Padronizou-se colocar 8 cortes por lâmina, sendo que todos eles foram utilizados nas análises morfométricas. Os cérebros permaneceram sempre retos durante a realização dos cortes. Depois, com os cortes já posicionados, as lâminas ficaram em estufa a 50°C por 2 horas, para que assim o corte tivesse maior adesão e fossem evitados enrugamentos.

As soluções utilizadas para a coloração das lâminas foram Fucsina básica (0,45 g), Azul de metileno (0,32 g) e Tetraborato de sódio (2,5 g, pH \pm 9,5), diluídos em 250 mL de água destilada. As soluções foram estocadas separadamente, e para a solução de corante final, foram misturados 24 mL de azul de metileno, 42 mL de tetraborato de sódio e 30 mL de etanol absoluto. Em seguida, foram adicionados 15 mL de fucsina básica. Então, as lâminas foram imersas e mantidas no corante por 5 minutos e lavadas em água corrente para retirada do excesso. Seguidamente, colocou-se uma lamínula contendo meio de montagem (Enthellan) sobre os cortes para visualização ao microscópio.

4.2.3 Análises dos cortes e Análise estatística

Após concluir todas estas etapas, as lâminas montadas com os cortes foram analisadas com o auxílio do microscópio *Nikon Eclipse 80i* (Departamento de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG). As estruturas presentes no cérebro (Figura 6) foram examinadas e as imagens capturadas através do software *Nis element 2.0* (escala de 100 μm). Em seguida, para estimar a área das estruturas cerebrais, foi utilizado o software ImageJ versão 1.49 (<https://imagej.nih.gov/ij/>), selecionando a região de interesse. Os pixels foram convertidos em μm^2 com base na escala da foto, e depois multiplicamos a área pela espessura do corte (5 μm) para estimar o volume do cérebro e suas regiões (O'DONNELL et al., 2013; O'DONNELL et al., 2015). Isto possibilitou comparar o tamanho (volume) dos cérebros e das estruturas presentes nele de operárias e rainhas das fases pupal e de adultas.

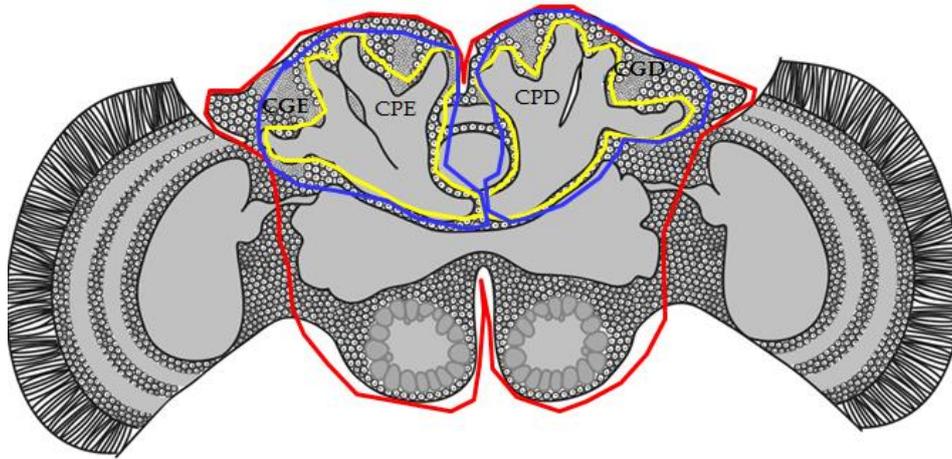


Figura 6 - Desenho esquemático das principais estruturas cerebrais medidas com auxílio do Software *ImageJ*. Vermelho: representação da área total do cérebro; amarelo: representação da área ocupada pelo corpo pedunculado esquerdo (CPE) e corpo pedunculado direito (CPD); azul: representação da área ocupada pelo corpo cogumelar esquerdo (CGE) e corpo cogumelar direito (CGD).

Fonte: Modificado de NOCELLI et al., 2010.

Os resultados obtidos nas análises morfológicas foram analisados no software *GraphPad Prism* versão 6.0, utilizando um nível de significância para a rejeição da hipótese fixado em 95% ($p < 0,05$). Os valores foram expressos como média \pm EPM. ANOVA two way, seguida de pós-teste de Bonferroni.

4.3 ANOTAÇÃO GÊNICA E DESENHO DE *PRIMERS* ESPECÍFICOS

Para escolher os genes utilizados neste estudo, nos baseamos no trabalho de Vieira (2014). A partir de uma lista de genes neurogênicos encontrados em larvas L3 de *A. mellifera*, que são genes diferencialmente expressos (GDEs) entre as castas, selecionamos 9 deles para serem testados durante o desenvolvimento do cérebro de *F. varia*. São eles: *espin-like*, *serine protease homolog 41 (SPH41)*, *spatzle 2*, *takeout* e *alpha-methyl dopa hypersensitive protein-like (amd)*, *hexamerin 110 (Hex110)*, *hexamerin 70b (Hex70b)*, *hexamerin 70c (Hex70c)* e *chymotrypsin inhibitor (Amci)*. DESCRIVER COMO FOI FEITA A ANOTAÇÃO DETALHADAMENTE, SÓ ANOTOU EXONS E INTRONS

Com o *draft* da sequência genômica da espécie já disponível, foi possível realizar a anotação desses genes com o intuito de traçar um perfil de conservação das redes de expressão que medeiam o difenismo cerebral das castas de *F. varia*. Foi utilizada a plataforma *Artemis* (disponível para download em: <http://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis>), que é

uma ferramenta pela qual se visualiza o genoma livre, permitindo assim a anotação de genes de interesse (identificação de regiões codificadoras, éxons, introns, regiões promotoras, etc.). Assim, foi possível elaborar *primers* de sequências específicas para os genes escolhidos utilizando-se o software *Primer3* (v. 0.4.0, disponível em <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). As sequências do primer do gene referência (*rpl-32*) foi retirada do trabalho já submetido de Freitas et al. As sequências específicas dos *primers* de cada gene estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Sequências dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) utilizados nos experimentos da qPCR em tempo real.

Fonte: Da autora.

Nome do primer	Sequência		Amplicon (pb)	T _m
	Foward	Reverse		
<i>F.var_spz2</i>	5' - AATCATAAGGCCAGTCTGC - 3'	5' - TCTCTGTTGGATCCCGTTTT - 3'	145	58
<i>F.var_hex70b</i>	5' - TCACGATCATCCACCTTCA - 3'	5' - GCATGGTGGGGTAGTATCCA - 3'	189	58
<i>F.var_hex70c</i>	5' - CGTGCAAAAGTTCCTCTGGT - 3'	5' - CCCAGCTAGCCGTTTTGTAG - 3'	161	58
<i>F.var_hex110</i>	5' - CCGAACCAGGAACCTTCAAAA - 3'	5' - GCTGACTACATGGCTGTGGA - 3'	153	58
<i>F.var_amd</i>	5' - TCGACATTTGATGTCCGGTA - 3'	5' - TCTACACTGCACGCCTCAAC - 3'	153	58
<i>F.var_forked</i>	5' - TTCGTTCAAAAGACCGACCT - 3'	5' - TGGTCGACGAAATTCGAAAC - 3'	161	58
<i>F.var_amci</i>	5' - ATCCAGAGGCCAGTCACAAG - 3'	5' - CGCGAGTAAGAACACACTGG - 3'	177	58
<i>F.var_SPH41</i>	5' - CCCACAGCAAGACCATCAAT - 3'	5' - TTCCACCGTTCAATTCTCGT - 3'	196	58
<i>F.var_takeout</i>	5' - TCGTGATAGCAACGCCATAA - 3'	5' - CATGCGTCGTATGGTACCTG - 3'	170	58
<i>F.varia_rpl-32</i>	5' - CGTAGGCGTTTTAAGGGACA - 3'	5' - ACTCCGTGAGCAATCTCAGC - 3'	173	58

TIRAR A TEMPERATURA DA TABELA

4.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO GÊNICA

4.4.1 Extração de RNA total

COLOCAR O N AMOSTRAL. O RNA total das amostras de cérebro foi extraído de acordo com o protocolo de extração do reagente TRIzol® (Invitrogen): após o descongelamento das amostras armazenadas em -80°C, estas foram manualmente homogeneizadas e o volume total do reagente foi completado para 1000 µL. O material ficou em temperatura ambiente por cinco minutos, em seguida foram adicionados 200 µL de Clorofórmio e as amostras foram agitadas por cerca de 15 segundos. Após serem deixadas em temperatura ambiente por 3 minutos, houve centrifugação das amostras a 36.286 g por 15 minutos a 4°C. Finalizada a centrifugação, em cada tubo formaram-se três fases: uma com coloração avermelhada (proteína), outra aquosa (RNA) e uma fase intermediária (DNA). A fase aquosa foi transferida para novos tubos de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 500 µL de Álcool Isopropílico, e as amostras foram agitadas por inversão e deixadas *overnight* a -80°C. Depois da precipitação, as amostras foram descongeladas em gelo e centrifugadas a

36.286 g por 15 minutos a 4°C. Em sequência pode-se observar o RNA precipitado (*pellet*). O sobrenadante foi removido e o RNA lavado com 1 mL de Etanol 75%. Após a lavagem, o material foi centrifugado a 5.536 g por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o microtubo contendo o RNA foi colocado, com a tampa aberta, em Termobloco, por 10 minutos a 55°C, para a secagem do mesmo. O RNA foi redissolvido em 10 µL de água dietil pirocarbonato (DEPC) esterelizada. Os RNAs, então, foram quantificados em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), e assim foi determinado o volume da solução de RNA total usado para a síntese de cDNA com 1 µg de RNA total, para que todas as amostras tivessem a mesma quantidade de RNA inicial. Após esta etapa, foi feito o tratamento das amostras com DNase livre de RNase (Invitrogen, catálogo 18068-15, lote: 1123650): em um microtubo de 200 µL foram adicionados 1 µL de RNA, 1µL de Buffer (concentração), 1 µL de DNase e 1 µL de água DEPC, totalizando 4 µL. Estes tubos foram deixados em temperatura ambiente por 15 minutos; passado este tempo, foi adicionado em cada um deles 1 µL de 25 mM EDTA, e os microtubos foram colocados em termociclador a 65°C por 5 min. Estes tubos foram utilizados para a síntese de cDNA, descrito a seguir.

4.4.2 Ensaios de PCR convencional e de PCR em Tempo Real

Para cada uma das triplicatas das amostras biológicas de cérebros de rainhas e operárias das fases escolhidas utilizadas para determinar os níveis de transcrição de genes neurogênicos, foram coletados em média 30 cérebros. Os RNAs extraídos (conforme o protocolo do reagente Trizol) foram utilizados para as sínteses de cDNAs através da reação da transcriptase reversa: foram colocados 1 µL de Oligo dT (*Integrated DNA Technologies*, catálogo: 91425090; lote: 52079371) e 1 µL de água DEPC em cada microtubo de 200 µL reservado, da etapa anterior. As amostras foram aquecidas a 70°C no Termociclador (*Applied Biosystems*, Veriti 96 well – Thermal Cycler) por 5 minutos. Após o aquecimento, as amostras foram centrifugadas por cerca de 10 segundos em uma minicentrífuga, e depois foram deixadas em gelo até a solução da transcriptase reversa estar pronta.

Em outro microtubo foram colocados 4 µL de Buffer 5x (Promega, catálogo: A500C, lote: 0000063511), 3 µL de MgCl₂ (Promega; catálogo: A351H; lote: 0000072386), 1 µL de Inibidor de Ribonuclease Recombinante (*Applied Biosystems*: catálogo: N808-0119; lote: P11862), 1 µL de DNTP mix (Promega; catálogo: ED-13-12122; lote: 1003-2), 1 µL de *Transcriptase Reverse* (Promega, catálogo: A501C; lote: 0000063510) e 5 µL de água DEPC. O conteúdo da reação com transcriptase reversa foi adicionado ao primeiro tubo, contendo o

RNA tratado com DNase + oligoDT. As amostras foram incubadas em termociclador por 5 minutos, a 25°C, para o anelamento dos primers. A extensão da reação se deu por 50 minutos, a 42°C. A obtenção de cDNA deu-se após as amostras terem ficado por 15 minutos no termociclador a 70°C, para que ocorresse a inativação da reação.

Antes de qualquer análise, testamos os *primers* construídos para garantir sua ligação somente à região de interesse no genoma da *F. varia*. Os ensaios foram realizados em triplicatas técnicas através de PCR convencional (10 µL de Master Mix 2x – catálogo: 10572-152; lote: 175644; 7,4 µL de água de injeção; 0,8 µL de *primer forward* (COLOCAR CONCENTRAÇÃO) – diluído 1:10; 0,8 µL de *primer reverse* – diluído 1:10; 1 µL de cDNA), com a seguinte programação: 1 ciclo de 2 min a 94 °C; 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s na T_m (Temperature melting - 54 °C, 56 °C e 58 °C) de cada primer 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 1x (ácido bórico e NaOH); em cada microtubo obtido com o produto da amplificação foram adicionados 2 µL de *loading buffer* (25mg de azul de bromofenol + 25mg de xinelo cianol FF + 3,3mL de glicerol + 6,7mL de água destilada), e 0,5 µL de SYBR Green I (Sigma. Lote: 090M1158) diluído em Tris/Borato/EDTA (TBE). As bandas foram visualizadas através de um transiluminador UV. O gene da proteína ribossomal-L32 (*RpL-32*) foi utilizado como gene de referência para o controle das análises (FREITAS et al., submetido).

Após a eletroforese em gel de agarose, foram realizadas reações de RT-qPCR 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, com a finalidade de testar a eficiência de cada par de *primer*. Para cada um dos 9 genes, foram utilizados 5 µL do reagente SYBR® Green (MARCA), 0,4 µL do *primer forward*, 0,4 µL de *primer reverse* e 3,4 µL de água Milli-Q autoclavada. Além disso, realizamos as reações em diferentes concentrações de cDNA (1, 1:5, 1:5², 1:5³ e 1:5⁴) nas seguintes condições de PCR: 1 ciclo de 2 min a 50 °C, 1 ciclo de 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15s a 95 °C e 1 min na T_m e um ciclo final de 95 °C por 15s. Os níveis relativos de expressão foram calculados mediante o método do $\Delta\Delta C_t$ comparativo formulado por Pfaffl (2004). COLOCAR TEMPERATURA DE ANELAMENTO (58 GRAUS)

5 RESULTADOS

5.1 RAINHAS PRODUZIDAS ARTIFICIALMENTE

Ao final do experimento piloto para se determinar a quantidade de alimento larval adequada para que se desenvolva uma rainha, verificou-se que as larvas alimentadas com 30 μL e 40 μL apresentaram taxa de mortalidade mais elevada, porém a maioria das larvas sobreviventes tornaram-se operárias; poucas rainhas se desenvolveram com estes volumes de alimento larval (Tabela 3). MUDAR OVO PRA LARVA

Com o volume de 50 μL de alimento larval administrado as larvas tornaram-se rainhas, com características morfológicas típicas, como ausência de corbícula, maior tamanho do abdômen e cabeça reduzida em tamanho quando comparadas com operárias (CASTRO, comunicação pessoal). Além disso, realizou-se a dissecação dos ovários das rainhas recém emergidas (Re): a presença deste órgão nas abelhas transferidas (Figura 7) foi utilizado como marcador morfológico de rainhas em desenvolvimento, uma vez que em operárias na fase Pp já começam a ocorrer extensivos processos apoptóticos nos ovariolos (BOLELI et al., 1999). Desta forma, foi padronizada a quantidade de 50 μL de alimento para produção de rainhas *in vitro*.

Tabela 3 - Volume de alimento larval fornecido às larvas no mês de janeiro de 2018, com número de ovos transferidos e taxas de nascimento de rainhas e operárias de *F. varia*.

Fonte: Da autora.

	Volume de alimento larval (μL)	Nº. larvas transferidas	Rainhas emergidas		Operárias emergidas	
			Número	%	Número	%
Jan/18	30	15	2	28,5	5	71,43
	40	15	1	16,7	5	83,3
	50	15	14	93,3	0	0

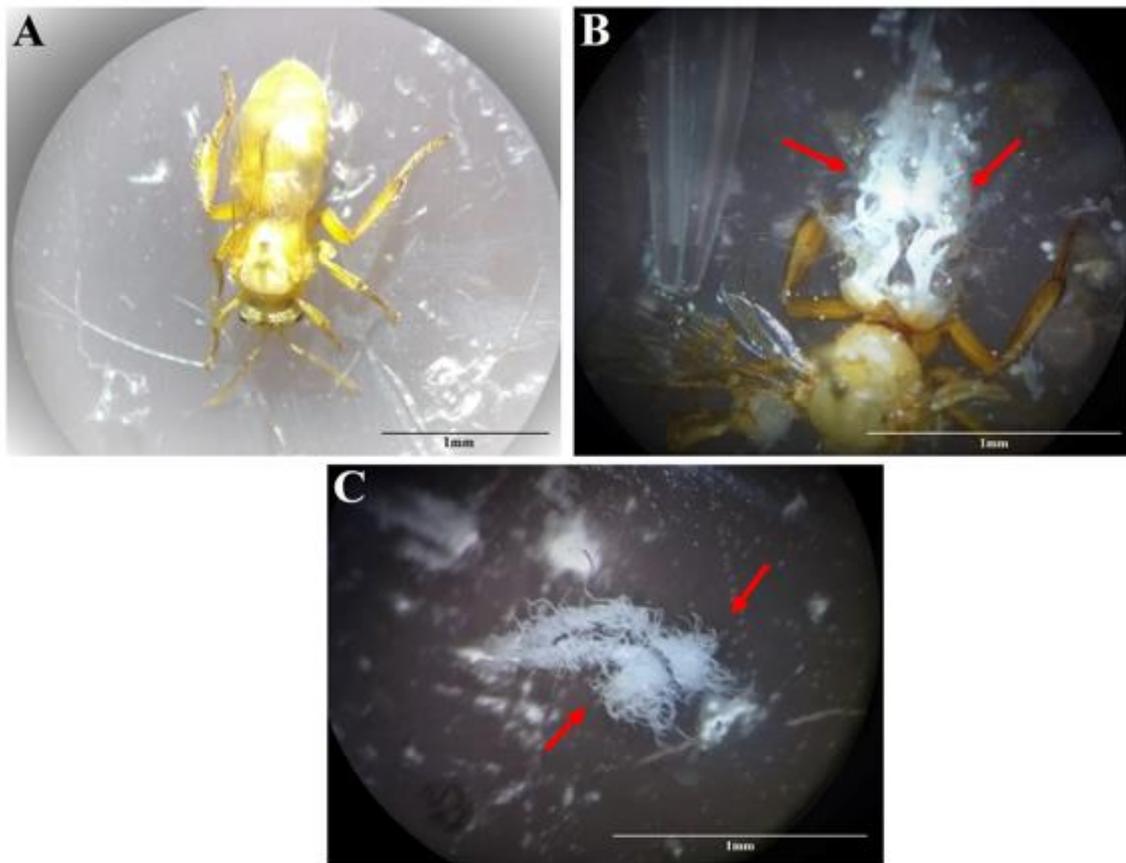


Figura 7 - Abelhas recém-emergidas, resultado das transferências larvais utilizando-se 50 μ L de alimento. Estas abelhas se desenvolveram em rainhas. A = rainha RE (aumento de 20x) em uma placa de disseção de parafina observada em uma lupa; B = rainha RE (aumento de 30x) com o abdômen aberto. As setas indicam o par de ovários presentes, envolvidos por traqueia; C = par de ovários (aumento de 30x) dissecados indicados pelas setas, imerso em solução salina (NaOH 0,9%). Escala de 1 mm.

Fonte: Da autora.

5.2 ANÁLISES MORFOLÓGICAS DOS CÉREBROS DE ABELHAS *Frieseomelitta varia*

Com o objetivo de determinar se existe diferença no volume total dos cérebros de abelhas *F. varia*, 5 cérebros de cada fase foram dissecados, incluídos em historesina e corados (Figura 8) para análise microscópica (total de 30 cérebros).

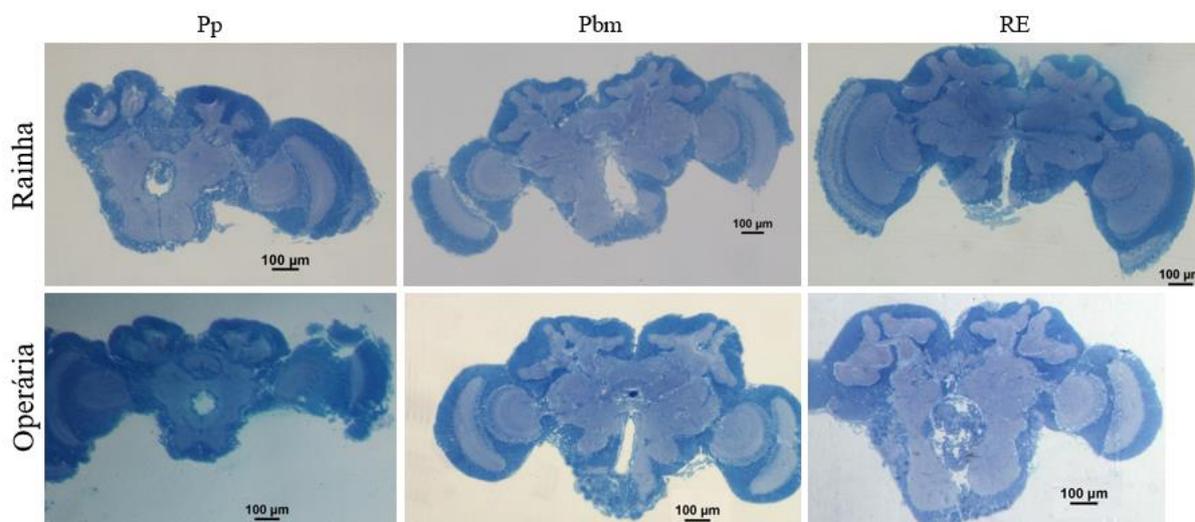


Figura 8 - Cérebro de rainha e operária na fase Pp, Pbm e Re. Tecido incluído em historesina e corado com Azul de metileno, Fuccina básica e Tetraborato de sódio. Aumento de 4x, escala = 100µm. MELHORAR PRA PUBLICAÇÃO

Fonte: Da autora.

De acordo com as análises morfométricas realizadas é possível verificar que o volume total do cérebro na fase pupal Pp é menor quando comparado com as demais fases analisadas, em ambas as castas. Conforme o desenvolvimento avança, nota-se que os cérebros de rainhas se tornam progressivamente maiores, mostrando diferença estatística significativa entre rainhas e operárias em Pbm. Porém, em abelhas recém-emergidas, o volume cerebral de operárias aumenta significativamente, à medida que o de rainhas diminui, havendo, portanto, uma inversão deste padrão de desenvolvimento em abelhas adultas em favor das operárias (Figura 9).

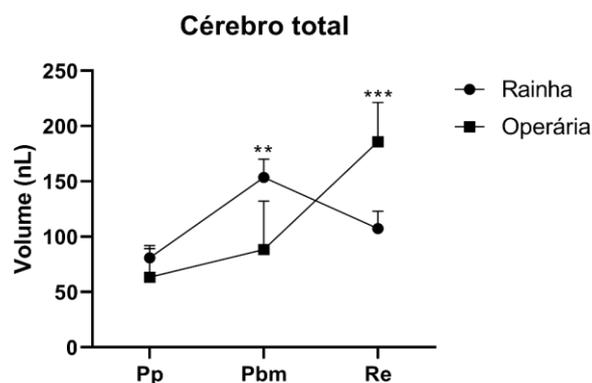


Figura 9 - Volume total do cérebro de rainhas e operárias de *F. varia* em desenvolvimento, incluídos em historesina, cortados com espessura de 5 μ m e analisados em microscópio. O eixo X representa as fases do desenvolvimento, onde Pp= olho rosa, corpo sem pigmentação; Pbm= olho marrom; corpo com apêndices medianamente pigmentados; Re= recém-emergidas, com tórax e abdômen claros. O eixo Y corresponde às medidas realizadas de volume total, em nL. N = 5. Valores expressos como média \pm EPM. ANOVA *two way*, seguida de pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ %.
Fonte: Da autora.

A medição das dimensões dos corpos cogumelares (CC) e corpos pedunculares (CPs) também foi de nosso interesse. Com relação aos CCs, que compreendem o pedúnculo, os cálices e a região onde se encontram as células de Kenyon, foi verificado que não houve diferença estatística significativa dos corpos cogumelares direito (CCD, Figura 10, A) entre rainhas e operárias; porém, após a fase Pbm, percebe-se uma diminuição do volume dos corpos cogumelares esquerdo (CCE) em rainhas, que se estende até a fase Re, onde o volume dos CCE de operárias se mostram maiores em volume, como mostra a figura 10, B.

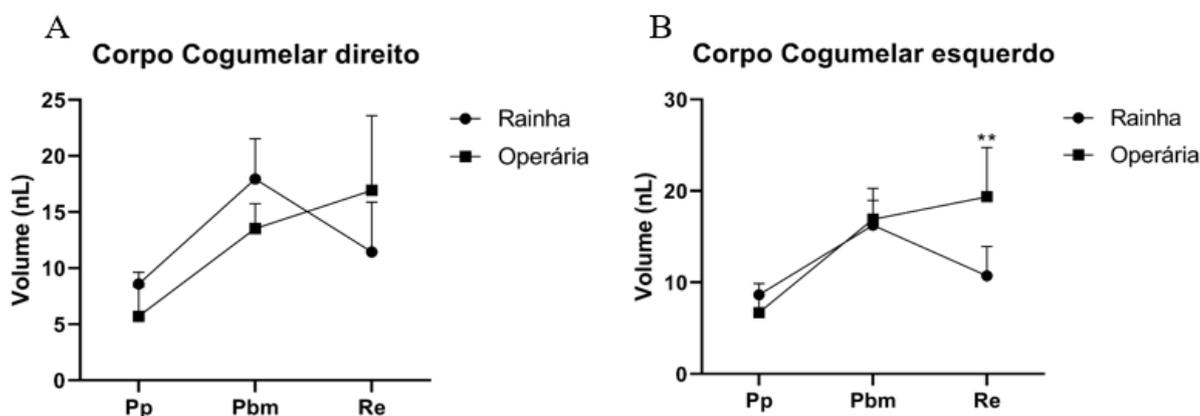


Figura 10 - Desenvolvimento dos corpos cogumelares dos hemisférios esquerdo e direito de operárias e rainhas de abelhas *F. varia*. O tecido foi incluído em historesina, cortado com espessura de 5 μ m e analisado em microscópio. O eixo X corresponde aos estágios do desenvolvimento, onde Pp= olho rosa, corpo sem pigmentação; Pbm= olho marrom; corpo com apêndices medianamente pigmentados; Re= recém-emergidas, com tórax e abdômen claros. O eixo Y corresponde às medidas dos volumes dos corpos cogumelares direito (A) e dos corpos cogumelares esquerdo (B). N=5. Valores expressos como média \pm EPM. ANOVA *two way*, seguida de pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$ %.
Fonte: Da autora.

A morfometria dos corpos pedunculares (CPs), compostos pelos pedúnculos α e β e pelos cálices, mostrou que os corpos pedunculares direitos (CPD) e os corpos pedunculares esquerdos (CPE) apresentam volumes semelhantes em Pp e Pbm de rainhas e operárias. Os pedúnculos do hemisfério direito não apresentaram diferença significativa (Figura 11, A). Os CPEs possuem valores consideravelmente maiores em operárias recém-emergidas, com nível de significância indicado na figura 11, B.

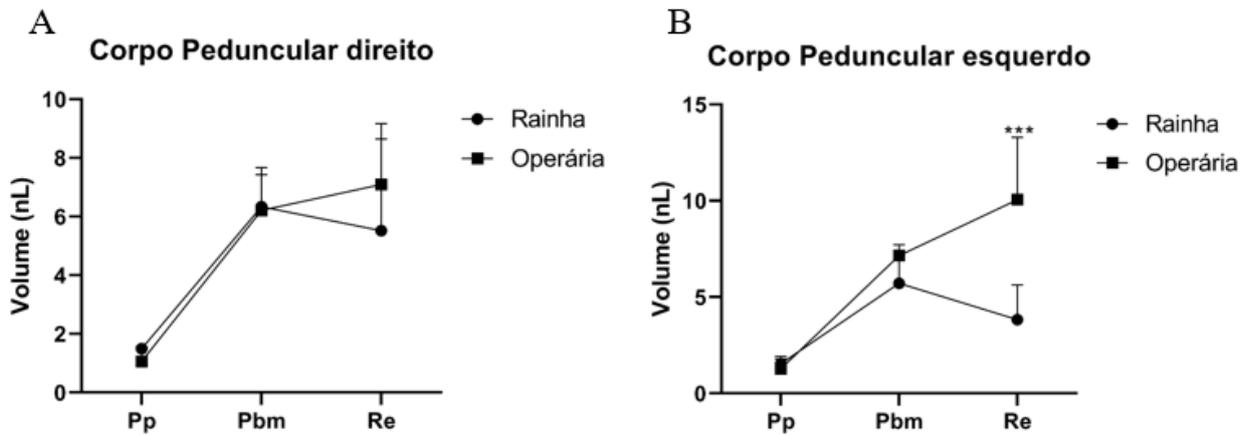


Figura 11 - Desenvolvimento dos corpos pedunculares dos hemisférios direito (A) e esquerdo (B) em operárias e rainhas de abelhas *F. varia*. O tecido foi incluído em historesina, cortado com espessura de 5 μ m e analisado em microscópio. O eixo X representa as fases pupais e adulto-farato utilizadas, onde Pp= olho rosa, corpo sem pigmentação; Pbm= olho marrom; corpo com apêndices medianamente pigmentados; RE= recém-emergidas, com tórax e abdômen claros, enquanto que o eixo Y representa as medidas de volume dos corpos pedunculares. N=5. Valores expressos como média \pm EPM. ANOVA *two way*, seguida de pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001\%$.

Fonte: Da autora.

Também foram realizadas análises sobre a relação do volume das neurópilas com o volume total do cérebro para verificar se ocorre assimetria durante o desenvolvimento cujos resultados estão apresentados na figura 12. Primeiramente, os dados brutos de CCD e CGE foram somados, assim como os dados de CPD e CPE. Seguidamente, estes valores foram divididos pelo volume total do cérebro. Em operárias (Figura 12, A e B), assim como em rainhas (Figura 12, C e D), não encontramos diferenças significativas de tamanho entre as neurópilas esquerda e direita. Pode-se dizer, desta forma, que em *F. varia* não ocorre assimetria dos CCs e CPs durante a neurogênese, uma vez que eles são semelhantes em tamanho em todas as fases do desenvolvimento analisadas.

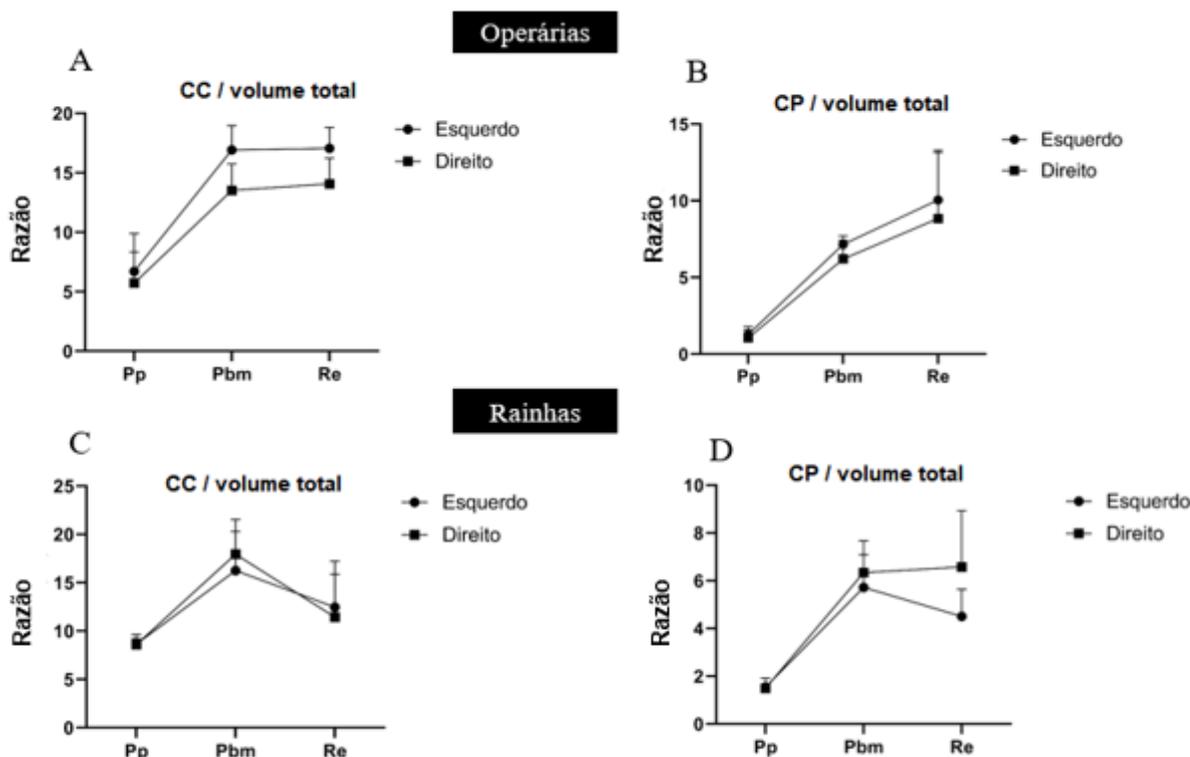


Figura 12 - Volume dos corpos cogumelares (A e C) e corpos pedunculares (B e D) dos hemisférios esquerdo e direito em operárias e rainhas de *F. varia* com relação ao volume do cérebro total. O tecido foi dissecado e incluído em historesina, cortado com espessura de 5 μ m e analisado em microscópio. O eixo X representa os estágios de desenvolvimento estudados; o eixo Y simboliza a razão dos CCs e CPs/volume total do cérebro. N = 5. Valores expressos como média \pm EPM. ANOVA *two way*, seguida de pós-teste de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

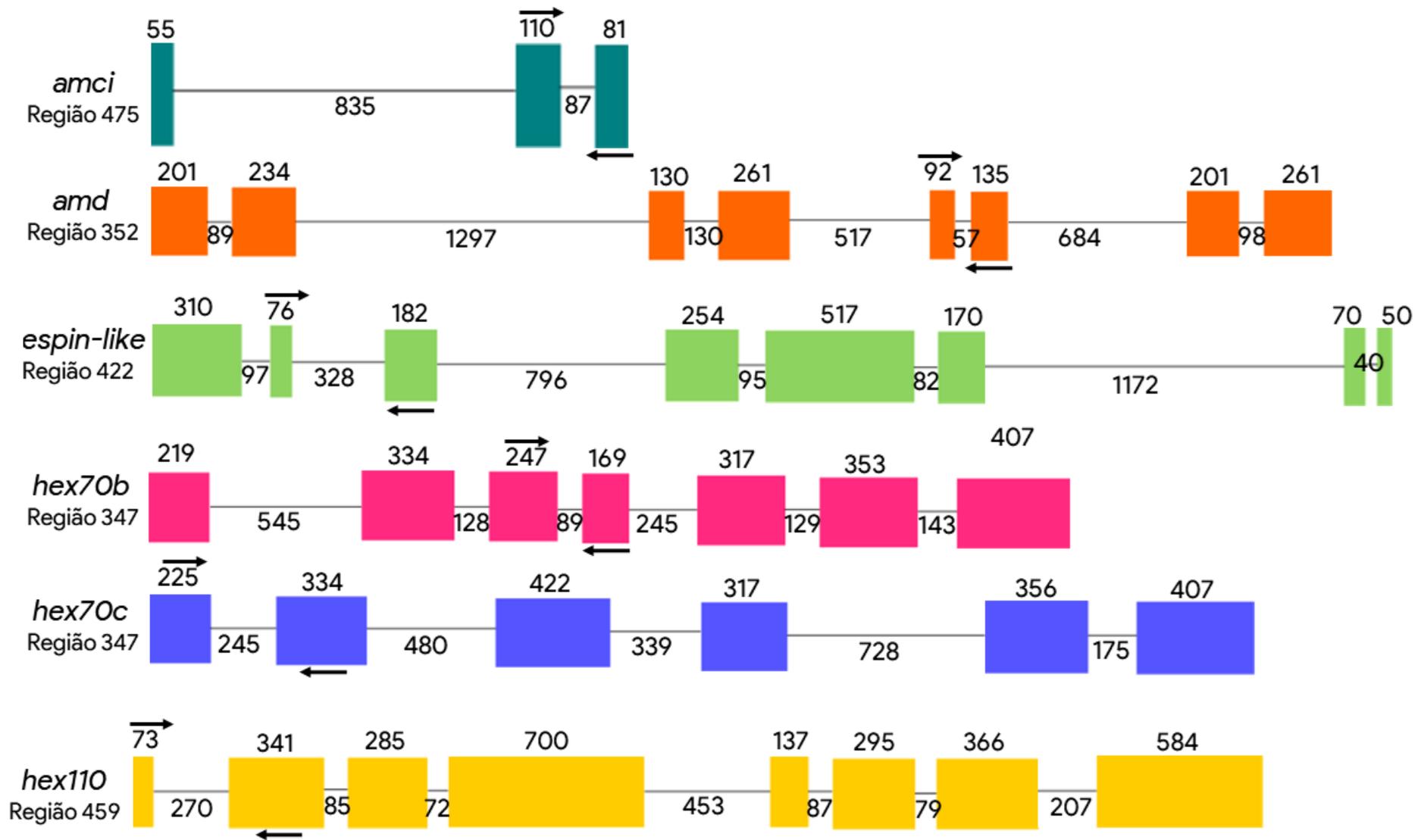
5.3 ANÁLISES DE CONSERVAÇÃO DOS GENES ENTRE AS ESPÉCIES

5.3.1 Organização gênica

Com o genoma de *F. varia* disponível na plataforma LBDA BLAST Server, foi possível realizar a anotação de cada um dos nove genes neurogênicos selecionados para o estudo e do gene usado como referência nos ensaios de RT-qPCR, o *rpl32*. Este processo 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). O genoma de *F. varia* foi dividido por regiões, e não por cromossomos, porque o *draft* disponível ainda é uma predição. O gene *amci* pertence à região 475; o *amd* à região 352; *espin-like* se encontra na região 422; *hex110* se localiza na região

459; *hex70b* e *hex70c* se encontram na mesma região, que é a 347; o gene *SPH41* pertence à região 727; o *spz2* à região 152; o gene *takeout* está localizado na região 857; e por fim o gene de controle endógeno *rpl32*, que se encontra na região 280.

Para anotar os genes, foram recuperados arquivos no formato FASTA contendo a região em que cada gene está localizado. Nesses arquivos estão as sequências de nucleotídeos correspondentes a cada região. Recuperamos também arquivos no formato *gff*, os quais contêm as sequências em nucleotídeos para cada gene estudado. Estas foram utilizadas para anotar os genes dentro das suas respectivas regiões. A anotação gênica foi realizada a partir das plataformas *Artemis 7.0*. A figura 13 ilustra a organização gênica dos genes selecionados baseando-se na sequência total de seus transcritos. COLOCAR NA METODOLOGIA



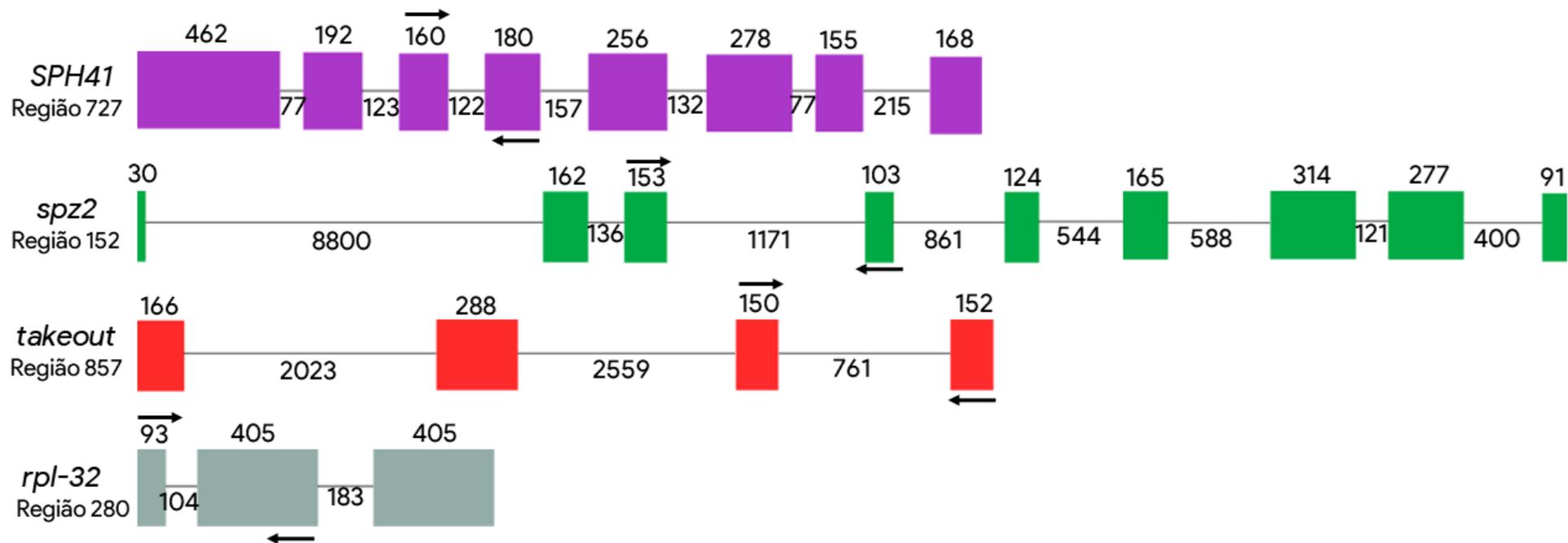


Figura 13 - Estrutura dos 9 genes relacionados à neurogênese selecionados e do *rpl-32*. A estrutura gênica ilustra o tamanho total dos transcritos de cada *gene* no sentido 5' - 3'. Os éxons estão representados por retângulos preenchidos com cores. Os íntrons estão representados pelas linhas em preto que unem os éxons. Os comprimentos dos retângulos e linhas são proporcionais aos números de bases correspondentes a cada éxon ou íntron. As setas mostram a localização dos *primers forward* (acima) e *reverse* (abaixo) elaborados para cada gene e utilizados nos ensaios de PCR.

Fonte: Da autora.

Resumidamente, quase todos os genes selecionados são relativamente curtos, com comprimentos que vão desde 1.168 pb (*amci*, por exemplo) até 14.040 pb (*spatzle2*). Um deles, o *takeout*, possui um tamanho intermédio, que é 6.099 pb. O gene *spatzle2* é o maior de todos, com seu primeiro íntron apresentando 8.800 nucleotídeos. O número de íntrons e éxons é, na verdade, variável, sendo novamente o *spz2* o gene que contém maior número destas regiões (8 íntrons e 9 éxons), enquanto que o *amci* conta com 2 íntrons e 3 éxons em sua estrutura. O gene usado como controle em nossos experimentos de quantificação de níveis de transcrição, *rpL32*, possui 3 éxons e 2 íntrons, com uma similaridade de 98% com seu homólogo de *A. mellifera*, indicando que este é um gene muito conservado entre as espécies.

Os *primers* relativos a cada gene estão indicados pelas setas acima de cada éxon, sendo: *primer amci*: desenhado entre os éxons 1 e 2; *primer amd*: entre os éxons 5 e 6; *primer espin-like*: entre os éxons 2 e 3; *primer Hex110*: entre os éxons 1 e 2; *primer Hex70b*: entre os éxons 3 e 4; *primer Hex70c*: entre os éxons 1 e 2; *primer SPH41*: entre os éxons 3 e 4; *primer spz2*: entre os éxons 3 e 4; *primer takeout*: entre os éxons 3 e 4.

5.3.2 Análises comparativas das sequências nucleotídicas dos transcritos de *F. varia*

Selecionamos as espécies de abelhas *A. mellifera* e *Melipona quadrifasciata*, a mosca *D. melanogaster* e *Homo sapiens* com o intuito de comparar os produtos proteicos dos homólogos dos nove genes destas espécies com os de *F. varia* e caracterizá-los, de acordo com ferramentas de bioinformática. Escolhemos *A. mellifera*, *M. quadrifasciata* e *D. melanogaster* por se tratarem de espécies de insetos holometábolos que já possuem sequenciamento genômico bem estabelecido, e são amplamente utilizados em estudos sobre neurogênese. A espécie *H. sapiens* foi de nosso interesse pelo fato de já existirem pesquisas que relatam homologia entre alguns genes de abelhas com o homem (SCHATTON et al., 2018), o qual tem relevância biomédica. Ademais, a comparação nos permitiria uma referência de uma espécie de vertebrado que, comprovadamente, suporta a hipótese do cérebro social. A análise foi um alinhamento local, que consiste no alinhamento de regiões de alta similaridade, e não ao longo de toda a extensão da sequência.

Utilizou-se a ferramenta BLASTp, disponível na base mundial de dados NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para realizar análises de alinhamentos, o que nos permitiria encontrar o ortólogo de *A. mellifera*, *D. melanogaster*, e *H. sapiens*, e estudar as possíveis funções destes genes através do que já está relatado na literatura. Este programa

compara sequências de proteínas a bancos de dados de sequências e calcula a significância estatística das combinações. A tabela 4 indica o gene ortólogo, proteína ortóloga, e valores de E (*E-value*), sendo este último um valor estatístico que indica se o alinhamento é real ou foi obtido ao acaso (logo quanto menor *E-value* ou quanto mais próximo de zero, menores as chances do resultado ser consequência do acaso).

Observando-se a tabela abaixo, é possível notar que a maioria dos 9 genes se encontram bem conservados entre as espécies *F. varia* e *A. mellifera*, com *E-values* próximos de zero. Os genes *amd*, *hex110*, *hex70b* e *spz2* apresentam *E-values* iguais a zero, indicando que estes são os genes que mais se encontram conservados entre as espécies. Quando comparados com *M. quadrifasciata*, 7 dos 9 genes analisados mostraram *E-values* altamente significativos (igual a zero), sendo eles: *amd*, *espin-like*, *hex110*, *hex70b*, *SPH41*, *spz2* e *takeout*. Este resultado indica que muito provavelmente estes genes desempenham a mesma função nos dois organismos.

Em *D. melanogaster*, os produtos proteicos mostraram que todos os genes possuem baixos *E-value*, sendo o *amd* o único gene com valor igual a zero; a mosca também não apresenta a *hex70c* em seu genoma. Apesar disso, é possível dizer que *F. varia* e *D. melanogaster* compartilham genes que são bem preservados entre as espécies. Nossas análises também nos indicam que *H. sapiens* não possui as proteínas *hex70b*, *espin-like*, *spz2* e *takeout* em seu genoma. Os demais genes mostram altos *E-value*, sendo, portanto, proteínas com sequências distintas entre *F. varia* e *H. sapiens*. O gene *amd* foi o único que apresentou *E-value* igual a zero.

De forma resumida, esta análise nos indicou que as espécies *F. varia*, *A. mellifera*, *M. quadrifasciata* e *D. melanogaster* possuem proteínas de funções similares, ou que existem motivos ou domínios conservados que estão presentes nestas proteínas de funções variadas; o mesmo não foi observado em *H. sapiens*. Além do mais, o gene *amd* mostrou *E-value* igual a zero em todas as espécies, podendo-se dizer que a *amd* é a proteína mais conservada (e provavelmente de mesma função) entre todos os organismos analisados.

Tabela 4 – Resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos (BLASTp) dos genes de *F. varia* com *A. mellifera*, *M. quadrifasciata*, *D. melanogaster* e *H. sapiens*, com suas respectivas proteínas ortólogas, identificação (ID) e *E-value*.

Fonte: Da autora.

Proteína (<i>F. varia</i>)	Scaffold	ID – <i>A. mellifera</i>	E-value	ID - <i>M. quadrifasciata</i>	E-value	ID – <i>D. melanogaster</i>	E-value	ID – <i>H. sapiens</i>	E-value
<i>Amci</i>	475	GB50116 (<i>chymotrypsin inhibitor</i>)	7e-31	KOX80259.1 (<i>chymotrypsin inhibitor</i>)	9e-41	CG6456 (<i>myoinhibiting peptide precursor</i>)	2e-05	AZL49144 (<i>mucin 6</i>)	27e-04
<i>Amd</i>	352	GB45938 (<i>alpha- methildopa hypersensitive protein</i>)	0.0	KOX75704.1 (<i>alpha- methyldopa hypersensitive protein</i>)	0.0	CG10501 (<i>alpha- methildopa- resistant</i>)	0.0	NP_000781.1 (<i>aromatic-L- aminoacid decarboxylase</i>)	0.0
<i>Espin-like</i>	422	LOC409402 (uncharacterized)	6e-156	KOX80036.1 (hypothetical protein WN51_06450)	0.0	CG42864 (<i>forked</i>)	2e-17	--	--
<i>Hex110</i>	459	GB44996 (<i>hexamerin110</i>)	0.0	KOX79856.1 (<i>sex-specific storage- protein 2</i>)	0.0	CG6821 (<i>larval serum protein Igamma</i>)	2e-37	CAI19411.1 (<i>vacuolar protein sorting 13 homolog D</i>)	5.1

Hex70b	347	GB10869 (<i>hexamerin 70b precursor</i>)	0.0	KOX67353.1 (<i>hexamerin, partial</i>)	0.0	CG6806 (<i>larval serum protein 2</i>)	5e-112	--	--
Hex70c	347	GB51696 (<i>hexamerin 70c precursor</i>)	1e-30	KOX67352.1 (<i>arylphorin subunit alpha</i>)	4e-36	--	--	XP_024304430.1 (<i>uncharacterized protein C11orf95 isoform XI</i>)	5.4
SPH41	727	GB49946 (<i>masquerade</i>)	1e-64	KOX79829.1 (<i>plasma kallikrein</i>)	0.0	CG15002 (<i>masquerade</i>)	1e-07	5TJX_A (<i>chain A, plasma kallikrein</i>)	2e-45
Spatzle2	152	GB40604 (<i>neurotrophin-1</i>)	0.0	KOX69952.1 (<i>hypothetical protein WN51_04467</i>)	0.0	CG42576 (<i>neurotrophin-1</i>)	5e-56	--	--
Takeout	857	GB42799 (<i>takeout</i>)	2e-173	KOX71718.1 (<i>takeout</i>)	0.0	CG2016 (<i>uncharacterized protein</i>)	5e-85	--	--

Realizamos também o alinhamento global com o intuito de comparar as sequências de aminoácidos ao longo de toda a extensão da sequência, de *F. varia* com *A. mellifera* e *Melipona quadrifasciata*, estabelecendo o nível de similaridade entre elas (homologia) em colaboração com Nunes (comunicação pessoal). Desta forma, foi possível determinar alguns parâmetros, como, por exemplo, o número de aminoácidos de cada proteína, bem como *scores* (pontuação do alinhamento ótimo), que nos indica o quanto o alinhamento tem posições similares/idênticas levando-se em conta matches, mismatches e gaps (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados de alinhamento global realizado entre *F. varia*, *A. mellifera* e *M. quadrifasciata*, indicando quantidade de aminoácidos (aa) de cada sequência e valores de score.

Fonte: Da autora.

Gene	Aminoácidos (<i>F. varia</i>)	Aminoácidos (<i>A. mellifera</i>)	Aminoácidos (<i>M. quadrifasciata</i>)	Score - <i>F. varia</i> x <i>A. mellifera</i>	Score - <i>F. varia</i> x <i>M. quadrifasciata</i>
<i>Amci</i>	81	85	81	61	75
<i>Amd</i>	500	539	498	83	91
<i>Espin-like</i>	542	787	731	57	78
<i>Hex110</i>	926	1010	855	68	78
<i>Hex70b</i>	681	683	686	72	93
<i>Hex70c</i>	686	686	755	73	89
<i>SPH41</i>	769	774	731	57	78
<i>Spz2</i>	526	573	573	73	87
<i>Takeout</i>	251	251	251	92	98

Nossos resultados mostraram que as 9 sequências proteicas possuem *score* maior entre *F. varia* e *M. quadrifasciata* quando comparadas a *F. varia* e *A. mellifera*, indicando que estes transcritos são mais similares entre as espécies sem ferrão, e, portanto, mais conservadas. O gene *takeout* possui o mesmo número de aminoácidos (251 aa) entre as três espécies, e é o gene com maior similaridade entre *F. varia* e *M. quadrifasciata* e *F. varia* e *A. mellifera* (score = 98 e 92, respectivamente). A *hex110* é o gene que possui maior quantidade de aminoácidos nas três espécies, sendo 1010 aa presentes em *A. mellifera*, 926 aa em *F. varia* e 455 aa em *M. quadrifasciata*. Além disso, através da ferramenta COBALT (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?CMD=Web>) foi possível realizar um alinhamento múltiplo das sequências, que, quando comparadas, são incorporadas em um

único alinhamento múltiplo progressivo (PAPADOPOULOS; AGARWALA, 2007); estes resultados estão no Anexo, em vermelho.

5.4 TESTE DE *PRIMERS* POR PCR CONVENCIONAL E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Com o objetivo de determinar os níveis de transcrição dos nove genes neurogênicos aqui estudados, realizamos testes de temperatura de pareamento dos *primers* específicos por meio de PCR convencional. Foram testadas as temperaturas de 54°C, 56°C e 58°C e posteriormente utilizou-se a eletroforese em gel de agarose 3% para visualização dos resultados. O cDNA para estas análises foi obtido do corpo inteiro de operárias recém emergidas. EXPLCIAR PQ DECIDI USAR REAL TIME

As primeiras colunas da figura a seguir (Figura 14) correspondem ao marcador de tamanho molecular. Foi observado um padrão claro e único de bandas para o gene *amci*, sendo esperado um tamanho de *amplicon* de 177 pb; porém, a banda obtida se encontra em ~300 pb, o que pode ser explicado pelo fato de que a anotação gênica dos genes neurogênicos é uma predição, podendo haver alguns erros mínimos que explicam este tamanho de *amplicon* não condizente. Neste caso, é apropriado que façamos o sequenciamento destes fragmentos. O mesmo ocorreu com os genes *hex70b* (*amplicon* = 189 pb; no gel = ~200 pb) e *SPH41* (*amplicon* = 196 pb; no gel = ~250pb). Para os genes *amd* (153 pb), *espin-like* (161 pb), *hex70c* (161 pb), *spz2* (145 pb), e *takeout* (170 pb), as bandas obtidas possuíam o tamanho esperado. A *hex110* (153 pb) apresentou uma segunda banda, indicando que talvez possa existir uma isoforma deste gene no nosso modelo de estudo *F. varia*. Para confirmar se isto é verdadeiro, é preciso realizar uma análise de sequenciamento da mesma. FALAR DO TAMANHO DO AMPLICON DIFERENTE

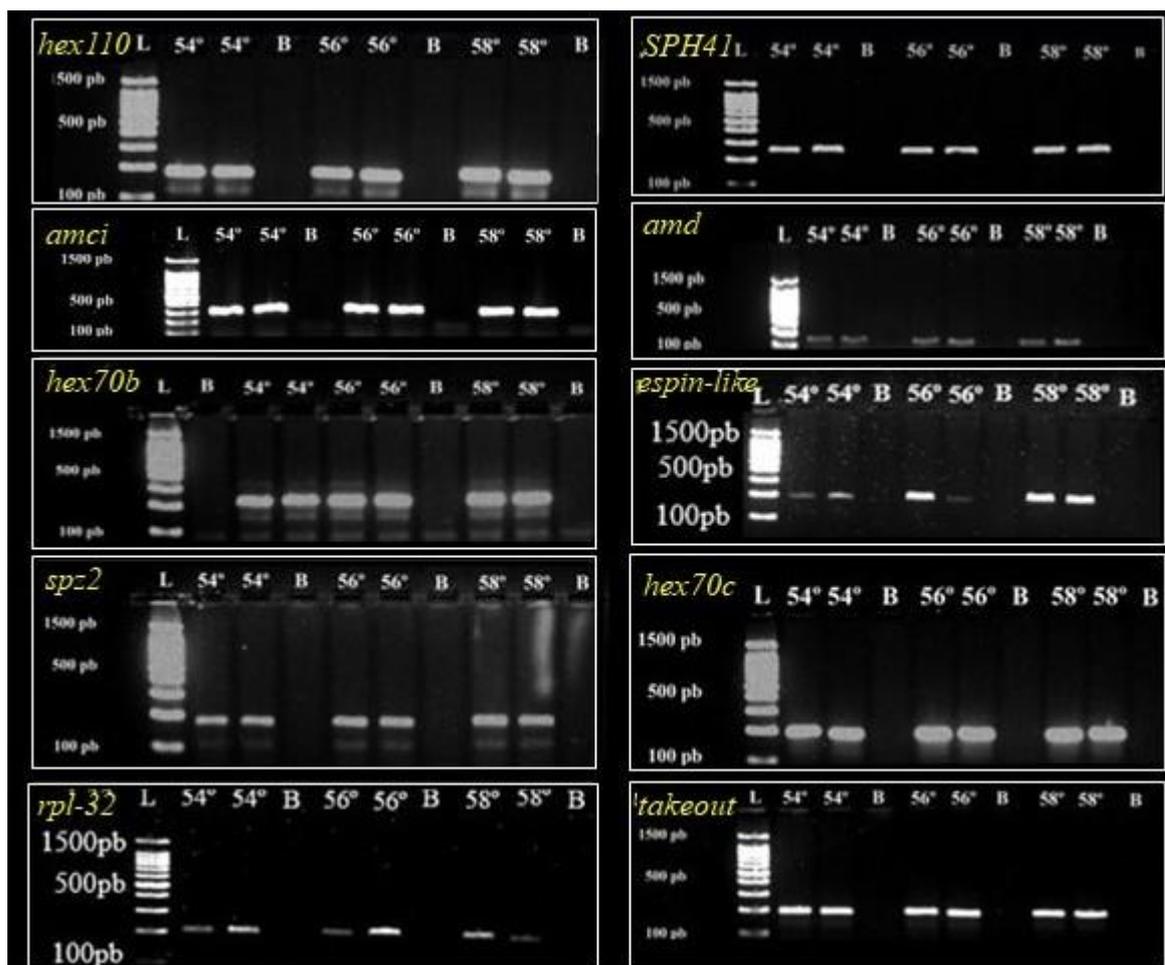


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 3% de produtos de amplificação de fragmentos de cDNA dos 9 genes neurogênicos estudados. O DNA complementar foi sintetizado a partir de RNA total de corpo inteiro de operárias. L – Ladder; B – controle (ausência de cDNA). Ciclos de qPCR = 40; tempo de corrida = 60 minutos; quantidade de material em cada poço = 20 μ L (amostras com 0,5 μ L de SYBR Green I e 2 μ L de *loading buffer*).

Fonte: Da autora.

5.5 TESTE DE EFICIÊNCIA DE *PRIMERS* PARA qPCR

Para a aplicação de RT-qPCR nos experimentos de quantificação de níveis de transcrição, primeiramente testamos se os *primers* desenhados possuíam eficiência comparável (Figura 15). A partir da amplificação dos 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 de amplificação dos primers (E; valor aceito: de 90 a 110%) 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^2 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^2 está próximo do valor 1, mais adequado. De acordo com os dados obtidos, todos os *primers* possuem valores de slope, R^2 e eficiência dentro do padrão aceitável, conforme mostra a tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros obtidos da curva de eficiência para cada um dos genes selecionados.

Fonte: Da autora.

Gene	Slope	R²	Eff. (%)
<i>Hex110</i>	3,155	0,991	107,471
<i>Hex70b</i>	3,287	0,989	101,474
<i>Hex70c</i>	3,185	0,998	106,031
<i>Amd</i>	3,507	0,998	92,827
<i>Amci</i>	3,086	0,997	110,879
<i>Takeout</i>	3,216	0,997	104,614
<i>Spz2</i>	3,402	0,983	96,768
<i>SPH41</i>	3,284	0,986	101,586
<i>Espin-like</i>	3,179	0,985	106,350

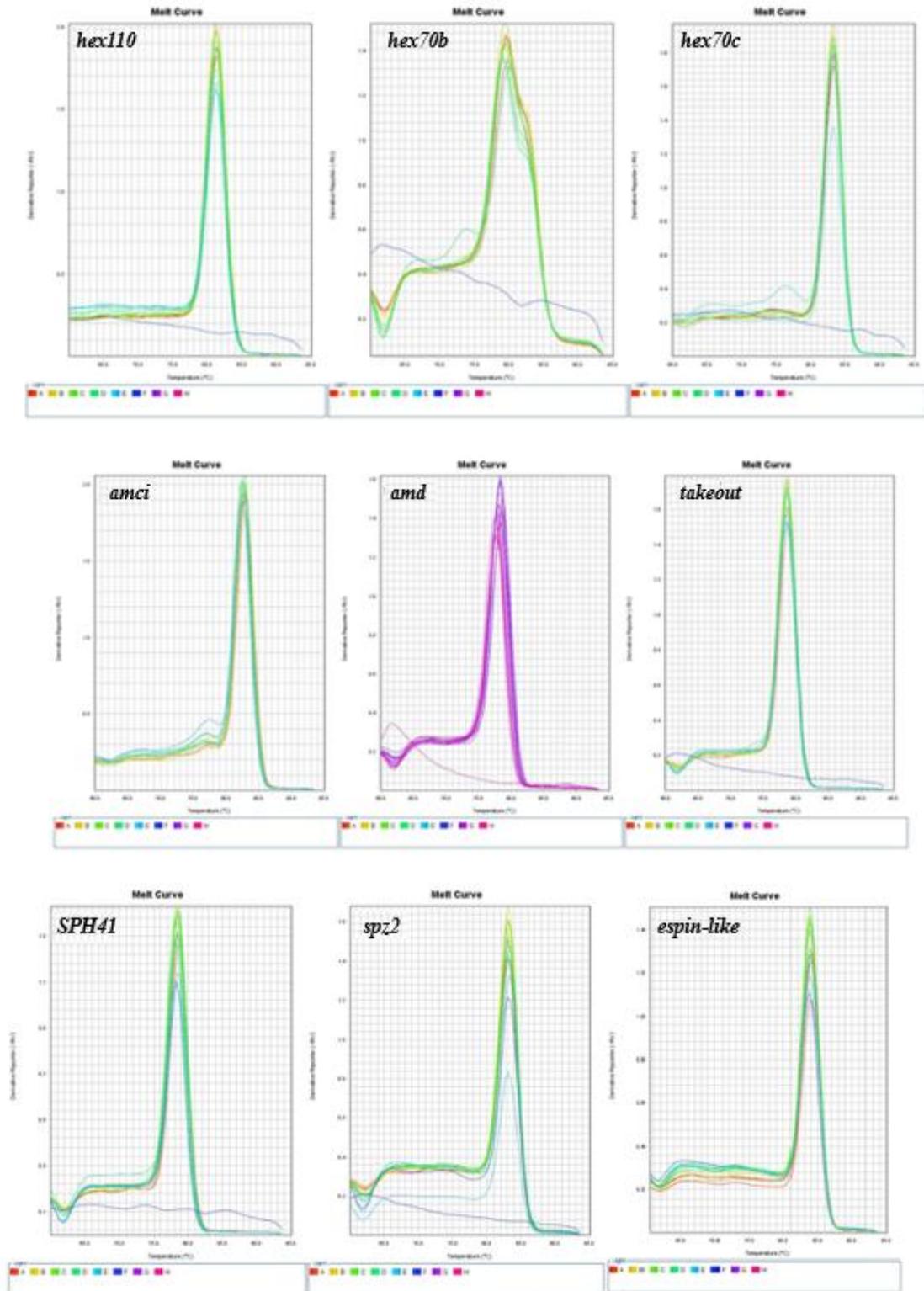


Figura 15 - Curvas de *melting* dos nove genes neurogênicos escolhidos. Todas as curvas apresentaram um único pico, mostrando que o pares de *primers* utilizados possuem amplificação específica: gene *hex110*, com temperatura DE MELTING = 81°C; gene *hex70b*, com temperatura = 79°C; gene *hex70c*, com temperatura = 83°C; gene *amci*, com temperatura = 83°C; gene *amd*, com temperatura = 79°C; gene *takeout*, com temperatura = 79°C; gene *SPH41*, com temperatura = 78°C; gene *spz2*, com temperatura = 78°C; I: gene *espin-like*, com temperatura = 84°C.

Fonte: Da autora.

5.6 AS HEXAMERINAS 110, 70b E 70c SÃO EXPRESSAS EM CÉREBROS DE *F. varia*

Os experimentos de RT-qPCR nos permitiram primeiramente mostrar que os genes *hex110*, *hex70b* e *hex70c* são expressos no cérebro de rainhas e operárias de *F. varia*. De maneira geral, os perfis de expressão se repetem, onde em Pp os níveis de transcritos são mais elevados em operárias; desta fase adiante, este nível cai na casta trabalhadora, enquanto que em rainhas sobem. Ademais, analisando-se o gráfico de transcrição relativa de acordo com a fase de desenvolvimento (Figura 16) é possível notar que na fase inicial do desenvolvimento pupal (Pp) a hexamerina 110 não mostra diferença estatística entre rainhas e operárias, seguindo assim até a fase Pbm e Re. Já a *hex70b* e a *hex70c* se encontram mais expressos no cérebro de operárias na fase Pp, com diferença estatística significativa. Em Pbm e Re não há diferença significativa nos níveis de transcritos, ou seja, estatisticamente tanto a *hex70b* quanto a *hex70c* possuem expressão semelhante nas duas castas de *F. varia*.

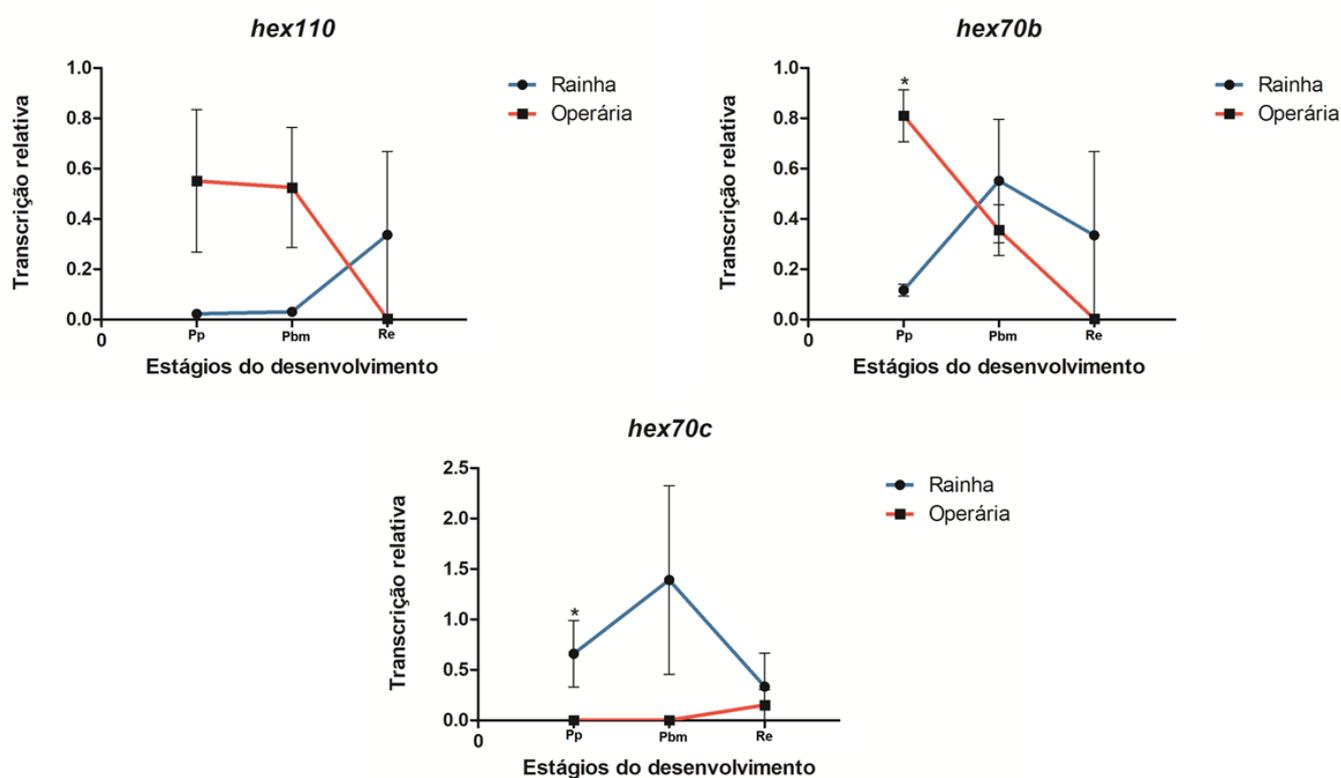


Figura 16 - Níveis relativos de expressão de *hex110*, *hex70b* e *hex70c* obtidos mediante PCR Tempo real em diferentes estágios pupais em castas de *F. varia*. O eixo X representa os estágios do desenvolvimento analisados (para detalhes, ver Tabela 1). O eixo Y representa a quantidade de expressão relativa do mRNA das três hexamerinas em relação ao gene referência *rpl-32* (médias e erros de 2^{-ΔΔC_T}). Triplicatas técnicas e biológicas. Valores expressos como média ± EPM. ANOVA *two way*, seguida de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05\%$. Fonte: Da autora.

5.7 DEMAIS GENES ANALISADOS

Nossas análises acerca dos genes *amd*, *espin-like* e *SPH41*, genes estes relacionados à atividade neuronal, estão resumidas na figura 17. Pode-se observar que todos eles possuem perfis de transcrição relativa praticamente iguais, onde em Pp os níveis de transcritos são menores em operárias. Ainda em operária, em Pbm, os transcritos de *amd*, *espin-like* e *SPH41* aumentam, e voltam a cair em Re; em rainhas acontece o inverso. Porém, não houve diferenças significantes entre rainhas e operárias no teste estatístico em nenhuma das fases analisadas. Mesmo assim, a transcrição destes três genes é semelhante em ambas as castas.

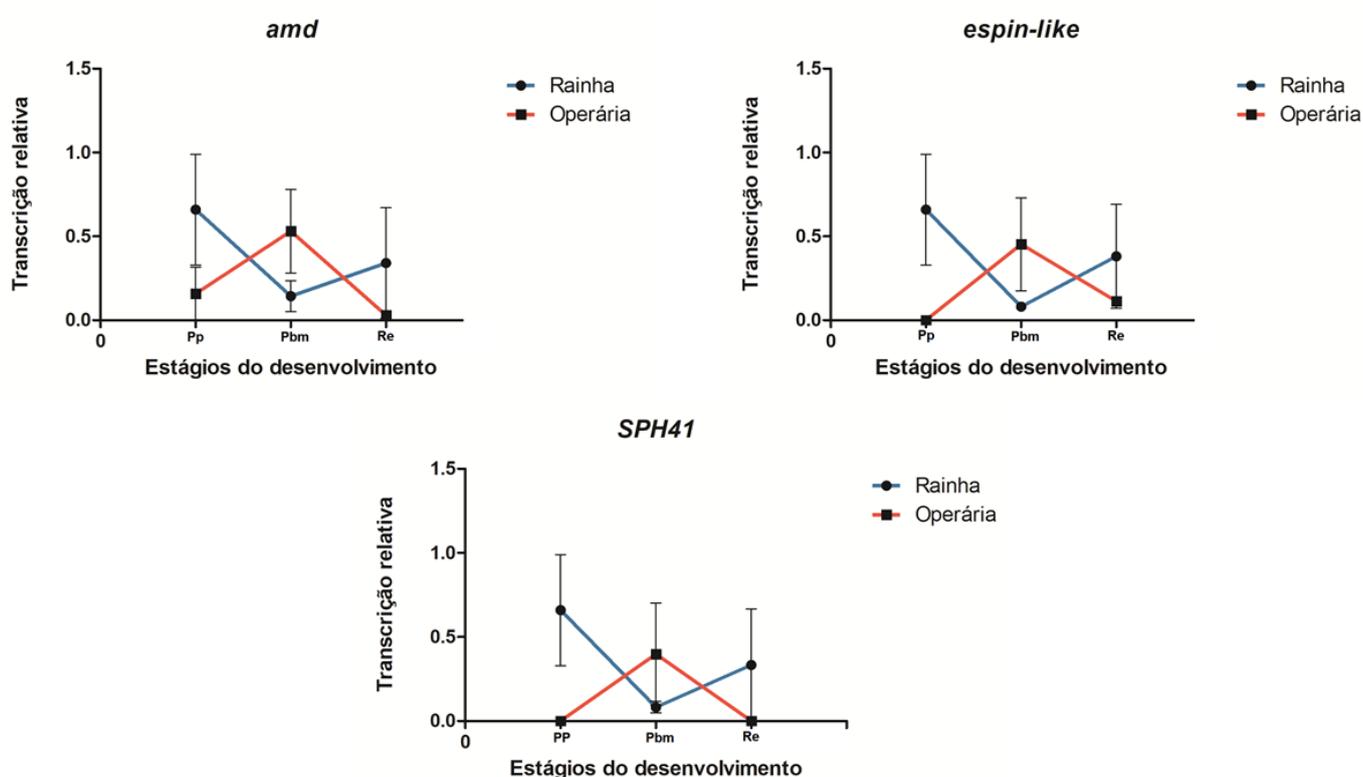


Figura 17 - Níveis relativos de expressão de *amd*, *espin-like* e *SPH41* obtidos mediante PCR Tempo real em diferentes estágios pupais em castas de *F. varia*. O eixo X representa os estágios do desenvolvimento analisados (para detalhes, ver Tabela 1). O eixo Y representa a quantidade de expressão relativa do mRNA das três hexamerinas em relação ao gene referência *rpl-32* (médias e erros de $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Triplicatas técnicas e biológicas. Valores expressos como média \pm EPM. ANOVA *two way*, seguida de pós-teste de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

Os genes *spz2* e *takeout* também estão relacionados à atividade neuronal. Apesar de ambos não apresentarem diferenças significativas entre rainhas e operárias nota-se que a transcrição do *spz2* em operárias Pp segue em nível inferior aos de rainhas, e o gene *takeout*, em rainhas Pp e Pbm, apresenta taxa de expressão baixíssima. Com relação ao *amci*, gene este envolvido na inibição de proteínas durante a neurogênese, existe diferença significativa em Pp e Pbm, sendo este mais transcrito em cérebro de operárias nestas fases. Porém, em abelhas Re, não houve diferença significativa entre as castas (Figura 18).

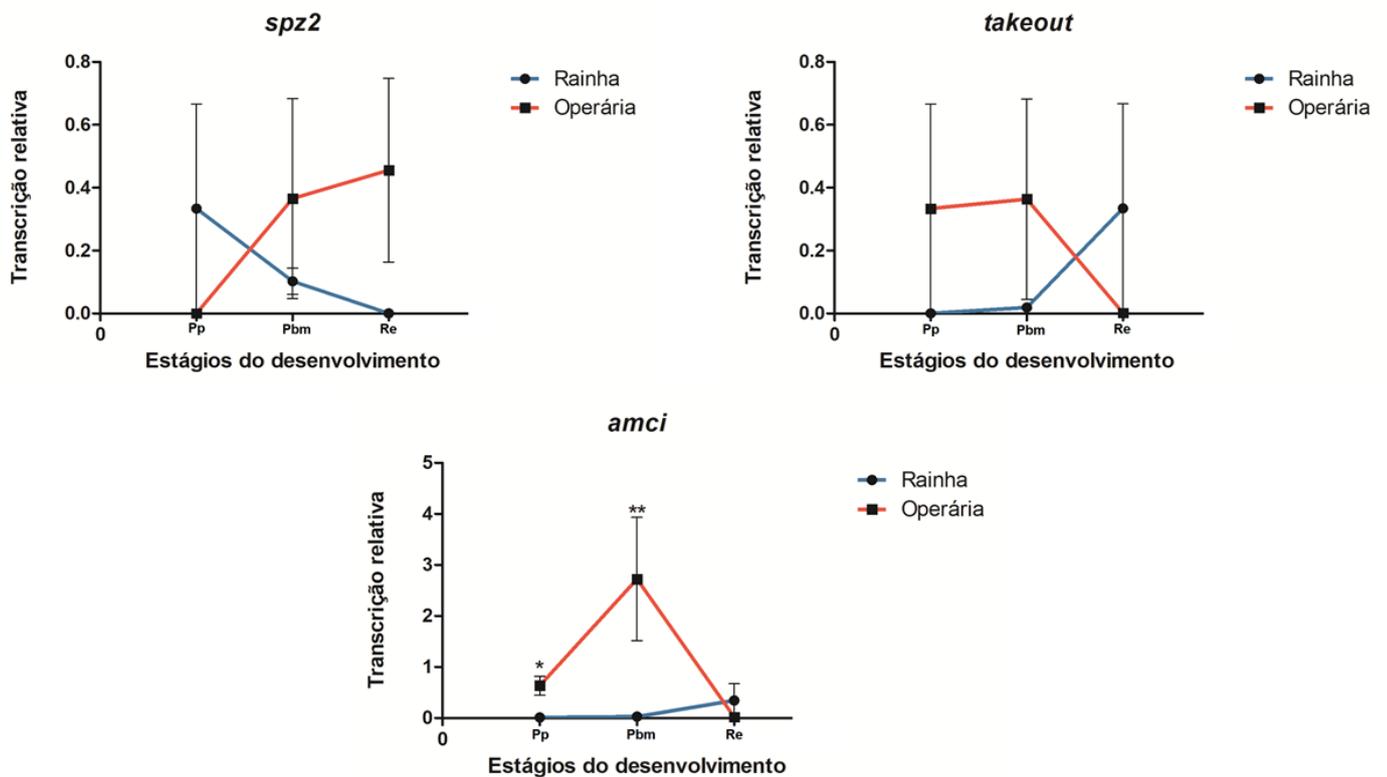


Figura 18 - Níveis relativos de expressão de *spz2*, *takeout* e *amci* obtidos mediante PCR Tempo real em diferentes estágios pupais em castas de *F. varia*. O eixo X representa os estágios do desenvolvimento analisados (para detalhes, ver Tabela 1). O eixo Y representa a quantidade de expressão relativa do mRNA das três hexamerinas em relação ao gene referência *rpl-32* (médias e erros de $2^{-\Delta\Delta CT}$). Triplicatas técnicas e biológicas. Valores expressos como média \pm EPM. ANOVA two way, seguida de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

Fonte: Da autora.

6 DISCUSSÃO

6.1 PRODUÇÃO ARTIFICIAL DE RAINHAS DE *Frieseomelitta varia*

Esta etapa foi de extrema importância para o estudo, pois nos permitiu comparar como ocorre a morfogênese e a expressão gênica diferencial dos genes neurogênicos nas castas de *F. varia*. Os experimentos para produção de rainhas se iniciaram em 22/01/2018, no Meliponário Experimental da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto. Para realizar as transferências nos baseamos no trabalho de Baptistella e colaboradores (2012), no qual foram testadas algumas quantidades de alimento em transferências realizadas em diferentes estações do ano, mostrando que o volume de 40 μL culminou em maior taxa de rainhas nascidas. Experimentos realizados por Castro (2012) mostraram que para a espécie nativa *Tetragona clavipes* (mais conhecida por borá) o volume adequado para o nascimento de rainhas “in vitro” é entre 60 μL e 110 μL . Deste modo, foi necessário replicar os experimentos de Baptistella, realizados em 2012, com o intuito de definir este limiar de volume larval para a produção de rainhas em *F. varia*.

Cada célula de cria de uma colônia de *F. varia* contém aproximadamente $26,70 \pm 3,55$ μL de alimento larval para o desenvolvimento de uma operária (BAPTISTELLA et al., 2012); considerando que uma célula auxiliar apresente a mesma quantidade de alimento em seu interior, acredita-se que a dose de alimento necessária para a produção de uma rainha talvez seja o dobro desta quantidade. Os volumes de 30 e 40 μL de alimento larval fornecidos em nossos ensaios resultaram em maiores taxas de mortalidade das larvas, sendo que as larvas restantes geraram poucas rainhas. Com 50 μL de alimento notamos uma grande taxa de sobrevivência das larvas transferidas e nenhuma delas se desenvolveu em operária. Este resultado foi exatamente o contrário do relatado por Baptistella et al (2012), onde nas quantidades de 30 e 40 μL (transferências realizadas em dezembro/fevereiro e abril/julho, respectivamente) foi observada maior frequência de larvas diferenciadas em rainhas, e com 50 μL (transferências realizadas em agosto) houve mortalidade total das larvas.

É importante ressaltar que no estudo de 2012 foram utilizadas larvas na fase pré-defecante, com caixa cefálica de tamanho 0,866 a 1,143 mm, enquanto que no nosso estudo transferimos larvas L1, o primeiro estágio larval. Provavelmente, o fato de Baptistella e colaboradores manusearem para as transferências larvas já em L4 explicaria esta influência negativa nas taxas de sobrevivência das crias transferidas. Larvas pré-defecantes são larvas

tardias, e desta maneira, podem ter passado algumas horas sem se alimentarem; portanto, quando há o fornecimento de maior quantidade de alimento larval após a fase de alimentação, podem ocorrer perturbações na fisiologia deste indivíduo, ou então estas larvas simplesmente se afogam no alimento extra, resultando na sua morte precoce. Além disso, estudos demonstram que, em *A. mellifera*, as larvas necessitam de um período de recuperação estimado em, pelo menos, 24 h após a transferência (NUNES-SILVA et al., 2006), o que pode ser igualmente aplicado para *F. varia*. Fatores climáticos também podem ter interferido diretamente no desenvolvimento larval (época seca e chuvosa, por exemplo). Desta forma, larvas de *F. varia* transferidas ainda em L1 ou L2 são mais aptas a concluir seu desenvolvimento, com taxas de sobrevivência mais elevadas. Estes dados nos fornecem evidências de que maiores quantidades de alimento ainda no início do desenvolvimento já podem mediar o desenvolvimento em rainhas, gerando diferenças morfológicas entre as castas.

6.2 AS OPERÁRIAS RECÉM-EMERGIDAS POSSUEM VOLUME CEREBRAL E DE NEURÓPILAS ESQUERDAS MAIORES QUE RAINHAS

Através de análises morfométricas comparativas do volume total do cérebro das castas de *F. varia*, foi verificado que, em Pp e Pbm, o cérebro de rainhas apresenta maior volume, situação que se inverte em Re a favor das operárias. Barchuk e colaboradores (2017) conduziram um estudo sobre área cerebral e obtiveram resultados semelhantes com a espécie de abelha *Apis mellifera*. Notamos também que a partir de Pbm o volume cerebral de rainhas vai diminuindo, culminando em cérebros maiores em operárias na fase Re. Sugerimos que em rainhas de *F. varia* ocorram eventos de morte celular que se intensificam nos indivíduos adulto-farato Pbl, fase após Pbm e que antecede a fase Re. Em rainhas de *A. mellifera* ocorre um padrão de diminuição no tamanho cerebral, onde altos níveis de ecdisteróides seriam o gatilho inicial para extensivos eventos de morte celular programada no cérebro. Na espécie *M. quadrifasciata* (espécie nativa da qual se conhecem os títulos hormonais), os picos de ecdisteróides de rainhas alcançam seus valores máximos mais precocemente do que as operárias, sendo duas vezes maiores na casta reprodutora (PINTO et al., 2002).

De forma interessante, estudos feitos por nosso grupo de pesquisa mostraram os possíveis efeitos dos níveis de expressão do gene *EcR*, um receptor de ecdisteróides e suas variantes (A e B), entre as castas de abelhas *A. mellifera*. Foi constatado que em todas as fases

analisadas (Pw, Pp, e Pbm) os níveis de transcritos de EcR-A e EcR-B sempre eram mais elevados em operárias (PAULA-JUNIOR, 2018). Diversos tecidos sofrem degeneração durante a metamorfose em resposta à presença elevadas destes hormônios na hemolinfa; porém, em alguns tipos celulares e tecidos, esta elevação hormonal promove proliferação, como ocorre nos discos imaginais, percussores de estruturas adultas (DAVIS et al.; 2005). No tecido neuronal os ecdisteróides funcionam estimulando o crescimento, maturação e neuritogênese (TRUMAN, 1996). No entanto, são necessários estudos de expressão gênica diferencial para verificar se há diferenças casta-específicas nos níveis de transcrição, e caso haja, seria interessante usar métodos imunohistoquímicos com marcadores moleculares específicos para identificar eventos de proliferação celular e morte celular programada para determinar se tais processos ocorrem de forma similar em *F.varia*.

Nossos resultados com relação aos CCs e aos CPs mostraram que as neurópilas correspondentes ao hemisfério esquerdo são maiores em operárias se comparadas a rainhas. De forma interessante, no início da fase pupal de *A. mellifera* (Pw, fase que antecede Pp), o HJ e ecdisteróides se encontra em maiores níveis no cérebro de rainhas (RACHINSKY et al., 1990; PINTO et al., 2002). Existe a ocorrência de um padrão de diminuição no tamanho cerebral desta casta, onde altos níveis de ecdisteróides seriam o gatilho inicial para extensivos eventos de morte celular programada no cérebro (Referência). Assumindo que estes mesmos eventos ocorram em *F. varia*, pode ser uma explicação para o volume reduzido dos CCs de rainhas. O HJ também tem função de inibir a atividade mitótica, especialmente nos neuroblastos presentes nos CCs (MALUN et al., 2003), e desta forma, as operárias são beneficiadas com maiores volumes dos CCs, especialmente os do hemisfério esquerdo.

Visto que as rainhas exercem uma única função na colônia, pode-se dizer que a redução no grau de investimento dos CCs são características desta casta (JULIAN; GRONENBERG, 2002). Além disso, rainhas adultas apresentam uma redução de 30% nos volumes das células de Kenyons dos CGs; curiosamente, elas também apresentaram baixos títulos de HJ, ao contrário das operárias (ROBINSON et al., 1989; ROBINSON, 1992; FAHRBACH et al., 1995). Novamente, estes resultados sugerem que os hormônios (HJ + ecdisteróides) são de fundamental importância para a neurogênese destes insetos, ajudando a modular estruturalmente as neurópilas de rainhas e operárias.

Experimentos demonstram que os CCs de rainhas sofrem mais morte celular do que operárias (ROAT; CRUZ-LANDIM, 2008; ROAT; CRUZ-LANDIM, 2010; ROAT; CRUZ-

LANDIM, 2011). Ainda de acordo com Roat & Cruz-Landim (2008), as diferenças morfológicas mais marcantes encontradas entre as castas estão na diferenciação das neurópilas cogumelares. Em operárias Pp, já é clara a diferenciação entre o anel basal e o colo do cálice, enquanto que em rainhas o mesmo processo é mais evidente na fase Pb. Assim, é possível dizer que em rainhas ocorre uma diferenciação tardia das neurópilas, o que poderia ser relacionado à pequena quantidade de células de Kenyon.

O grau de investimento no tamanho relativo do tecido cerebral sempre será determinado pelas demandas cognitivas colocadas nesta região (RATCLIFFE et al., 2006). De fato, uma área de neurópilas mais desenvolvidas permite às operárias realizarem de forma eficiente suas tarefas dentro e fora da colônia. Além disso, este resultado vai de acordo com Hawse (1974), que determinou que existe uma relação entre o tamanho dos CCs e o grau de socialidade dos insetos, onde uma estrutura social mais complexa exige CCs maiores e mais organizados.

Quando se analisa os CPs de operárias, fica claro que existem diferenças no volume desta estrutura com relação à rainha, favorecendo às primeiras, que pode ser atribuída à quantidade de axônios presentes nos pedúnculos ou à presença de axônios mais espessos em operárias. Os estímulos de entrada estão relacionados com o maior número de axônios, enquanto que axônios mais grossos são transmissores de estímulos mais rápidos (CHAPMAN, 1998), resultando em respostas mais rápidas das operárias aos estímulos recebidos. Assim, um corpo peduncular maior permite às operárias realizarem tarefas complexas dentro da colônia, sendo fundamental o maior desenvolvimento cerebral, ou seja, das partes que respondem aos estímulos sensoriais, mais especificamente os corpos pedunculares.

Sendo assim, nossa hipótese do cérebro social se aplica à espécie *F. varia*, uma vez que essa se trata de uma espécie com alto grau de socialidade em que se observou o maior volume cerebral em operárias recém-emergidas, bem como corpos cogumelares e pedunculares maiores, responsáveis pela memória e cognição. O sistema nervoso destes insetos é que gera e controla o comportamento. É esperado que comportamentos mais complexos, como os que as operárias realizam na colônia, sejam acompanhados por cérebros e estruturas mais complexas (MICHENER, 1974).

Desta forma, encontramos que as diferenças no tamanho do cérebro entre rainhas e operárias em *F. varia* surgem após a fase Pbm. Antes disso, mais especificamente em Pp, não

encontramos diferença no volume cerebral entre rainhas e operárias. Em *A. mellifera*, o cérebro de rainhas se mostra largamente maior do que o de operárias, com o aparecimento dos primórdios dos corpos pedunculares ainda em L4 (MODA et al., 2013). Já em pupas, esse mesmo órgão torna-se ativamente menor na casta reprodutora em valores absolutos (BARCHUK et al., 2017), ocorrendo uma clara inversão do tamanho cerebral entre as castas. Desde que, em *F. varia*, as larvas de rainhas consomem aproximadamente o dobro do que as de operárias, é razoável esperar que nesta espécie o desenvolvimento do cérebro também seja maior em rainhas. Isto significaria que, de maneira semelhante ao que acontece em *A. mellifera*, a metaformose permitiria o início de um *shift* morfogenético, de tal forma que durante o estágio de pupa-farato as dimensões do cérebro comecem favorecer às operárias. Experimentos em andamento poderão, eventualmente, confirmar esta hipótese.

6.3 A ASSIMETRIA CEREBRAL DURANTE A NEUROGÊNESE

De maneira geral, nossos achados sugerem a existência de assimetria cerebral em *F. varia* (as diferenças não foram grandes o suficiente para serem detectadas no teste estatístico). Diversos animais bilatérios apresentam um cérebro assimétrico (RIGOSI et al., 2015). As funções cognitivas e processamento de estímulos sensoriais são consequências de um cérebro lateralizado (CONCHA et al., 2012) e uma das vantagens da assimetria cerebral é a otimização dos circuitos neurais, processo que evita a função dupla e promove o processamento paralelo (ROGERS et al., 2013; VALLORTIGARA; ROGERS, 2005). Além da lateralização cerebral, existe também a comportamental, e ambas podem ser relacionadas com as pressões sociais seletivas (ANFORA et al., 2010). Apesar destas informações, quando realizamos as análises morfométricas dos CCs e dos CPs com relação ao volume total do cérebro, não encontramos de fato assimetria dos hemisférios em abelhas *F. varia*.

Um dos primeiros trabalhos acerca de assimetria durante o desenvolvimento foi feito por Letzkus et al. (2006) e Rogers et al. (2008), que demonstraram que existe uma lateralização da aprendizagem olfatória em abelhas *A. mellifera*, onde, através do teste do reflexo da extensão da probóscide (REP) e utilizando apenas uma antena, foi verificado que as abelhas aprendem melhor com a antena do lado direito devido ao maior número de sensilas presentes nelas em detrimento da antena esquerda (LETZKUS et al., 2006; ROGERS et al., 2008). Resultado semelhante foi encontrado em *Bombus terrestris* (mamangaba), espécie na qual também foi comprovada a existência de lateralização na detecção de odor e na

aprendizagem, que favorece a antena direita, onde foi detectada maior predominância de sensilas olfatórias (ANFORA et al., 2011). Além disso, existem dados que comprovam que a lateralização comportamental e na aprendizagem encontrada em abelhas têm sido associadas com assimetrias corporais e eletrofisiológicas a nível periférico na via neural olfatória (FRASNELLI et al., 2010; LETZKUS et al., 2006).

Guo et al. (2016) utilizando ferramentas moleculares, fizeram comparações entre a expressão gênica entre os hemisférios esquerdo e direito. Os resultados revelaram que a expressão gênica em cérebros de abelhas (RAINHAS OU OPERÁRIAS) também é assimétrica, com o hemisfério direito apresentando cerca de 6% dos genes com nível de transcrição 2 vezes mais elevados, exibindo assim maiores níveis de expressão do que o esquerdo. Este estudo também mostrou que durante a aprendizagem olfatória, a memória a longo prazo é determinada pelo hemisfério esquerdo, e a aprendizagem e memória a curto prazo associadas ao hemisfério direito. De fato, as operárias dependeriam da potencialização da memória a longo prazo, refletida na melhor aprendizagem. Desde que emergem as operárias iniciam suas tarefas na colônia, que irão se modificar de acordo com o tempo de vida (polietismo etário); tais funções vão desde a limpeza dos alvéolos até o forrageamento, no qual muitas vezes as operárias necessitam percorrer longas distâncias de voo, sendo preciso uma boa memória para a execução de seus encargos, visto as demandas cognitivas que rodeiam esta casta durante todo o seu ciclo de vida. Em rainhas este investimento não se faz necessário.

6.4 ANÁLISE *IN SILICO* DOS GENES NEUROGÊNICOS

Os nove genes neurogênicos que foram utilizados neste projeto e o gene de referência tiveram sua estrutura, número de éxons, íntros e número de pares de bases presentes em cada um deles determinados (Figura 13). Pela plataforma *Artemis* foi possível identificar a sequência de aminoácidos presente em cada uma das CDS de cada gene (através do arquivo FASTA); estas sequências foram copiadas e foi feita a análise *in silico* destes genes através de alinhamento local e global. O intuito destas análises foi comparar informações de sequências biológicas primárias, permitindo assim que as sequências destas proteínas codificadoras de cada gene fosse comparada com as de outras espécies, como *A. mellifera*, *M. quadrifasciata*, *D. melanogaster*, *H. sapiens*, espécies que possuem sequência genômica disponibilizada e servem de referência para a discussão da hipótese do cérebro social.

Verificamos que dentre os 9 genes analisados, seis deles (*hex110*, *hex70c*, *hex70b*, *takeout*, *spz2*, e *espin-like*) não possuem ortólogos em *H. sapiens*. Diferentemente, em *A. mellifera*, *D. melanogaster* e *M. quadrifasciata* os *E-value* encontrados foram menores, indicando que existe alto grau de conservação destes genes entre as espécies de insetos, principalmente entre as espécies de abelhas nativas (*F. varia* x *M. quadrifasciata*).

Em humanos, a vacuolar protein sorting 13 homolog A – VPS13A possui *E-value* = 5.1. Neste caso, não podemos dizer que esta proteína é ortóloga em *H. sapiens*, pois o valor de E é alto. Pode ser que um pequeno domínio seja conservado entre as espécies. Esta proteína está envolvida na organização e dinâmica do citoesqueleto de actina (FOLLER et al., 2012; SCHMIDT et al., 2013; HONISCH et al., 2015), e mutações em seu gene causam a doença neurodegenerativa coreia acantocitose (ChAc), caracterizada por gerar danos motores e anormalidades comportamentais (DOBSON-STONE et al., 2002; SAIKI et al., 2007; NEUTEL et al., 2012). Já a proteína não caracterizada c11orf95 (*E-value* = 5.4) em *H. sapiens*, está envolvida no aparecimento de ependimomas, uma classe de tumores que acomete o sistema nervoso central. Este tipo de glioma geralmente ocorre entre a superfície ventricular do cérebro e o canal central da medula espinal, ou nos hemisférios cerebrais (DUNCAN; HOFFMAN, 1995; SCHIFF; WEN, 1995).

Em *D. melanogaster* a proteína ortóloga à *hex110*, larval serum protein 1 gamma – LSP-1 (*E-value* = $2e^{-37}$) também se encontra armazenada na hemolinfa (ROBERTS et al., 1977) e é extremamente importante para a formação da cutícula (SMITH et al., 1981), além de acumular-se nas células do tendão, ajudando na fixação dos músculos à cutícula subjacente (GREEN et al., 2016). A proteína ortóloga da *hex70b*, larval serum protein 2 – LSP-2 (*E-value* = $5e^{-112}$) participa do processo de produção de ovos (MASSEY et al., 1997) e pode ser encontrada no indivíduo adulto, sendo que no terceiro instar larval os transcritos da *LSP-2* se encontram acumulados uniformemente em todas as células do corpo gorduroso, enquanto que na mosca adulta mais de 80% destes transcritos são expressos no tecido adiposo da cabeça.

Nossas análises de alinhamento global demonstraram altos *score* entre *F. varia* e *A. mellifera* e mais ainda entre *F. varia* e *M. quadrifasciata*, indicando que estes genes são bem conservados e provavelmente desempenham funções similares na neurogênese diferencial destes animais.

Já o gene *spatzle 2*, que possui ortólogo nas espécies de insetos aqui citadas, pertence a uma família de proteínas chamadas de neurotrofinas (NTs), que desempenham papel

fundamental na formação do sistema nervoso central e periférico (ZHU et al., 2008). Elas são sintetizadas como precursores (proneurotrofinas) que, quando clivadas, garantem a sobrevivência neuronal, orientação axonal e aumentam a plasticidade sináptica neuronal por meio da ativação dos receptores de tirosina quinases (Trk) (LU et al., 2005; ZHU et al., 2005; FOLDI et al., 2017). Além disso, as NTs controlam a proliferação celular e o desenvolvimento dos neurônios do SNC, a excitabilidade e a potenciação a longo prazo (LTP), a base da memória e do aprendizado (DAVIES, 2003; ZWEIFEL, 2005).

Experimentos de Coutinho-Budd et al. (2017) mostraram que o silenciamento da neurotrofina causou mudanças no comportamento animal. Um estudo genético realizado em 2005 por Zhu e colaboradores também mostrou que o fator neurotrófico em *Drosophila* (*DNT1* – ortóloga da *spz2*), quando silenciado, causa um aumento nas taxas de apoptose neuronal, e o ganho da *DNT1* mantém a sobrevivência neuronal, resgatando a ocorrência natural de morte celular. Isto pode indicar a atuação do *spz2* na manutenção das sinapses, além de evidenciar seu papel em manter a sobrevivência das células nervosas. Em humanos, um membro da família das neurotrofinas, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) desempenha papel de modulador da excitabilidade neuronal e plasticidade sináptica (PEZET; MCMAHON, 2008). O BDNF também é necessário para a transição da dor inflamatória crônica para a aguda (SIKANDAR et al., 2018). O gene correspondente ao BDNF e sua função são altamente conservados entre os vertebrados durante o processo evolutivo, participando também da formação de conexões sinápticas apropriadas, e qualquer problema durante este processo pode causar desordens nas funções cognitivas (COHEN-CORY et al., 2010).

O gene *espin-like* de *F. varia* possui ortólogo nas espécies *D. melanogaster* (*E-value* = $2e-17$), *A. mellifera* (*E-value* = $6e-156$) e *M. quadrifasciata* (*E-value* = 0) mas não em *H. sapiens*. Em *Drosophila* são proteínas de ligação à actina (OKENVE-RAMOS; LLIMARGAS, 2014); em *A. mellifera*, o *espin-like* se encontra mais expresso em cérebros de rainhas L3, onde provavelmente também participa da formação inicial dos feixes de actina e prolongamento dos axônios, resultando assim no maior desenvolvimento do sistema nervoso de larvas L3 de rainhas com relação às operárias (VIEIRA, 2014). Já o gene *takeout* possui ortólogo em *D. melanogaster* (*E-value* = $5e-85$), sendo predominantemente expresso em machos, e análises filogenéticas demonstraram que este gene é extremamente conservado entre as espécies de insetos, sugerindo que, evolutivamente, o *takeout* desempenha papéis sexuais específicos no comportamento de acasalamento em machos de insetos no geral (VANAPHAN et al., 2012).

6.5 *amci*, *amd* E *SPH41*: POSSÍVEIS ORTÓLOGOS EM VERTEBRADOS

Verificamos que dentre os 9 genes analisados, três deles (*amci*, *amd* e *SPH41*) possuem baixos *E-value* entre *F. varia* e humanos, indicando que eles possuem domínios conservados entre as espécies.

Notamos que os genes de abelhas que podem ser classificados como ortólogos funcionais em vertebrados são *amci*, *amd* e *SPH41*. O *amd* apresentou homologia entre *F. varia* e *H. sapiens*, com *E-value* = 0.0 e ID = 49%. Seu ortólogo é a enzima L-aminoácido aromático decarboxilase (aromatic-L-amino acid decarboxylase – AAAD), também conhecida como dopa decarboxilase – DDC (BRUNEAU et al., 1990). Em humanos a AAAD é encontrada no SNC e no SNP (SCHERER et al., 1992), onde catalisa a síntese de dopamina e serotonina, dois neurotransmissores importantes (CHRISTENSON et al., 1972). Esta enzima também tem envolvimento em várias doenças neurológicas, como é o caso da doença de Parkinson, depressão e esquizofrenia (HWU et al., 2012). O gene DDC (dopa decarboxilase) possivelmente é um gene funcional para o autismo, já que houve relatos de anormalidades no sistema de neurotransmissão da serotonina em alguns indivíduos autistas (ANDERSON et al., 1987; ABRAMSON et al., 1989; LEBOYER et al., 1999).

Em certas fases do desenvolvimento do cérebro, a estimulação adequada de dopamina e serotonina são indispensáveis para o desenvolvimento motor e cognitivo adequados (VERNEY; LEBRAND; GASPAS, 2002; GASPAS; CASES; MAROTEAUX, 2003). Além disso, estes dois neurotransmissores são responsáveis pela modulação de funções neuronais, e desenvolvimento neuronal, respectivamente (GASPAS; CASES; MAROTEAUX, 2003). Em zebrafish (*Danio rerio*) a deficiência de AAAD gera redução no número de neurônios, bem como aumento nas taxas de apoptose, causando assim uma diminuição do volume cerebral durante a embriogênese (SHIH et al., 2013). Resultados semelhantes foram encontrados em pacientes com hiperatividade ou déficit de atenção, revelando que a função dopaminérgica insuficiente está relacionada com a redução no tamanho do cérebro (SWANSON et al., 2007).

Atualmente, já se sabe que os mesmos neurotransmissores presentes no cérebro humano estão presentes nos neurônios do cérebro de abelhas. São eles: acetilcolina (ACh), glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), bem como serotonina (5-HT) e dopamina (DA) (GAUTHIER; GRUNEWALD, 2012). A DA e a 5-HT são conhecidas como aminas biogênicas, e diversos estudos demonstram que aminas biogênicas estão fortemente

envolvidas na aprendizagem, modulando as funções cerebrais de diversas formas nestes insetos (SCHEINER; BAUMANN; BLENAU, 2006; GAUTHIER; GRUNEWALD, 2012). Os neurotransmissores em abelhas também agem durante a recuperação e formação de memória, discriminação de odores, e aprendizagem associativa e não-associativa (STOPFER et al., 1997; GAUTHIER, 2010; GAUTHIER; GRUNEWALD, 2012).

Neste contexto, é possível que o *amd* em *F. varia* esteja envolvido na síntese de neurotransmissores, especialmente dopamina e serotonina, participantes do desenvolvimento do cérebro. Estas moléculas, portanto, funcionam como metabólitos envolvidos em processos nervosos e cognitivos de abelhas, e qualquer problema na transcrição do *amd* poderia acarretar desordens na memória e cognição, além de exercer efeito negativo em algumas atividades que dependem do desenvolvimento motor normal, como, por exemplo, a orientação do vôo para retornar para a colmeia.

O gene *amci* (*chymiotripsin inhibitor*) está relacionado com a inibição de serinas proteases. Sua proteína está presente na hemolinfa larval de *A. mellifera*, a qual contém peptídeos que são responsáveis por inibir a função catalítica de diversas serinas proteases com especificidades distintas (POLANOWSKI et al., 1992). Em conjunto com o *SPH41* (*serine protease homolog 41*), este gene pode contribuir para o desenvolvimento diferencial entre as castas durante os primeiros estágios de desenvolvimento larval (VIEIRA, 2014). Em *D. melanogaster*, um mecanismo neuropeptidérgico específico da fêmea atua em neurônios quimiossensoriais periféricos para aumentar a preferência feminina por nutrientes essenciais, de acordo com sua necessidade reprodutiva; esta modulação autócrina é feita pelo ortólogo de *amci* na mosca, o myoinibiting peptide precursor – MIP (HUSSAIN et al., 2016).

O gene *amci* nos indica $E\text{-value} = 27e-04$ e $ID = 36\%$, enquanto que o *SPH41* tem $E\text{-value} = 2e-45$ e $ID = 54\%$. A ortóloga da *amci*, de acordo com a tabela 4, é a mucin6. Esta é uma glicoproteína de alto peso molecular produzida por diversos tecidos epiteliais; sua função é formar uma barreira mucosa insolúvel que protege o lúmen do intestino (OHIA et al., 2017). Já no SNC, processos como neurogênese, inflamação e neurodegeneração parecem ser mediados por glicoproteínas que interagem com lectinas endógenas (LINNARTZ et al., 2012; LOZANO et al., 2017). As mucinas também participam da glicosilação (O-glicosilação tipo mucina) (LADERACH et al., 2010), processo no qual ocorrem modificações importantes das proteínas e lipídios, que irão desempenhar diversas funções, como interação célula-célula, adesão e sinalização celular (KLEENE; SCHACHNER, 2004). O-glicoproteínas apresentam

em sua estrutura oligossacarídeos covalentemente ligados a aminoácidos que contém cadeia lateral com grupo hidroxílico, como serina (Ser) e treonina (Thr); as mucinas possuem motivos repetidos ricos em resíduos de Ser e Thr, que são sítios potenciais para abundante O-glicosilação (HOLEMANN; SEEBERGER, 2004).

Estudos em *Xenopus* sugeriram a função da O-glicosilação na via de sinalização TGF- β durante o desenvolvimento de vertebrados (HERR et al., 2008). TGF- β é uma superfamília de molécula sinalizadoras que exercem papel central na regulação no início da embriogênese, oogênese e homeostase dos tecidos adultos (LUTZ; KNAUS, 2002; SHI; MASSAGUE, 2003) O silenciamento de genes diretamente envolvidos na O-glicosilação resultou na redução do tamanho cerebral e da medula espinhal, mostrando seus efeitos na modificação de sinalização TGF- β (HERR et al., 2008). A O-glicosilação também tem sido associada a inflamações nos tecidos cerebrais na doença de Alzheimer (GUEVARA et al., 1998; ESPINOSA et al., 2001).

A ortóloga à SPH41 é a plasma kallikrein (PK), também uma serina protease. A calicreína cliva cininogênio para formar cinina, peptídeos pró-inflamatórios que agem na regulação da permeabilidade vascular, formação de edema, migração de células transendoteliais e inflamação em diferentes órgãos após lesão (MARCEAU; REGOLI, 2004; LEEB-LUNDBERG et al., 2005). O sistema calicreína-cinina está presente no tecido cerebral e em alguns tipos celulares presentes no SNC, como neurônios, provavelmente servindo como neuroproteção (CHEN et al., 2000; LIU et al., 2009); astrócitos, produzindo efeitos inflamatórios e aumentando a produção de ROS (JEFTINIJA et al., 1996; KIM et al., 2010); micróglia, agindo em processos de inflamação e migração (FLEISHER-BERKOVICH et al., 2010; IFUKU et al., 2007; NODA et al., 2003); oligodendrócitos, participando da liberação de Ca^{2+} intracelular (SIMPSON et al., 1997; STEPHENS et al., 1993) e células endoteliais cerebrais, com efeitos a permeabilidade e aumento da inflamação (ABBOTT, 2000; BORLONGAN; EMERICH, 2003).

As serina proteases foram alvos de alguns estudos que demonstram a função neuroprotetora das serina proteases após algum tipo de lesão ou após quadros de hipoglicemia e estresse oxidativo, pois aumenta o número de células capazes de fornecer fatores neurotróficos (CAVANAUGH et al., 1990; PINDON et al., 1998). No cérebro de humanos, a tripsina e tripsina-like extrapancreáticas, como neuropsina, neurotripsina, neurosina, mesotripsina/tripsina IV, P22, participam do desenvolvimento neuronal, plasticidade,

neurodegeneração e neuroregeneração no cérebro (GSCHWEND et al., 1997; SAWADA et al., 2000).

A neurotripsina, outra serina protease neuronal, se encontra expressa em altos níveis durante a formação do sistema nervoso, indicando seu papel na plasticidade neuronal tanto no desenvolvimento quanto na vida adulta (WOLFER et al., 2001). Mutações da neurotripsina estão ligadas à retardo mental (MOLINARI et al., 2002), e isto somado a sua expressão na membrana pré-sináptica das sinapses corticais reforçam seu papel de reguladora das funções sinápticas adaptativas envolvidas na cognição (MIRANDA; LOMAS, 2006).

O *SPH41* de *F. varia* possui uma proteína ortóloga em *D. melanogaster*, chamada de *masquerade* (*mas*). Nas moscas, *mas* atua como um antagonista competitivo das serina protease, fato este interessante, já que a interação das serina proteases com seus inibidores é fundamental para a regulação do crescimento dos neurônios durante o desenvolvimento do sistema nervoso (MONARD, 1988). A *mas* também se encontra expressa em determinados tipos celulares que são importantes durante a embriogênese, e a perda de função desta proteína resulta em defeitos nas conectividades axonais dos neurônios motores e axônios sensoriais (MURUGASU-OEI et al., 1996).

Resumidamente, com base nos achados citados acima e considerando o processo de neurogênese de *F. varia*, *amci* e *SPH41* poderiam atuar na manutenção e desenvolvimento sistema nervoso já no início da embriogênese. Poderiam também exercer papel protetor às células cerebrais e participar de processos sinápticos, contribuindo assim para o processo de cognição.

6.6 OS GENES *hex70b* E *amci* SÃO MAIS TRANSCRITOS EM CÉREBROS DE OPERÁRIAS DURANTE O INÍCIO DO DESENVOLVIMENTO PUPAL

Nossos achados mostram que os três genes de hexamerinas analisados (*hex110*, *70b* e *70c*) também se expressam no cérebro de abelhas *F. varia*, assim como em *A. mellifera* (VIEIRA, 2014). O gene *hex70b* mostrou diferença estatística significativa de transcrição entre rainhas e operárias na fase inicial do desenvolvimento adulto-farato (Pp); já *hex70c* tem maior nível de transcrição em rainhas Pp. As hexamerinas são proteínas de armazenamento que possuem 6 subunidades de 70 a 80 kDa. Em insetos holometábolos, elas são parcialmente recapturadas da hemolinfa por endocitose mediada por um receptor no corpo gorduroso e

armazenadas em grânulos citoplasmáticos (TELFER; KUNKEL, 1991). Além de sua função como fornecedoras de aminoácidos para o desenvolvimento, as hexamerinas também são componentes da cutícula em pupas e adultos (MUNN; GREVILLE, 1971; KANOST et al., 1990).

No cérebro de formigas do gênero *Diacamma*, as hexamerinas parecem gerar diferenças comportamentais e fisiológicas, que desencadeiam diferenças reprodutivas, sendo consideradas relevantes na determinação de castas (OKADA et al., 2016). Ainda em formigas, estes genes se encontram mais expressos em cérebros de rainhas recém-emergidas em comparação com operárias. Dentre os himenópteros, a espécie de formiga *Camponotus destinatus* foi alvo de um estudo que revelou que as hexamerinas são transcritas no último instar larval, sendo elas notavelmente acumuladas em maiores níveis em rainhas adultas (MARTINEZ; WHEELER, 1993).

Alguns estudos já foram feitos em abelhas, especialmente *A. mellifera*, buscando compreender o papel destas proteínas no cérebro, que ainda permanece indefinido. Ensaios de imunolocalização detectaram hex110 mais acumulada nos cérebros de operárias *A. mellifera*, na fase L3, e na fase seguinte (L4) esta proteína também se mostram mais expressos nesta casta, indicando que esta diferença de expressão pode contribuir para as características morfológicas distintas observadas entre os cérebros das castas nesta fase (VIEIRA, comunicação pessoal). Além disso, *hex110* se encontra consideravelmente mais ativo no corpo gorduroso de operárias adultas em comparação a rainhas (MARTINS et al., 2010).

Martins e colaboradores (2010) sugerem que as hex70b e ex70c podem atuar na formação e endurecimento do exoesqueleto durante a metamorfose do adulto-farato, além de servir como uma fonte de reserva de aminoácidos para o desenvolvimento adulto, por serem hexamerinas ricas em metionina. Assim, pode ser que haja a utilização das hexamerinas em processos específicos, e que elas ajam como possíveis reguladoras no desenvolvimento do sistema nervoso ou em alguns processos que ocorrem no SNC. Em gafanhotos e em termitas *Reticulitermes flavipes*, as hexamerinas participam da diferenciação de castas em conjunto com o hormônio juvenil (HJ) por se ligarem a este hormônio, intervindo assim na sua sinalização (BRAUN; WYATT, 1996; ZHOU et al., 2006). De forma interessante, as maiores diferenças nos níveis de expressão dos genes *hexamerinas*, em *A. mellifera*, ocorrem na fase de alimentação do 5º instar larval, onde se observa maior nível de expressão das hexamerinas hex110, 70b e 70c em operárias e zangões do que em rainhas (MARTINS et al.,

2010). Já se sabe que os títulos de HJ diferem entre as castas/sexo de abelhas melíferas, sendo maiores em rainhas quando comparadas com operárias e zangões (REMBOLD, 1987; RACHINSKY et al., 1990). Além disso, o HJ atua como mediador das diferenças de castas, onde altos títulos de HJ gerarão o fenótipo de rainhas, enquanto que baixos títulos induzirão o desenvolvimento de operárias (WIRTZ; BEETSMA, 1972; REMBOLD et al., 1974). Há, portanto, uma relação inversa entre os níveis de expressão de hexamerinas e os títulos de HJ em *A. mellifera*, sugerindo que as hexamerinas também são moléculas de ligação ao HJ em abelhas (VIEIRA, 2014). Desta maneira, pode ser que tanto em *A. mellifera* quanto em *F. varia*, as hexamerinas sejam proteínas que modulam a disponibilidade do HJ, e, portanto, regulam a plasticidade fenotípica mediada por este hormônio, contribuindo para a organização social e para as diferenças observadas entre rainhas e operárias.

Como o nível de transcrição de *hex70b* se mostra maior em cérebros de operárias na fase inicial do desenvolvimento adulto-farato (Pp) em comparação com amostras de rainhas na mesma fase, sugerimos que esta proteína, em *F. varia*, guia o desenvolvimento de operárias mesmo nas fases pós-larva. Interessantemente, o perfil de transcrição de *hex70b* é oposto à dinâmica morfológica do cérebro (Figura 9). O estudo de Vieira (2014) revelou ainda que *hex110*, *hex70b* e *70c* são mais expressos em cérebros de operárias na fase inicial de alimentação (L3), indicando que estes genes são importantes no desenvolvimento de caracteres de operárias. No entanto, *hex70c* é mais transcrito em rainhas Pp em comparação com operárias. Um estudo de Danty e colaboradores (1998) demonstrou que *hex70c* e *hex70b* já foram identificadas em operárias de *A. mellifera* no momento em que elas emergem; já em rainhas ambas as hexamerinas ainda permanecem em adultas de 4 dias de idade. Assim, as diferenças nos padrões de expressão das hexamerinas indicam uma regulação casta-específica destas proteínas.

Ademais, são necessários estudos neurogênicos tendo as fases larvais de *F. varia* como alvo para verificar se nesta abelha nativa as hexamerinas seguem o mesmo padrão de expressão que foi proposto para *A. mellifera* no início do desenvolvimento. De acordo com Danty e colaboradores (1998), traços de *Hex70b* e *Hex70c* ainda estão presentes em operárias de *A. mellifera* no momento da emergência, mas não no adulto de 4 dias de idade; nas rainhas, a concentração na hemolinfa dessas proteínas diminui gradualmente, mas *Hex70b* ou *Hex70c* ainda estão presentes em adultos com quatro dias de idade (DANTY et al., 1998). Em conjunto, as diferenças no padrão de expressão das hexamerinas sugerem uma regulação específica de casta da síntese e utilização da hexamerina ao longo do desenvolvimento.

Já o gene *amci* (*chymotrypsin inhibitor*) é notavelmente mais transcrito no cérebro de operárias em Pp, e permanece assim até Pbm, com diferença estatística significativa. Este gene, como mencionado, está relacionado com a inibição de serina proteases. As serina proteases são assim chamadas devido à natureza química do seu sítio catalítico, podendo apresentar resíduos dos aminoácidos serina, histidina e aspartato, e estão envolvidas na catálise enzimática (BARRET; RAWLINGS, 1995; BARRET et al., 1998). (colocar pra cima) No cérebro, as serina proteases regulam a plasticidade sináptica (MADANI et al., 1999; CANNON et al., 2005, 2006; CHOI et al., 2005). Os inibidores de serina proteases, ou Serpins, são moléculas que controlam as ações das serina proteases; assim, as proteases e seus inibidores exercem importante papel no desenvolvimento neuronal e manutenção do sistema nervoso (MIRANDA; LOMAS, 2006).

Em camundongos, um tipo de serina protease é expresso principalmente nos neurônios do sistema límbico adulto. Seus níveis de expressão mudam após a estimulação elétrica, mostrando seu papel na plasticidade do hipocampo relacionada à aprendizagem, memória e cognição (CHEN et al., 1995; SUZUKI et al., 1995). Estudos sugerem também que serina proteases regulam a potenciação a longo prazo, a conectividade sináptica, crescimento neuronal e fasciculação do hipocampo (KOMAI et al., 2000; HIRATA et al., 2001; OKA et al., 2002). Em abelhas *A. mellifera* as serinas proteases com domínio de tripsina-like são mais expressas no cérebro de larvas L3 de rainhas do que de operárias (VIEIRA, 2014). Em *D. melanogaster*, uma serina protease desempenha papel na estimulação da orientação axonal (MURUGASU-OEI et al., 1996).

Como encontramos que em Pp e Pbm os níveis de transcritos do *amci* são maiores em operárias, isto evidencia o papel das serina proteases durante a formação do sistema nervoso e consequentemente na plasticidade neuronal, além da manutenção do sistema nervoso, podendo este gene contribuir para o maior desenvolvimento do cérebro de operárias na fase inicial desenvolvimento adulto-farato (Pp), bem como na fase tardia (Pbm), o que poderia explicar o maior volume cerebral desta casta. Além disso, o *amci* poderia agir como regulador das funções sinápticas envolvidas na cognição, possibilitando o maior desenvolvimento também dos CCE e CPE de operárias, pois elas necessitam de memória e cognição melhoradas, visto suas funções na colônia.

De forma geral, nossos resultados revelam que dentre os 9 genes utilizados neste estudo, 3 deles mostram níveis de transcrição significativamente diferentes entre as castas em

alguma fase do desenvolvimento, *hex70b*, *hex70c* e *amci* (*hex110* parece seguir o mesmo padrão). O *hex70b* possui maior nível de transcrição relativa em operárias do que em rainhas na fase Pp; ao contrário, *hex70c* demonstra nível de transcrição mais elevado em rainhas Pp. O *amci* é notavelmente mais transcrito no cérebro de operárias em Pp, e permanece assim até Pbm, com diferença estatística significativa. Nota-se que, a partir de Pbm, estes genes têm sua expressão diminuída em operárias nas fases subsequentes do desenvolvimento, e se elevam em rainhas.

7 CONCLUSÕES

Considerando nossos resultados morfométricos e as análises sobre os genes neurogênicos, pudemos mostrar que a hipótese do cérebro social se aplica à espécie *F. varia*, que se trata de uma espécie com alto grau de socialidade, em que se observou o maior volume cerebral em operárias recém-emergidas, bem como corpos cogumelares e pedunculares. Em *A. mellifera*, a diferença nutricional existente promove a geração de títulos hormonais distintos (ecdisteróides), responsáveis por iniciar extensivos eventos de morte celular no cérebro, o que explicaria esta diferença nos volumes cerebrais de rainhas e operárias. Pode ser que a quantidade de alimento ingerido pelas larvas, em *F. varia*, desencadeie processo semelhante. Também mostramos que as neurópilas do hemisfério esquerdo parecem ser maiores em volume em operárias, refletindo assim as necessidades dessa casta em possuir uma potencialização da memória a longo prazo, o que pode permitir maior capacidade de aprendizagem e comunicação. Com relação aos genes neurogênicos, três deles (*amci*, *amd* e *SPH41*) parecem possuir ortólogos em vertebrados. Estes genes podem atuar na manutenção e desenvolvimento do sistema nervoso já no início da embriogênese, e na síntese de metabólitos envolvidos em processos nervosos e cognitivos de abelhas, como dopamina e serotonina. Nossos dados moleculares revelaram que *hex70b* é mais transcrito no cérebro de operárias no início do desenvolvimento pupal (Pp), e *hex70c* é mais expresso em rainhas na mesma fase, sugerindo que suas respectivas proteínas, em *F. varia*, guiam o desenvolvimento mesmo nas fases pós-larva; o *amci* também se mostrou mais expresso em operárias Pp, permanecendo assim até Pbm. Este resultado evidencia o papel das serina proteases durante a formação do sistema nervoso e processos nervosos, podendo este gene contribuir para o maior desenvolvimento do cérebro de operárias e possivelmente participando como regulador das funções sinápticas necessárias para o desenvolvimento e melhoramento da cognição em operárias.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, N.J. Inflammatory mediators and modulation of blood–brain barrier permeability. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 20, p. 131–147, 2000.

ABRAMSON, R.K.; WRIGHT, H.H.; CARPENTER, R.; BRENNAN, W.; LUMPUY, O.; COLE, E.; YOUNG, S.R. Elevated blood serotonin in autistic probands and their first-degree relatives. **J Autism Dev. Disord.**, v. 19, p. 397–407, 1989.

ADOLPHS, R. Social cognition and the human brain. **Trends Cogn. Sci.** v.3 , p. 469-479, 1999.

AHMADIANTEHRANI, S.; LONDON, S.E. Bidirectional manipulation of mTOR signaling disrupts socially mediated vocal learning in juvenile songbirds. **PNAS**, v. 114, p. 9463 - 9468, 2017.

AMDAM, G.V.; NORBERG, K.; HAGEN, A.; OMHOLT, S.W. Social exploitation of vitellogenin. **PNAS**, v. 100, p. 1799-1802, 2003.

ANDERSON, G.M; FREEDMAN, D.X.; COHEN, D.J.; VOLKMAR, F.R.; HODER, E.L.; MCPHEDRAN, P.; MINDERAA, R.B.; HANSEN, C.R.; YOUNG, J.G. Whole blood serotonin in autistic and normal subjects. **J Child Psychol Psychiatry**, v 28, p. 885–900, 1987.

ANFORA, G.; FRASNELLI, E., MACCAGNANI, B., ROGERS, L. J., VOLLORTIGARA, G. Behavioural and electrophysiological lateralization in a social (*Apis mellifera*) but not in a non-social (*Osmia Cornuta*) species of bee. **Behav. Brain Res.** 206, 236-239, 2010.

ASENCONT, M.; LENSKY, Y. Juvenile hormone induction of “queenliness” on female honey bee (*Apis mellifera L.*) larvae reared on worker jelly and on stored royal jelly. **Comp. Biochem. Physiol. B.** v. 78, p. 109-117, 1984.

BAPTISTELLA, A.R.T.O. Produção “*in vitro*” de rainhas e ocorrência natural de machos de *Frieseomelitta varia* (Apidae: Meliponina). **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil. 2007.

BAPTISTELLA, A.R.T.O.; SOUZA, C.C.M.; SANTANA, W.C.; SOARES, A.E.E.S. Techniques for the in vitro production of queens in stingless bees (Apidae, Meliponini). **Sociobiol.**; v. 59, p. 297-310, 2012.

BARCHUK, A.R.; SANTOS, G.D.; CANESCHI, R.D.; DE PAULA JR, D.E., MODA, L.M. The ontogenetic saga of a social brain. **Apidologie**, v. 48, p. 1-17, 2017.

BARON, G.; STEPHAN, H.; FRAHM, H.D. Comparative neurobiology in chioptera. **Boston:** Birkhäuser Verlag. 1996.

BARON-COHEN, S.; RING, H.A.; WHEELWRIGHT, S.; BULLMORE, E.T.; BRAMMER, M.J., SIMMONS, A.; WILLIAMS, S.C.R. Social intelligence in the normal and autistic brain: an fMRI study. **Eur. J. Neurosci.** v. 11, p. 1891-1898, 1999.

BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D. Families and clans of serine peptidases. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 318, p. 247-250, 1995.

BARRETT, A.J., RAWLINGS, N.D., Woessner, J.F. Handbook of Proteolytic Enzymes. **Academic Press**, London, 1998.

BARTON, R.A.; PURVIS, A.; HARVEY, P.H. Evolutionary radiation of visual and olfactory brain systems in primates, bats and insectivores. **Philos. Trans. R Soc. B.** v. 348, p. 381–392, 1995.

BECHARA, A.; DAMASIO, H.; TRANEL, D.; DAMASIO, A. Deciding advanta– geously before knowing the advantageous strategy. **Science**, v. 275, p. 1293- 1295, 1997.

BEETSMA, J. The process of queen-worker differentiation in the honeybee. **Bee World.** v. 60, p. 24–39, 1979.

BENES, H., EDMONDSON, R.G., FINK, P., KEJZLAROV, J., LEPESANT, J.A., MILES, J.P., SPIVEY, D.W. Adult expression of the *Drosophila* Lsp-2 gene. **Dev. Biol.**, v. 142, p.138-146, 1990.

BENSON-AMRAM, S.; DANTZER, B.; STRICKER, G.; SWANSON, E.M. HOLEKAMP, K.E. Brain size predicts problem-solving ability in mammalian carnivores. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 113, p. 2532–2537, 2016.

BLOCK, G., GROZINGER, C.M. Social molecular pathways and the evolution of bee societies. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 366, p. 2155–2170, 2011.

BLOODWORTH, B.C.; HARN, C.C.; HOCK, C.T.; BOON, Y.O. Liquid chromatographic determination of trans-¹⁰-hydroxy-2-decenoic acid content of commercial products containing Royal Jelly. **J.AOAC Int.** v. 78, p. 1019 - 1023, 1995.

BOLELI, I.C.; SIMÕES, Z.L.P; BITONDI, M.M.G. Cell death in ovarioles causes permanent sterility in *Frieseomelitta varia* worker bees. **J. Morphol**, v. 242, p. 271-82, 1999.

BOLELI, I.C.; SIMÕES, Z.L.P; BITONDI, M.M.G. Regression of the lateral oviducts during the larval adult transformation of the reproductive system on *Melipona quadrifasciata* and *Frieseomelitta varia*. **J. Morphol.** v. 243, p. 141 – 151, 2000.

BORLONGAN, C.V.; EMERICH, D.F. Facilitation of drug entry into the CNS via transient permeation of blood brain barrier: laboratory and preliminary clinical evidence from bradykinin receptor agonist, Cereport. **Brain Res. Bull.**, v. 60, p. 297–306, 2003.

BROTHERS L. The social brain: a project for integrating primate behavior and neurophysiology in a new domain. **Concepts Neurosci.** v. 1, p. 27–51, 1990.

BROTHERS, L. Friday's Footprint: How Society Shapes the Human Mind. New York: **Oxford University Press.** 1997.

BRUNEAU, G.; GROSS, M.; KRIEGER, M.; BERNHEIM, A.; THIBAUT, J.; NGUYEN, V.C. Preparation of a human dopa decarboxylase cDNA probe by PCR and its assignment to chromosome 7. **Ann. Genet.** v. 33, p. 208-213, 1990.

BURMESTER T, SCHELLER K: Ligands and receptors: common theme in insect storage protein transport. **Naturwissenschaften.** v. 86, p. 468-474, 1999.

BUTMAN, J.; ALLEGRI, R.F. A cognição social e o córtex cerebral. **Psicol. Reflex. Crit.** v. 14, p. 275 - 279, 2001.

BUTTERWORTH, F. M., TYSELL, B., WACLAWSKI, I. The effect of 20-hydroxyecdysone and protein on granule formation in the in vitro cultured fat body of *Drosophila*. **J. Insect Physiol.** v. 25, p.855- 860, 1979.

BYRNE, R.W.; CORP, N. Neocortex size predicts deception rate in primates. **Proc. Biol. Sci.** v. 271, p. 1693 - 1699, 2004.

BYRNE. R.W.; WHITEN. A. Cognitive evolution in primates: Evidence from tactical deception. **Man (N.S)**, v. 27, p. 609-627, 1992.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.E.M. Meliponini Lepeletier, 1836., in J. S. Moure, D. Urban, G. A. Melo, eds., **Catalogue of bees** (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region. 2008.

CANNON, J.R., KEEP, R.F., HUA, Y., RICHARDSON, R.J., SCHALLERT, T., XI, G., 2005. Thrombin preconditioning provides protection in a 6-hydroxydopamine Parkinson's disease model. **Neurosci. Lett.** 373, 189–194.

CANNON, J.R., KEEP, R.F., SCHALLERT, T., HUA, Y., RICHARDSON, R.J., XI, G., 2006. Protease-activated receptor-1 mediates protection elicited by thrombin preconditioning in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Brain Res.** 1116, 177–186

CAVANAUGH K. P., GURWITZ D., CUNNINGHAM D. D., BRADSHAW R. A. Reciprocal modulation of astrocyte stellation by thrombin and protease nexin-1. **J. Neurochem.** v. 54, p. 1735–1743, 1990.

CHAPMAN, R.F. The insects: structure and function. New York, **Cambridge University Press**, 1998.

CHEN Z. L., YOSHIDA S., KATO K., MOMOTA Y., SUZUKI J., TANAKA T. et al. Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. **J. Neurosci.** v. 15, p. 5088–5097, 1995.

CHEN, E.Y.; EMERICH, D.F.; BARTUS, R.T.; KORDOWER, J.H. B2 bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 427, p. 1–18, 2000.

CHOI, S.H., LEE, D.Y., KIM, S.U., JIN, B.K. Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons in vivo: role of microglial NADPH oxidase. **J. Neurosci.** v. 25, p. 4082–4090, 2005.

CHRISTENSON, J.G.; DAIRMAN, W.; UDENFRIEND, S. On the identity of DOPA decarboxylase and 5-hydroxytryptophan decarboxylase (immunological titration-aromatic l-amino acid decarboxylaseserotonin-dopamine-norepinephrine). **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 69, p. 343–347, 1972.

CLAYTON, N.S.; DALLY, J.M.; EMERY, N.J. Social cognition by food-caching corvids. The western scrub-jay as a natural psychologist. **Philos Trans. R Soc. Lond. B. Biol. Sci.** v. 362, p. 507 - 522, 2007.

COHEN-CORY, S.; KIDANE, A.H.; SHIRKEY, N.J.; MARSHAK, S. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. **Developmental neurobiology.** v. 70, p. 271-288, 2010.

CONCHA, M.L.; BIANCO, I.H.; WILSON, S.W. Encoding asymmetry within neural circuits. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 13, 832–843, 2012.

COUTINHO-BUDD, J.C.; SHEEHAN, 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.

COUTO, B.; SEDEÑO, L.; SPOSATO, L.A.; SIGMAN, M.; RICCIO, P.M.; SALLES, A. et al. Insular networks for emotional processing and social cognition: comparison of two case reports with either cortical or subcortical involvement. **Cortex**, v. 49, p. 1420–1434, 2013.

CRUZ-LANDIM, C. Ovarian development in Meliponinae bees (Hymenoptera: Apidae) the effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. **Genetics and Molecular Biology.** v. 23, p. 83-88, 2000.

DALLY, J.M.; EMERY, N.J.; CLAYTON, N.S. Cache protection strategies by western scrub-jays (*Aphelocoma californica*): hiding food in the shade. **Proc. R. Soc. Lond. B.** v. 271, p. 382 - 390, 2004.

DAMASIO A. El error de Descartes. **Santiago, Chile**. Editorial ,Andrés Bello, 1994.

DANTY, E.; ARNOLD, G.; BURMESTER, T.; HUET, J.C.; HUET, D.; PERNOLLET, J.C.; MASSON, C. Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, p. 387–397, 1998.

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, Ca²⁺ oscillations, and the memory gene amnesiac. **Neuron**, v. 30, p. 653-656, 2001.

DAVIS, M.B.; CARNEY, G.E.; ROBERTSON, A.E.; BENDER, M. Phenotypic analysis of EcR-A mutants suggests that EcR isoforms have unique functions during *Drosophila* development. **Devel. Biol.** v. 282, p. 385–396, 2005.

DOBSON-STONE, C.; DANEK, A.; RAMPOLDI, L.; HARDIE, R.J.; CHALMERS, R.M.; WOOD, N.W.; BOHLEGA, S.; DOTTI, M.T. et al. Mutational spectrum of the CHAC gene in patients with chorea-acanthocytosis. **Eur J Hum Genet**, v. 10, p.773-781, 2002.

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

DUNBAR, R.I.; SCHULTZ, S. Understanding primate brain evolution. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.** v.362, p.649–658, 2007.

DUNBAR, R.I.M. Neocortex size as a constraint on group-size in primates. **J. Human Evol.** v. 22, p.469–493, 1992.

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

DUNBAR, R.I.M. The Social Brain: Mind, Language, and Society in Evolutionary Perspective. **Annu. Rev. Anthropol.** v. 32, p. 163-181, 2003.

DUNCAN, J.A.; HOFFMAN, H.J. Intracranial ependymomas. In Kaye AH, Lows ERJ. Brain tumours. **Edinburg: Churchill Livingstone**, p. 493-504, 1995.

ESPINOSA, B.; ZENTENO, R.; MENA, R.; ROBITAILLE, Y.; ZENTENO, E.; GUEVARA, J. Oglycosylation in sprouting neurons in Alzheimer disease, indicating reactive plasticity. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 60, 441–448, 2001.

EYER, M.; DAINAT, B.; NEUMANN, P.; DIETEMANN, V. Social regulation of ageing by young workers in the honey bee, *Apis mellifera*. **Exp. Gerontol.** v. 87, p. 84–91, 2017.

FAHRBACH, S. E. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 209-232, 2006.

FAHRBACH, S. Volume changes in the mushroom bodies of adult honey bee queens. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 2, p. 181–191, 1995.

FAUSTINO, C. D.; Silva-Matos, E. V.; Mateus, S.; Zucchi, R. First record of emergency queen rearing in stingless bees. **Insectes Soc.** v. 49, p. 111-113, 2002.

FESTOFF B. W., SUO Z., CITRON B. A. Plasticity and stabilization of neuromuscular and CNS synapses: interactions between thrombin protease signaling pathways and tissue transglutaminase. **Int. Rev. Cytol.** v. 211, p. 153–177, 2001.

FLEISHER-BERKOVICH, S.; FILIPOVICH-RIMON, T.; BEN-SHMUEL, S.; HULSMANN, C.; KUMMER, M.P.; HENEKA, M.T. Distinct modulation of microglial amyloid beta phagocytosis and migration by neuropeptides (i). **J. Neuroinflamm.**, v. 7, p. 61, 2010.

FOLDI, I.; ANTHONY, N.; HARRISON, N.; GANGLOFF, M. et al. Three-tier regulation of cell number plasticity by neurotrophins and Tolls in *Drosophila*. **J Cell Biol.** v. 216, p.1421-1438, 2017.

FOLLER, M.; HERMANN, A.; GU, S.; ALESUTAN, I.; QUADRI, S.M.; BORST, O.; SCHMIDT, E.M.; SCHIELE, F.; MULLER VOM HAGEN, J.; SAFT, C. et al. Chorein-sensitive polymerization of cortical actin and suicidal cell death in chorea-acanthocytosis **FASEB J**, v. 26, p.1526-1534, 2012.

FREIRE, A.C.G. O código transcricional gerado pelo cérebro sob influência de diferenciais dietários durante o desenvolvimento do sistema nervoso de *Apis mellifera*, **Tese de Mestrado**. Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil, 2012.

GANESHINA, O.; SCHAFER, S.; MALUN, D. Proliferation and programmed cell death of neuronal precursors in the mushroom bodies of the honeybee. **J. Comp. Neurol**, v. 417, p. 349-365, 2000.

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.

GAUTHIER, M. State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in learning and memory. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 681, p. 143–149, 2010.

GAUTHIER, M.; GRÜNEWALD, B. Neurotransmitter Systems in the Honey Bee Brain: Functions in Learning and Memory. Em: Honeybee Neurobiology and Behavior. Ed. **Springer**, Parte III, Cap. 3.3, p. 155-169, 2012.

GNANASEKAR, M.; SULEMAN, F.G.; RAMASWAMY, K.; CALDWELL, J.D. Identification of sex hormone binding globulin-interacting proteins in the brain using phage display screening. **Int. J. Mol. Sci.** v. 24, p. 421-426, 2009.

GREEN, N.; ODELL, N.; ZYCH, M.; CLARK, C.; WANG, Z.H.; BIERSMITH, B. BAJZEK, C., COOK, K.R.; DUSHAY, M.S.; GEISBRECHT, E.R. A common suite of coagulation proteins function in *Drosophila* muscle attachment. **Genetics**, v. 204, p. 1075-1087, 2016.

GRIESHABER, S.; PETERSEN, N. S. The *Drosophila* forked protein induces the formation of actin fiber bundles in vertebrate cells. **J Cell Sci**, v. 112 (Pt 13), p. 2203-2211, 1999.

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

GUEVARA, J.; ESPINOSA, B.; ZENTENO, E.; VÁZQUEZ, L.; LUNA, J.; PERRY, G.; MENA, R. Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** v. 57, p. 905–914, 1998.

GUO, Y. et al. Lateralization of gene expression in the honeybee brain during olfactory learning. **Sci. Rep.** 6, 34727, 2016.

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

HARTFELDER, K.; MAKERT G. R.; JUDICE, C. C.; PEREIRA, G. A. G.; SANTANA W. C.; DALLACQUA, R.; BITONDI M. M. G. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidologie**. v. 37, p. 144-163, 2006.

HATTORI, N.; NOMOTO, H.; FUKUMITSU, H.; MISHIMA, S.; FURUKAWA, S. Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro. **Biomed Res.** v. 28, p. 261–266, 2007.

HAXBY, J.V.; HOFFMAN, E.A.; GOBBINI, M.I. The distributed human neural system for face perception. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 4, p. 223- 233, 2000.

HE X. P., SHIOSAKA S., YOSHIDA S. Expression of neuropsin in oligodendrocytes after injury to the CNS. **Neurosci. Res.** v. 39, p. 455–462, 2001.

HERLYN, H.; ZISCHLER, H. Sequence evolution of the sperm ligand zonadhesin correlates negatively with body weight dimorphism in primates. **Evolution**, v. 61, p. 289–298, 2007.

HERR, P.; KORNIYCHUK, G.; YAMAMOTO, Y.; GRUBISIC, K.; OELGESCHLAGER, M. Regulation of TGF- β signalling by *N*-acetylgalactosaminyltransferase-like 1. **Development**, v. 135, p. 1813–1822, 2008.

HIRATA A., YOSHIDA S., INOUE N., MATSUMOTO-MIYAI K., NINOMIYA A., TANIGUCHI M. et al. Abnormalities of synapses and neurons in the hippocampus of neuropsin-deficient mice. *Mol. Cell. Neurosci.* V. 17, p. 600–610, 2001.

HOLEMANN, A.; SEEBERGER, P.H. Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 15, p. 615 – 622, 2004.

HONISCH, S.; GU, S., VOM HAGEN, M.J.; ALKAHTANID, S.; AL KAHTANED, A.A.; TSAPARA, A.; HERMANN, A.; STORCH, A.; SCHÖLS, L.; LANG, F.; STOURNARAS, C. Chorein Sensitive Arrangement of Cytoskeletal Architecture. **Cell Physiol Biochem**, v. 37, p. 399-408, 2015.

HOWSE, P.E. Brain structure and behavior in insects. **Annu. Rev. Entomol.** v. 20, 359–379, 1975.

HOWSE, P.E. Design and function in the insect brain. In: Barton-Brown L, editor. Experimental analysis of insect behaviour. **Berlin, Germany: Springer**; p. 180–194. 1974.

HUMPHREY, N.K. The social function of intellect. In: Bateson P.P.G, Hinde R.A, editors. Growing points in ethology. **Cambridge University Press**; Cambridge, UK. p. 303–317, 1976.

HUSSAIN A.; ÜÇPUNAR, H.K.; ZHANG, M.; LOSCHEK, L.F.; GRUNWALD KADOW I;C. Neuropeptides Modulate Female Chemosensory Processing upon Mating in *Drosophila*. **PLoS Biol.**, v. 14: e1002455, 2016.

HWU, W.L.; MURAMATSU, S.; TSENG, S.H.; TZEN, K.Y.; LEE, N.C.; CHIEN, Y.H.; SNYDER, R.O.; BYRNE, B.J.; TAI, C.H.; WU, R.M. Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. **Sci. Transl. Med.** v. 4, p. 134–161, 2012.

IFUKU, M.; FARBER, K.; OKUNO, Y.; YAMAKAWA, Y.; MIYAMOTO, T.; NOLTE, C.; MERRINO, V.F.; KITA, S.; IWAMOTO, T.; KOMURO, I.; WANG, B.; CHEUNG, G.; ISHIKAWA, E.; OOBOSHI, H.; BADER, M.; WADA, K.; KETTENMANN, H.; NODA, M. Bradykinin-induced microglial migration mediated by B1-bradykinin receptors depends on

Ca²⁺ influx via reverse-mode activity of the Na⁺ /Ca²⁺ exchanger. **J Neurosci.**, v. 27, p. 13065–13073, 2007.

INSEL, T.R.; YOUNG, L.J. Neuropeptides and the evolution of social behavior. **Curr. Opin. Neurobiol.** v. 10, p. 784–789, 2000.

JARAU, S.; VEEN, J.W.V.; TWELE, R.; REICHLE, C.; GONZALES, E.H.; AGUILAR, I.; FRANKE, W.; AYASSE, M. Workers make the queens in *Melipona* bees: Identification of geraniol as a caste determining compound from labial glands of nurse bees. **Journal Chemistry Ecology**, v.36, p.565-569, 2010.

JASON S. PAPADOPOULOS, J.S.; AGARWALA, R. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences, **Bioinformatics**, v. 23, p. 1073-1079, 2007.

JEFTINIJA, S.D.; JEFTINIJA, K.V.; STEFANOVIC, G.; LIU, F. Neuroligand-evoked calcium-dependent release of excitatory amino acids from cultured astrocytes. **J. Neurochem.**, v. 66, p. 676–684, 1996.

JULIAN, G.E.; GRONENBERG, W. Reduction of brain volume correlates with behavioral changes in queen ants. **Brain Behav Evol** v. 60, p. 152–164, 2002.

KANOST, M.R.; KAWOOYA, J.K.; LAW, J.H.; RYAN, R.O.; VAN HEUSDEN, M.C.; ZIEGLER, R. Insect hemolymph proteins. **Adv. Insect Physiol.** v. 22, p. 299–396, 1990.

KAPHEIM, K.M.; PAN, H.; LI, C.; SALZBERG, S.L.; PUIU, D.; MAGOC, T.; ... Fischman, B.J. Genomic signatures of evolutionary transitions from solitary to group living. **Science**, v. 348, p. 1139-143, 2015.

KAWAKITA, E.; HASHIMOTO, M.; SHIDO, O. Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. **Neuroscience**. v. 139, p. 991–997, 2006.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. Abelha Uruçu: Biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte: **Fundação Acangaú**, p. 143, 1996.

KIM, D.; CHO, S.H.; KIM, J.S.; JO, S.H.; LEE, S.J.; KIM, K.T.; CHOI, S.Y. Human astrocytic bradykinin B(2) receptor modulates zymosan-induced cytokine expression in 1321N1 cells. **Peptides**, v. 31, p. 101–107, 2010.

KLEENE, R.; SCHACHNER, M. Glycans and neural cell interactions. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 5, p. 195–208, 2004.

KOMAI S., MATSUYAMA T., MATSUMOTO K., KATO K., KOBAYASHI M., IMAMURA K. et al. Neuropsin regulates an early phase of schaffer-collateral long-term potentiation in the murine hippocampus. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, p. 1479–1486, 2000.

LADERACH, D.; COMPAGNO, D.; TOSCANO, M.; CROCI, D.; DERGAN-DYLON, S.; SALATINO, M.; RABINOVICH, G. Dissecting the signal transduction pathways triggered by galectin–glycan interactions in physiological and pathological settings. **IUBMB Life**, v. 62, p. 1–13, 2010.

LANDGRAF, R.; FRANK, E.; ALDAG, J.M.; NEUMANN, I.D.; SHARER, C.A.; REN, X.; TERWILLIGER, E.F.; NIWA, M.; WIGGER, A.; YOUNG, L.J. Viral vector-mediated gene transfer of the vole V1a vasopressin receptor in the rat septum: improved social discrimination and active social behaviour. **Eur. J. Neurosci.** v. 18, p. 403–411, 2003.

LEBOYER, M.; PHILIPPE, A.; BOUVARD, M.; GUILLOUD-BATAILLE, M.; BONDOUX, D.; TABUTEAU, F.; FEINGOLD, J.; MOUREN-SIMEONI, M.C.; LAUNAY, J.M. Whole blood serotonin and plasma beta-endorphin in autistic probands and their first-degree relatives. **Biol Psychiatry**, v. 45, p. 158–163, 1999.

LEEB-LUNDBERG, L.M.; MARCEAU, F.; MULLER-ESTERL, W.; PETTIBONE, D.J.; ZURAW, B.L. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol. Rev.** v. 57, p. 27–77, 2005.

LEIMAR, O.; HARTFELDER, K.; LAUBICHLER, M.D.; PAGE-JR, R.E. Development and evolution of caste dimorphism in honeybees a modeling approach. **Ecology and Evolution**, v.2, p.3098-3109, 2012.

- LEPESANT, J. A., KEJZLAROVÁ-LEPESANT, J., GAREN, A. Ecdysone-inducible functions of larval fat bodies in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 75, p.5570-5574, 1978.
- LERCKER, G.; CAPELLA, P.; CONTE, L.S.; RUINI, F. Components of royal jelly: I. Identification of the organic acids. **Lipids**, v. 16, p; 912–919, 1981.
- LEWIS, K, P. A. Comparative Study of Primate Play Behaviour: Implications for the Study of **Cognition**. **Folia Primatol**, v. 71, p. 417-421, 2000.
- LIN N., MICHENER C. D. Evolution of sociality in insects. **Q. Rev. Biol.** v. 47, p. 131–159, 1972.
- LINNARTZ, B.; BODEA, L.; NEUMANN, H. Microglial carbohydrate-binding receptors for neural repair. **Cell Tissue Res.** v. 349, p. 215–227, 2012.
- LISBOA, L.C.O.; SERRÃO, J.E.; CRUZ-LANDIM, C.; CAMPOS, L.A.O. Effect of larval food amount on ovariole development in queens of *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apinae). **Anat. Histol. Embriol.**, v. 34, p. 179-184, 2005.
- LIU, L.; LIU, H.; YANG, F.; CHEN, G.; ZHOU, H.; TANG, M.; ZHANG, R.; DONG, Q. Tissue kallikrein protects cortical neurons against hypoxia/reoxygenation injury via the ERK1/2 pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 407, p. 283–287, 2011.
- LIU, L.; WOLF, R.; ERNST, R.; HEISENBERGET, M. Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. **Nature**, v. 400, p. 753-756, 1999.
- LOZANO, L.; GUEVARA, J.; LEFEBVRE, T.; RAMOS-MARTINEZ, I.; LIMON, D.; DIAZ, A.; CERON, E.; ZENTENO, E. Effect of amyloid-B (25–35) in hyperglycemic and hyperinsulinemic rats, effects on phosphorylation and O-GlcNAcylation of tau protein. **Neuropeptides**, v. 63, p. 18–27, 2017.
- 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.

LUTZ, M.; KNAUS, P. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling networks. **Cell. Signal.**, v. 14, p. 977-988, 2002.

MACLEAN, P.D. The triune brain in evolution: role in paleocerebral functions. **New York: Plenum Press**, 1990.

MADANI, R., HULO, S., TONI, N., MADANI, H., STEIMER, T., MULLER, D., VASSALLI, J.D. Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. **EMBO J.**, v. 18, p. 3007–3012, 1999.

MALUN, D.; MOSELEIT, A.D.; GRUNEWALD, B. 20-hydroxyecdysone inhibits the mitotic activity of neuronal precursors in the developing mushroom bodies of the honeybee, *Apis mellifera*. **J Dev. Neurobio**, v. 57, p. 1-14, 2003.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nat. Rev. Drug Disc.** 3, 845–852, 2004.

MARSHALL, J.A.R. What is inclusive fitness theory, and what is it for? **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 12, p. 103-108, 2016.

MARTINEZ, T.; WHEELER, D. Identification of two storage hexamers in the ant, *Camponotus festinatus*: accumulation in adult queenless workers. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 23, p. 309–317, 1993.

MARTINS, J.R.; NUNES, F.M.F.; CRISTINO, A.S.; SIMÕES, Z.L. The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. **BMC Mol. Biol.** v. 11, 2010.

MASCI, P.P.; WHITAKER, A.N.; SPARROW, L.G.; JERSEY, J.DE.; WINZOR, D.J.; WATTERS, D.J.; LAVIN, M.F.; GAFFNEY, P.J. Textilinins from *Pseudonaja textilis*. Characterization of two plasmin inhibitors that reduce bleeding in an animal model. **Blood Coagul. Fibrinolysis**, v. 11, p.385–393, 2000.

MASSEY JR, H.C.; KEJZLAROVÁ-LEPESANT, J.; WILLIS, R.L.; CASTLEBERRY, A.B., BENES, H. The Drosophila Lsp-1 β gene: a structural and phylogenetic analysis. **Eur. J. Biochem.** v. 245, p. 199-207, 1997.

MAYNARD-SMITH, J.; SZATHMARY, E. The Major Transitions in Evolution. **Oxford: W.H. Freeman**, 1995.

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

MICHENER C. D. The evolution of social behavior in bees. **Proc. Tenth Int. Cong. Entomol.** v. 2, p. 441–447, 1958.

MICHENER, C. D. Observations on the nests and behavior of *Trigona* in Australia and New Guinea. **American Museum Novitates**, v. 2026, p. 1-46, 1961.

MICHENER, C. D. The bees of the world. Baltimore: **The Johns Hopkins University Press**, p. 913, 2000.

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. **Harvard University Press**, Massachusetts. 1974.

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

MODA, L.M.R.; VIEIRA, J.; GUIMARÃES FREIRE, A.C.; BONATTI, V.; BOMTORIN, A.D.; BARÇHUK, A.R.; SIMÕES Z.L. Nutritionally driven differential gene expression leads to heterochronic brain development in honeybee castes. **PLoS ONE**, v. 8, p. e64815, 2013.

MOLINARI F., R.M.; MESKENAITE, V.; ENCHA-RAZAVI, F.; AUGÉ J.; BACQ, D. et al. Truncating neurotrophin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. **Science**, v. 298, p. 1779–1781, 2002.

MONARD, D. Cell-derived proteases and protease inhibitors as regulators of neurite outgrowth. **Trends Neurosci.**, v. 11, p. 541-544, 1988.

MUNN, E.A.; GREVILLE, G.D. The isolation and properties of the protein calliphorin. **Biochem. J** v. 124, p. 367–374, 1971.

MURUGASU-OEI, B.; BALAKRISHNAN, R.; YANG, X.; CHUA, W.; RODRIGUES, V. M. Mutations in masquerade, a novel serine-protease-like molecule, affect axonal guidance and taste behavior in *Drosophila*. **Mechanisms of Development**, v. 57, p. 91-101, 1996.

NAMBIRAJAN, A.; MALGULWAR, P.B.; SHARMA, M.C.; SINGH, A.; PATHAK, P.; SATYARTHEE, G.D.; GARG, A. C11orf95-RELA fusion presente in a primary intracranial extra-axial ependymoma: Report of a case with literature review. **Neuropathology**, v. 36, p. 490-495, 2016.

NICULESCO, M.D.; LUPU, D.S. High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. **Int. J. Dev. Neurosci.** v. 26, p. 627 - 633, 2009.

NOCELLI, R. C. F.; ROAT, T. C.; SILVA ZACARIN, E. C. M.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Social Insects: morphophysiology of the nervous system. In: **E. M. Stewart**. (Org.). Nogueira-Neto, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: **Nogueirapis**, p. 445, 1997.

NODA, M.; KARIURA, Y.; AMANO, T.; MANAGO, Y.; NISHIKAWA, K.; AOKI, S.; WADA, K. Expression and function of bradykinin receptors in microglia. **Life Sci.**, v. 72, p. 1573–1581, 2003.

NOWAK, M. A.; TARNITA, C. E.; WILSON, E. O. The evolution of eusociality. **Nature**. v. 466, p. 1057–1062, 2010.

O'DONNELL, S.; BULOVA, S.J.; DELEON, S.; KHODAK, P.; MILLER, S.; SULGER, E. Distributed cognition and social brains: reductions in mushroom body investment

accompanied the origins of sociality in wasps (Hymenoptera: Vespidae). **Proc. R. Soc.** v. 282, 2015.

O'DONNELL, S.; BULOVA1, S.J.; DELEON, S.; BARRETT, M.; FIOCCA, K. Caste differences in the mushroom bodies of swarm-founding paper wasps: implications for brain plasticity and brain evolution (Vespidae, Epiponini). **Behav Ecol Sociobiol** . v. 71, p. 116, 2017.

OHYA, A; YAMANOI, K.; SHIMOJO, H.; FUJII, C.; NAKAYAMA, J. Gastric gland mucin-specific O-glycan expression decreases with tumor progression from precursor lesions to pancreatic cancer. **Cancer Sci**, v. 108, p. 1897-1902, 2017.

OKA, T.; AKISADA, M.; OKABE, A.; SAKURAI, K.; SHIOSAKA, S.; KATO, K. Extracellular serine protease neuropsin (KLK8) modulates neurite outgrowth and fasciculation of mouse hippocampal neurons in culture. **Neurosci. Lett.** v. 321, p. 141–144, 2002.

OKADA, Y.; WATANABE, Y.; TIN, M.M.Y.; TSUJI, K.; MIKIEYEV, A.S. Social dominance alters nutrition-related gene expression. Immediately: transcriptomic evidence from a monomorphic queenless ant. **Molecular Ecology**, v. 26, p. 2922-2938, 2017.

OKENVE-RAMOS, P.; LLIGMARGAS, M. Fascin, may the Forked be with you. **Fly**, v. 8, p. 157-164, 2014.

OLIVEIRA, M.T. Transcrição diferencial e morfogênese do cérebro adulto de castas de abelhas *Apis mellifera*. 2014. 76f. **Tese deMestrado** - Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL - MG - Instituto de Ciências Biomédicas. Alfenas. 2014.

PACKER, L. The social organization of *Lasioglossum laevissimum* (Dialictus) in southern Alberta. **Canadian Journal of Zoology**, v. 70, p. 1767-1774, 1992.

PANIERI, E.; TOIETTA, G.; MELE, M.; LABATE, V.; RANIERI, S.C.; FUSCO, S.; TESORI, V.; ANTONINI, A.; MAULUCCI, G.; DE SPIRITO, M.; GALEOTTI, T.; PANI, G. Nutrient withdrawal rescues growth factor-deprived cells from mTOR-dependent damage. **Aging (Albany NY)**. v. 2, p. 487 - 503, 2010.

PEZET, S.; MCMAHON, S.B. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. **Annu Rev Neurosci**, v. 29, p. 507-538, 2006.

PFAFFL, M.W. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper- Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 509 - 515, 2004.

PINDON, A.; FESTOFF, B. W.; HANTAI, D. Thrombin-induced reversal of astrocyte stellation is mediated by activation of protein kinase C beta-1. **Eur. J. Biochem.** v. 255, p. 766–774, 1998.

PINTO, L.Z.; HARTFELDER, K.; BITONDI, M.M.G.; SIMÕES, Z.L.P. Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. **Journal of Insect Physiology**, 48(8), 783–790, 2002.

PITNICK, S.; JONES, K.E.; WILKINSON, G.S. Mating system and brain size in bats. **Proc. R. Soc. B.** v. 273, p. 719 - 724, 2006.

POLANOWSKI, A.; WILUSZ, T.; BLUM, S.M.; ESCOUBAS, P.; SCHMIDT, J.O.; TRAVIS, J. Serine proteinase inhibitor profiles in the hemolymph of a wide range of insect species. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 102B, p. 757-760, 1992.

PRADO, E.L.; DEWEY, K.K. Nutrition and brain development in early life. **Nutr. Rev.** v. 72, p. 267 - 284, 2014.

QIU, Y.; YOON, H.J.; JIN, B.R. Molecular cloning and characterization of chymotrypsin inhibitor and chitin-binding protein homologs from the bumblebee *Bombus terrestris*. **J. Indust. Entomol.** v. 25, p. 115–121, 2012.

RACHINSKY, A.; STRAMBI, C., STRAMBI, A.; HARTFELDER, K. Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of Juvenile Hormone and Ecdysteroids in last instar honeybee larvae. **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 79, p. 31 -38, 1990.

RATCLIFFE, J.M.; BROCK, FENTON, M.B.; SHETTLEWORTH, S.J. Behavioral flexibility positively correlated with relative brain volume in predatory bats. **Brain Behav. Evol.** v. 67, p. 165–176, 2006.

READER, S.M., LALAND, K.N. Social intelligence, innovation, and enhanced brain size in primates. **PNAS**, v.7, p. 4436-4441, 2002.

REMBOLD, H. Caste differentiation of the honeybee-Fourteen years of biochemical research at Martinsried. In Eder J and Rembold H (eds). **Chemistry and biology of social insects**. Verlag J. Peperny, Munchen, p. 3–13, 1987.

REMBOLD, H.; HANSER, G. Ueber den Weiselfuttersaft der Honigbiene, VIII. Nachweis des determinierenden Prinzips im Futtersaft der Königinnenlarven. Hoppe-S yler's **Z. Physiol. Chemt**, v. 339, p. 251-254, 1974.

RIGOSI, E., HAASE, A., RATH, L., ANFORA, G., VALLORTIGARA, G.; SZYSZKA, P. Asymmetric neural coding revealed by in vivo calcium imaging in the honey bee brain. **Proc. R. Soc. B.**, v. 282, p. 20142571–20142571, 2015.

ROAT, T. C., & CRUZ-LANDIM, C. DA. Differentiation of the honey bee (*Apis mellifera* L.) antennal lobes during metamorphosis: a comparative study among castes and sexes. **Animal Biology**, v. 61, p. 153–161, 2011.

ROAT, T. C., CRUZ-LANDIM, C. DA. Differences in mushroom bodies morphogenesis in workers, queens and drones of *Apis mellifera*: Neuroblasts proliferation and death. **Micron**, v. 41, p. 382–389, 2010.

ROAT, T. C; CRUZ-LANDIM, C. Temporal and morphological difference sinpost-embryonic differentiation of the mushroom bodies in the brain of workers, queens, and drones of *Apis mellifera*. **Micron**, v. 39, p. 1171-1178, 2008.

ROAT, T.C. Diferenciação do cérebro de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose: estudo comparativo entre castas e sexos. 2008. 253 f. **Tese de Doutorado** - Universidade Estadual Paulista - UNESP Rio Claro - Instituto de Biociência. Rio Claro, 2008.

ROAT, T.C.; Cruz-Landim, C. Mitosis and cell death in the optic lobes of workers, queens and drones of the honey bee (*Apis mellifera*) during metamorphosis. **J.Biosci**, v.35, p.415-425, 2010.

ROBERTS, D. B., WOLFE, J., AKAM. M.E. The developmental profiles of two major haemolymph proteins from *Drosophila melanogaster*. **J. Insect Physiol.** v. 23, p. 871-878, 1977.

ROGERS, L. J.; VALLORTIGARA, G. From antenna to antenna: lateral shift of olfactory memory recall by honeybees. **Plos One**, v. 3, e2340, 2008.

ROGERS, L.J.; VALLORTIGARA, G.; ANDREW, R, J. Divided brains the biology and behaviour of brain asymmetries. New York, NY: **Cambridge University Press**. 2013.

ROMANSKI, L.M.; GIGUERE, M.; BATES, J.F.; GOLDMAN-RAKIC, P.S. Topographic organization of medial pulvinar connections with the prefrontal cortex in the rhesus monkey. **J. Comp. Neurol.**, v. 379, p. 313 - 332, 1997.

ROMANSKI, L.M.; GOLDMAN-RAKIC, P.S. An auditory domain in primate prefrontal cortex. **Nat. Neurosci.**, v. 5, p; 15-16, 2002.

ROSS, E. D. Hemispheric control of facial expression and deceitful behaviours. **American Academy of Neurology, 50th Annual Meeting**, p. 33-52. Minneapolis, Minnesota: USA, 1998.

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

SAIKI, S.; SAKAI, K.; MURATA, K.Y.; SAIKI, M.; NAKANISHI, M.; KITAGAWA, Y.; KAITO, M.; GONDO, Y.; KUMAMOTO, T.; MATSUI, M.; HATTORI, N.; HIROSE, G. Primary skeletal muscle involvement in chorea-acanthocytosis. **Mov. Disord.**, v. 55, p. 848-852, 2007.

SAKAGAMI, S.F. Stingless bees. In: Hermann HR (ed) Social Insects, **Academic Press**, 3rd. New York, pp. 361-423, 1982.

- 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.
- SCHATTON, A.; MENDOZA, E.; GRUBE, K.; SCHARFF, C. FoxP in bees: A comparative study on the developmental and adult expression pattern in three bee species considering isoforms and circuitry. **J. Comp. Neurol.**, v. 526, p. 1589–1610, 2018.
- SCHEINER, R.; BAUMANN, A.; BLENAU, W. Aminergic control and modulation of honeybee behaviour. **Curr. Neuropharmacol.**, v. 4, p. 259–276, 2006.
- SCHERER, L.J.; MCPHERSON, J.D.; WASMUTH, J.J.; MARSH, J.L. Human dopa decarboxylase: Localization to human chromosome 7p11 and characterization of hepatic cDNAs. **Genomics**, v. 13, p. 469–471., 1992.
- SCHIFF D, WEN PY. Uncommon brain tumors. **Neurol. Clin.**, 1995;13:953-974.
- SCHMIDT E.M., SCHMID E., MÜNZER, P., HERMANN, A., EYRICH, A.K., RUSSO, A., WALKER, B., GU, S., VOM HAGEN, J.M.; FAGGIO, C. et al. Chorein sensitivity of cytoskeletal organization and degranulation of platelets. **FASEB J**, v. 27, p. 2799-2806, 2013.
- SHI, Y.; MASSAGUE, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, v. 113, p. 685-700, 2003.
- SHIH, D. F.; HSIAO, C.D.; MIN, M.Y.; LAI, W.S.; YANG, C.W.; LEE, Q.T. Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase (AADC) Is Crucial for Brain Development and Motor Functions. **PLoS ONE**, v. 8, p. e71741, 2013.
- SHIRRAS, A.D., BOWNES, M. CRICKLET: a locus regulating a number of adult functions of *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 86, p. 4559-4563, 1989.
- SIKANDAR, S.; MINETT, M.S.; MILLET, Q.; SANTANA-VARELA, S.; LAU, J.; WOOD, J.N.; ZHAO, Z. Brain-derived neurotrophic factor derived from sensory neurons plays a critical role in chronic pain. *Brain*, **Oxford University Press**, 2018.

SIMPSON, P.B.; MEHOTRA, S.; LANGE, G.D.; RUSSELL, J.T. High density distribution of endoplasmic reticulum proteins and mitochondria at specialized Ca²⁺ release sites in oligodendrocyte processes. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 22654- 22561, 1997.

SMITH, D.F.; MCCLELLAND, A.; WHITE, B.N.; ADDISON, C.F.; GLOVERT, D.M. The molecular cloning of a dispersed set of developmentally regulated genes which encode the major larval serum protein of *D. melanogaster*. **Cell**, v. 23, p. 441-449, 1981.

SNODGRASS, R. E. Anatomy of the honey bee. Whashington: **Cornell University Press**, 1956.

Social Insects: Structure, Function, and Behavior. 1ed. Hauppauge, NY: **Nova Publisher**, p. 105-120, 2010.

STEPHENS, G.J.; MARRIOTT, D.R.; DJAMGOZ, M.B.; WILKIN, G.P. Electrophysiological and biochemical evidence for bradykinin receptors on cultured rat cortical oligodendrocytes. **Neurosci. Lett.**, v. 153, p. 223–226, 1993.

STOPFER, M.; BHAGAVAN, S.; SMITH, B. H.; LAURENT, G. Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. **Nature**, v. 390, p. 70–74, 1997.

SUZUKI, J.; YOSHIDA, S.; CHEN, Z.L.; MOMOTA, Y.; KATO, K.; HIRATA, A. et al. Ontogeny of neuropeptide mRNA expression in the mouse brain. **Neurosci. Res.** v. 23, p. 345–351, 1995.

SWANSON, J.M.; KINSBOURNE, M.; NIGG, J.; LANPHEAR, B.; STEFANATOS, G.A et al. Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis. **Neuropsychol Rev** 17: 39-59, 2007.

TEIXEIRA, L.V. Produção de rainhas em colônia de *Plebeia lucii* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. 2007.

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

TERADA, Y. Contribuição ao estudo da regulação social em *Leurotrigona mulleri* e *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae). **Tese de Mestrado** - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 96 f. 1974.

TERAYAMA R., BANDO Y., TAKAHASHI T., YOSHIDA S. Differential expression of neuropeptide Y and protease M/neurosin in oligodendrocytes after injury to the spinal cord. **Glia**, v. 48, p. 91–101, 2004.

THOMASSON, W. A., MITCHELL, H. K. Hormonal control of protein granule accumulation in fat bodies of *Drosophila melanogaster* larvae. **J. Insect Physiol.**, v. 18, p.1885-1899, 1972.

TOTH, A. L.; ROBINSON, G. E. Evo-devo and the evolution of social behavior. **Trends in Genetics**, v. 23, p. 334-341, 2007.

TRUMAN, J.W. Steroid receptors and nervous system metamorphosis in insects. **Dev Neurosci**, v. 18, p. 87–101, 1996.

VALLORTIGARA, G.; ROGERS, L.J. Survival with an asymmetrical brain: advantages and disadvantages of cerebral lateralization. **Behav. Brain Sci**, v. 28, p. 575–589, 2005.

VAN WIMERSMA GREIDANUS, T.B. Disturbed behavior and memory of the Brattellboro rat. **Ann. New York Acad. Sci.** v. 394, p. 655– 662, 1982.

VANAPHAN, N.; DAUWALDER, B.; ZUFALL, R.A. Diversification of *takeout*, a male-biased gene family in *Drosophila*. **Gene**, v. 491, p. 142-148, 2012.

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.; CRISTINO, A.S.; PINHEIRO, D.G.; BARBIN, F.O.; MODA, L.M.R.; SIMÕES, Z.L.P.; BARCHUK, A.R. Nutritionally-responsive genes in early brain development of honeybees, *Apis mellifera*. In: **Seventh International Symposium on Molecular Insect Science**, 2014, Amsterdam - Programme. Amsterdam: Elsevier, 2014.

- WEAVER, N. Control of dimorphism in the female honeybee. 3. The balance of nutrients: **J. Apic. Res.** v. 13, p. 93-101, 1974.
- WEINSTOCK, G.M.; ROBINSON, G.E.; GIBBS, R.A., et al. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature**, v. 443, p. 931-949. 2006.
- WEST EBERHARD, M.J. The evolution of social behavior by kin selection. **Q. Rev. Biol.** v. 50, p. 1–33, 1975.
- WEST, S.A.; PEN, I.; GRIFFIN, A.S. Cooperation and coompetition between relatives. **Science**, v. 296, p. 72-75, 2002.
- WEST-EBERHARD, M.J. Developmental Plasticity and Evolution. **Oxford University Press**. 2003.
- WHEELER W. M. The social insects. New York, UK: Harcourt, Brace & co., 1928.
- WHITEN, A.; BYRNE, R.W. Machiavellian intelligence II: extensions and evaluations. **Cambridge University Press**; Cambridge, UK, 1997.
- WILSON, D. S.; WILSON, E. O. Rethinking the theoretical foundation of sociobiology. **J. Rev. Biol.** v. 82, p. 327–348, 2007.
- WILSON, E. O. One giant leap: how insects achieved altruism and colonial life. **Bioscience**. v. 58, p.17–25, 2008.
- WILSON, E. O. The insect societies. Cambridge, MA: **Belknap Press of Harvard University Press**, 1971.
- WIRTZ, P.; BEETSMA, J. Induction of caste differentiation in the honeybee (*Apis mellifera* L.) by juvenile hormone. **Entomol Exp Appl**, v. 15, p. 517-520, 1972.
- WOLFER D. P.; LANG R.; CINELLI P.; MADANI R.; SONDEREGGER P. Multiple roles of neurotrypsin in tissue morphogenesis and nervous system development suggested by the mRNA expression pattern. **Mol. Cell. Neurosci.**, v. 18, p. 407– 433, 2001.

WU, J.; ARMSTRONG, T.S.; GILBERT, M.R. Biology and management of ependymomas. **Neuro-oncology**, v. 18, p. 902-913, 2016.

YOUSEF, G. M.; KISHI, T.; DIAMANDIS, E. P. Role of kallikrein enzymes in the central nervous system. **Clin. Chim. Acta.** v. 329, p. 1–8, 2003.

YUAN, H.; VANCE, K.M.; JUNGE, C.E.; GEBALLE, M.T.; SNYDER, J.P.; HEPLER, J.R.; YEPES, M.; LOW, C.M.; TRAYNELIS, S.F. The serine protease plasmin cleaves the amino-terminal domain of the NR2A subunit to relieve zinc inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptors. **J Biol Chem.** v. 284, p. 12862–73, 2008.

ANEXO A – Análises de alinhamento global e alinhamento múltiplo realizados entre as espécies *Frieseomelitta varia*, *Apis mellifera* e *Melipona quadrifasciata*.

Amci

```
>XP_001121077.2 chymotrypsin inhibitor [Apis mellifera] - 85 aa
MTRIIITIFVLLAAIAYSNAYPDGSPENEDVKCDVNEEF TSCGSECVD TCEKPASPICNLKCVIGCQCKPG
FVRNRESKCVLTRDC
```

```
>Amci - Fvar11607-1.2 - modificado/anotado - 81 aa
MINVTVASFHLLLAIVYDLAHPEASHKCGPNEEFKQCGSPCVD TCEKPASPICTLRCEVG
CQCKPGYVRNRQNQCVLTRDC
```

```
>KOX80259.1 Chymotrypsin inhibitor [Melipona quadrifasciata] - 81 aa
MARAVVLLLLLVVAIAYSTLAHPEASQKCGPNEEFKSCGSPCVD TCEKPASPICTLRCEVGCQCKSGYVRN
RQNQCVLTRDC
```

Sequence 1: XP_001121077.2 85 aa

Sequence 2: Amci 81 aa

Sequence 3: KOX80259.1 81 aa

Start of Pairwise alignments

Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 61

Sequences (1:3) Aligned. Score: 61

Sequences (2:3) Aligned. Score: 75

```
MTRIITIFV-LLAAIAYSN-AYPDGSP [5] KCDVNEEFTSCGSECVDTCEKPASPICNLKCVIGCQCKPGFVRNRESKCV 80
MINVTVASFhLLLAIVYD-LAHPEASH KCGPNEEFKQCGSPCVDTCEKPASPICTLRCEVGCQCKPGYVRNRQNQC 76
MARAVVLLL-LVVAIAYSTLAHPEASQ KCGPNEEFKSCGSPCVDTCEKPASPICTLRCEVGCQCKSGYVRNRQNQC 76

LTRDC 85
LTREC 81
LTRDC 81
```

Amd

>XP_006563197.1 alpha-methyl dopa hypersensitive protein [Apis mellifera] - 539 aa

```
MKHHCIIVEKMMIIRTIHIRNNYYNQKLSFSIMETKDFIDFGKAAIELIANYTENLREMNVLPNVEPGYLS
KLLPEEAPQKPESWQEVLDKVERYILPGTTHWNSPNFYAFYPTGNSYPAVIGDLLCNSIGGIGLSWISSP
VCTELEVIVMNWLKGLSLALPDEFLNCNGSRGGGVIEGSASETTLLCCLLTAKEQTVRYIKNLHPEWEEGFI
KAKLVAYTSDQSNSSVEKGAKLASVIMKFLTDEKYLALRGETLLKAVKEDLKNGLIPCCVIATLGTGTGTC
AFDNLKELGPICKEYNIWLHIDAAYAGSAFICPEYRYLMCGIEYADSFNVNAHKWMLINFDCSLLWVKDS
KKFTEAFNVDRILYKHNKPLGDFRNWQISLGRFRSLKVVFLVRLIYIGIEGIQNYIRHTIELAKMFENYV
KSDSRFEMITERSMGLCCFRIKGDCLTKELIDRLTNGKKIFVTAGMCRDKIIVRFVVGCRLSREEDITF
AWREITSHTTEILKSLKHSPVKEESFKSTNDIVTRIECLNLESKTQKIT
```

>Amd - Fvar03401-1.2 - 500 aa

```
MDTKDFIDFGKAVIDFVANYTETLREKNVLPNVEPRYLFNLLPEKAPQKPESWQEVFKDVERYIMPGMTHWNSPQ
FHAFYPTGNSYPAIIGDIIANGFGCIGLSWISSPACTELEMIMMNWLKLLGLPKQFLSSNEGFGGGVIQGSASE
VTLLCLIASREQATLCTKRLHPELDEAIKTKLIAYASDQSNSSVERGALLASVPIRLLPTDDKCALRGETLLKA
VKEDLKKGLIPCCVIANLGTGTCAFDNLVELGPICKEYNMWLHIDAAYAGAAAFACPEYRHLMSGIEYADSFNVN
AHKWLIIQQRYDTIKRNCFRKDSRKLVEACSVDRILYKHKDQGLIPDYRNWQIPLGRFRSLKVVFLVRLYGV
EGIQQYIRRSIQLAEMFENYVKSDSRFELVTERVLSLVCFRMKGD
NQLTQELINRVTVRRKIYIIAATYREKLIVRLVIGSRLTREDDVMFAWNEITSQATEILRTVTPPLEKVSDNSLE
TQLWQNQKV
```

>KOX75704.1 alpha-methyl dopa hypersensitive protein [Melipona quadrifasciata]- 498 aa

```
MDTKDFIDFGKATIDFVANYVETLREKNVLPDVEPRYLFNLLPEKAPQKPESWQEVLDKVERYILPGMTHWISPH
FHAFYPTANSYPAIVGDILCNLSLTCMGLSWIASPACTELEMIMMNWLKLLGLPKQFLSSNEGFGGGVIQGSASE
ITLLCSIAAREQTTLRTRKQLHPDLDEAIKTKLVAYASDQSNSSVERSALLASVPIRLLSTDDKCALRGETLLKA
IKEDLKKGLIPCYVVANLGTGTCAFDNLVELGPICEEYNMWLHIDAAYAGAAAFACPEYRHFMSGVEYADSFNVN
AHKWLININFDCSLLWLKDSRKLVEESCNDRIYKHKDQGLIPDYRNWQISLGRFRSLKVVFLVRLTYGVEGIQQH
IRHDIQLAKMFENYVKSDSRFELVTERSLSLVCFRMKGDNQLTQE
LINCLTARRKIYIVVATYREKLIARFVIGSRLCREEDITFAWDEITSQATEILRSVTPPLEEGSEESLKTRLWQN
QKV
```

Sequence 1: XP_006563197.1 539 aa

Sequence 2: Amd 500 aa

Sequence 3: KOX75704.1 498 aa

Start of Pairwise alignments

Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 83

Sequences (1:3) Aligned. Score: 84

Sequences (2:3) Aligned. Score: 91

```
[31]METKDFIDFGKAAIELIANYTENLREMNVLPNVEPGYLSKLLPEEAPQKPESWQEVLKDVERYILPGTTHWNSPNF 107
MDTKDFIDFGKAVIDFVANYTETLREKNVLPNVEPRYLFNLLPEKAPQKPESWQEVFKDVERYIMPGMTHWNSPQF 76
MDTKDFIDFGKATIDFVANYVETLREKNVLPDVEPRYLFNLLPEKAPQKPESWQEVLKDVERYILPGMTHWISPHF 76

YAFYPTGNSYPAVIGDLLCNSIGGIGLSWISSPVCTELEIVMNWLGKSLALPDEFNLCNGSRGGVIEGSASETLLCL 187
HAFYPTGNSYPAIIGDIIANGFGCIGLSWISSPACTELEMIMMNWLGKLLGLPKQFLSSNEGFGGGVIQGSASEVTLCL 156
HAFYPTANSYPAIVGDILCNSLTCMGLSWIASPACTELEMIMMNWLGKLLGLPKQFLSSNEGFGGGVIQGSASEITLLCS 156

LTAKEQTVRYIKNLHPEWEEGFIKAKLVAYTSDQSNSSVEKGAKLASVIMKFLTDEKYALRGETLLKAVKEDLKNGLIP 267
IASREQATLCTKRLHPELDEAIKTKLIAYASDQSNSSVERGALLASVPIRLPTDDKCALRGETLLKAVKEDLKKGLIP 236
IAAREQTTTLRTKQLHPDLDEAIKTKLVAYASDQSNSSVERSALLASVPIRLSTDDKCALRGETLLKAIKEDLKKGLIP 236

CCVIATLGTGTGTCADFNLKELGPICKEYNIWLHIDAAYAGSAFICPEYRYLMCGIEYADSFNVNAHKWMLI---NFDC-- 342
CCVIANLGTGTGTCADFNLVELGPICKEYNMWLHIDAAYAGAAAFACPEYRHLMSGIEYADSFNVNAHKWLLIiqqRYDtik 316
CYVVANLGTGTGTCADFNLVELGPICEEYNMWLHIDAAYAGAAAFACPEYRHFMSGVEYADSFNVNAHKWLLI---NFDC-- 311

-SLLWVKDSKKFTEAFNVDRYILKHNKPGI-PDFRNWQISLGRFRFSLKVVWVFLRYIGIEGIQNYIRHTIELAKMFENYV 420
rNCFRLKDSRKLVEACSVDRYILKHKDQGLIPDYRNWQIPLGRFRFSLKVVWVFLRLYGVEGIQQYIRRSIQLAEMFENYV 396
SLLWLKDSRKLVESCNVDRYILKHKDQGLIPDYRNWQISLGRFRFSLKVVWVFLRLYGVEGIQQHIRHDIQLAKMFENYV 390

KSDSRFEMITERSMGLCCFRICKGDDCLTKELIDRLTNGKKIFVTAGMCRDKIIVRFVVGCRLSREEDITFAWREITSHTT 500
KSDSRFELVTERVLSLVCFRMKGDNQLTQELINRVTVRRKIYIAATYREKLIVRLVIGSRLTREDDVMFAWNEITSQAT 476
KSDSRFELVTERSLSLVCFRMKGDNQLTQELINCLTARRKIYIVVATYREKLIVRIGSRLCREEDITFAWDEITSQAT 470

EILKSLkhSPVKEESfkSTNDIVTRIE [6]KTQKIit 539
EILRTV--TPPLEKV--SDNSLETQLW QNQKV- 504
EILRSV--TPPLEEG--SEESLKTRLW QNQKV- 498
```

Hexamerin 70b

>NP_001011600.1 hexamerin 70b precursor [Apis mellifera] - 683

```
MIVIMKAGFLFLASLCLLVQAVPNKVADKTYVTRQKNIYELFWHVDQPTVYHPELYQKARTFNLVENLDN
YNDKEAVNEFMQLLKHGMLPRGQVFTMMNKEMRHQAVVLFRLLYSAKTFDVFYNTAVWARFNVNEQMYLY
ALSVAVIHRPDTKLMKLPMPYEVMPLYFNDEVMQKAYNIAMGDTADMKKTYNNIDYLLAANYTGWYLT
KHNVPQRLNYFTEDVGLNHFYFMLNHNYPFMLSNSLNFQIRGEFYFFLHKQVLNRYLLERLSNDMGE
VSYVSLDHP IPTGYPTMRFRNGLAFPQRETGATVPLHMQKYVQMIHDLHTRISTAILDGYVVDVSYGNHV
KLYTKQGLNVLGNIVQNGDSVNVQLYGLDQLLVRKVLGFGYESNVKYQVVPALQMWSTSLRDPVFFSI
YKTILDYHKKYKENLPKYTTEELNFPVGSIESVTVDKLITYFDHFESMLNNGVSIQSHAKANTMIKARQ
YRLNHKPFYHIVVNSDKNVKGMVRIFLGPKYDEFGHEVDLVHNYMFMQMFVNVNLKSGSNTIERNSH
ESVVFVPDEVPSDVLNRLVVSSEDGSETFKYSSQPYGFPERLLLPGKKEGMPYNVVLVVSPFDDSNVQ
IDSPVWGRHIYDGRAMGFPLDKPVDPLLLVLSNIHVKEVLVHHREMEELNVAL
```

>Hex70b - Fvar11973-1.2 modificado/ anotado - 681 aa

```
MKLALVILASFCLLAQAVQQLPSQVADKTYLVRQKNIYELFWHVDQPTVYHPELYQKART
FNILENVANYNDQKAVKEFVQLLNHGMLPRGQVFTMMNREMRHQAVVLFVLLSAKTFDM
FYHTAVWARFNVNELMYVYSLSIAMIHRPDRMMKLPMPYEVVPHLFFNDVVMQRSYNIA
MGDTAGVKKTVGGVEYYVLPANYSGWYTRHNQPEQRLNYLTEDVGFNSFYFMINHDHPP
```

FMPASMLNTPQPRGEYFFIHKQLLNRYNLERLSHNMGEINYVNVNRPIMTGYYPTMHLR
NGVSFTQRRGTIVPSHMQRHVQMLQDLHTRLSNAIDAGFVLDSQGNRVNIYTKDGLNIL
GNLVQGNADSVNLQYYGQLDLLMRKVFGLGSESNIRYQVPSALHLWSTSMRDPVVFISIY
KTILDYHRYKENLPKYTMEELSFPGVAVQSVTVDKLTTYFDHFESMLNNGMSVRSKKEA
RNTLIKARQYRLNHKPFYHITVNSDRDTRSVVRIFLGPKQDEFEGHEVDLIANYMFMQM
DEFLVDLKTGTNTIDRSSHESIFVVPDETPSDVLYKKLVTSLSEGEVFKYSTQPYGFPDR
LILPRGTDKGMYPYNLLVMSPVDESNLVHIESPIWGRITSDGRPMGFPLDRPLNPLVNPV
NMHVTEVLVHHRDVEELNATV

>KOX67353.1 Hexamerin, partial [Melipona quadrifasciata] - 686 aa

IMAIMKLALVILASFCLLAQAVQQQLPSQVADKTYLVRQKNIYELFWHVDQPTVYHPELYQKARTFNILEN
VANYNDQEAVKEFVQLLNHGMLPRGQVFTMMNREMRHQAVVLFRLVLSAKTFDVFYHTAVWARFNVNELM
YVYSLVAIIHRPDTRMMKLPPMYEVVPHLFFNDVDMQRTYNIAMGDIAGVKKTVGGVEYYVLPTNYSGW
YTIRHNQPEQRLNYLTEDVGFNTFYFMINHDHPPMPASMLNTPQTRGEYFFIHKQLLNRYNLERLSHN
MGEISYVSVNRPIMTGYYPTMHRNGVSFSQRKIGTVVPIHMQKHVQMIQDLHTRISNAIDAGFILDSQG
NRVNIYTKDGLNILGNLVQGNADSVNLQYYGQLDVLMRKVFGLGYESNIKYQVPSALHLWSTSMRDPV
FSIYKTIILNYHRYKENLPRYTTEELSFPGVNIQSVTVDKLTTYFDHFESMLNNGVSVRSKKEARNTLIK
ARQYRLNHKPFYHITVNSDRDTKGIVRIFLGPQQDEFEGHEVDLINNYMFMQMDEFLVDLKTGTNTIDR
SSHESIFVVPDETPSDVLYKKLVTSLDGGETFKYSTQPYGFPDRLILPKGTDKGMYPYNLLIVVSPVDES
NVHIESPIWGRITNDGRPMGFPLDRPLNPLVINVPNMHVTEVLVHHRDVEELNATI

Sequence 1: NP_001011600.1 683 aa

Sequence 2: Hex70b 681 aa

Sequence 3: KOX67353.1 686 aa

Start of Pairwise alignments

Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 72

Sequences (1:3) Aligned. Score: 73

Sequences (2:3) Aligned. Score: 93

MIVIMKAGFLFLASLCLLVQAV---PNKVADKTYVTRQKNIYELFWHVDQPTVYHPELYQKARTFNLVENLDNYNDKEAV 77

---MKLALVILASFCLLAQAVQQQLPSQVADKTYLVRQKNIYELFWHVDQPTVYHPELYQKARTFNILENVANYNDQKAV 76

IMAIMKLALVILASFCLLAQAVQQQLPSQVADKTYLVRQKNIYELFWHVDQPTVYHPELYQKARTFNILENVANYNDQEAV 80

NEFMQLLKHGMLPRGQVFTMMNKEMRHQAVVLFRLVLSAKTFDVFYHTAVWARFNVNEQMYLYALSVAVIHRPDTKLMKL 157

KEFVQLLNHGMLPRGQVFTMMNREMRHQAVVLFRLVLSAKTFDMFYHTAVWARFNVNELMYVYSLSIAMIHRPDTRMMKL 156

KEFVQLLNHGMLPRGQVFTMMNREMRHQAVVLFVRLHSAKTFDVFYHTAVWARFNVNELMYVYVSLVAIIHRPDTRMMKL 160

PPMYEVMPHLYFNDEVMQKAYNIAMGDTADMKKTYNNIDYLLAANYTGWYLTKHNVPEQRLNYFTEDVGLNHFYFMLNH 237

PPMYEVVPHLFFNDVDMQRSYNIAMGDTAGVKKTVGGVEYYVLPANYSGWYTTRHNQPEQRLNYLTEDVGFNSFYFMINH 236

PPMYEVVPHLFFNDVDMQRTYNIAMGDIAGVKKTVGGVEYYVLPNTYSGWYTIRHNQPEQRLNYLTEDVGFNTFYFMINH 240

NYPPFMLSNSLNFPQIRGEFYFFLHKQVLNRYYLERLSNMGEVSYVSLDHP IPTGYPTMRFRNGLAFQPQRETGATVPL 317

DHPPFMPASMLNTPQPRGEYFFFIHKQLLNRYNLERLSHNMGEINYVNVNRPIMTGYPTMHLRNGVSFTQRRGTGIVPS 316

DHPPFMPASMLNTPQTRGEYFFFIHKQLLNRYNLERLSHNMGEISYVSVNRPIMTGYPTMHLRNGVSFSQRKIGTVVPI 320

HMOKYVQMIHDLHTRISTAI DLGYVVD SYGNHVKLYTKQGLNVLGNIVQGN GDSVNVQLYGQLDLLVRKVLGFGYESNVK 397

HMQRHVQMLQDLHTRLSNAIDAGFVLD SQGNRVNIYTKDGLNILGNLVQGNADSVNLQYYGQLDLLMRKVFGLGSESNIR 396

HMOKHVQMIQDLHTRISNAIDAGFILDSQGNRVNIYTKDGLNILGNLVQGNADSVNLQYYGQLDVLMRKVFGLGYESNIK 400

YQVVPSALQMWSTSLRDPVFFSIYKTILDYHKKYKENLPKYTTEELNFP GVSIESVTVDKLIITYFDHFESMLNNGVSIQS 477

YQVVPSALHLWSTSMRDPVFSIYKTILDYHRYKENLPKYTMEELSFP GVAVQSVTVDKLTTYFDHFESMLNNGMSVRS 476

YQVVPSALHLWSTSMRDPVFSIYKTILNYYHRYKENLPRYTTEELSFP GVN IQSVTVDKLTTYFDHFESMLNNGVSVRS 480

HAKAKNTMIKARQYRLNHKPFYTHIVVNSDKNVKGMVRI FLGPKYDEFGHEVDLVHNYMFMQMDEFVNLKSGSNTIER 557

HKEARNTLIKARQYRLNHKPFYTHITVNSDRDRTRSVVRI FLGPKQDEFGHEVDLIANYMFMQMDEFVLDLKTGTNTIDR 556

HKEARNTLIKARQYRLNHKPFYTHITVNSDRDTKGIVRI FLGPQQDEFGHEVDLINNYMFMQMDEFVLDLKTGTNTIDR 560

NSHESV FVVPDEVP SDVLYNRLV VSEDGSETFKYSSQPYGFFERLLL PKGKKEGMPYNV LVVVS PFDDSNV VQIDS PVWG 637

SSHESIFVVPDETPSDVLYKKLVTSLESGEVFKYSTQPYGFPDR LILPRGTDGMPYNLLVMVSPVDES NLVHIESPIWG 636

SSHESIFVVPDETPSDVLYKKLVTSLDGGETFKYSTQPYGFPDR LILPKGTDGMPYNLLIVVSPVDES NLVHIESPIWG 640

RHIYDGRAMGFPLDKPVDPLLLVLSNIHVKEVLVHHREMEELNVAL 683

RITSDGRPMGFPLDRPLNPLV-NVPMHVTEVLVHHRDVEELNATV 681

RITNDGRPMGFPLDRPLNPLVINVPNMHVTEVLVHHRDVEELNATI 686

Hexamerin 70c

>NP_001092187.1 hexamerin 70c precursor [Apis mellifera] - 686 aa

MLSKVVLLVALAAICGAQGAS YAGRHTADMDFLHKQKKIFD LLLYVRQADLS DAEWYDVGRNYDMESNMD

MYKDKNVVQKFLWYKQGMFLSRNAIFTPLNSEQKYEV RMLFELLYNAKDFQTFYKTA AWARLRMNSGMF

TTAFSIAVLYRDPDKYMKFP AIYEIYPNYFFDSSVIEEAQNLKMSRGSSVVTGMN NIETYIVNTNYSSKN

MREYNDPEYKLDYFMEDVELNAYYYMREMLPYWSSSQYHMPKEIRGQLYYFLHKQLMTRYFLERMSND

LGKTAEFDWNKPI NSGFYSTIMYSNGVTFPQRNRFS SLPYKYKYLNVINALEMRLMDAIDSGYLIDEYG

KKIDIYTPEGLNMLGNVIEGSSDSINTKFGMYDILARDILGYNFDFQNKNNLIP SALQSYSTSMRDPAF

YMLYQNILSYFLRYKKLQPQYSQSELQMPGVKFESVNI DKLYTYFDKCDTLINNAVAVENFKGGMYLR LK

ARRACMNYERFTYKININSDKETKGMRIFLGPAFDEIKHDMVYLQKYFYLFMEMDRFAVTLRPGSNSIE
RQSSESPFTTSTIMPSDIFYDKLNKAIGGSEPFTYSEKMLGFPERLILPRGKPEGMRYSKMFSSMDES
NTKSYEIPLYGKMTLDDKVFGLDRPMWAWNFTIPNMYFKDVFIYNRPNEESMNY

>Hex70c - Fvar11973-1.2 modificado/ anotado - 686 aa

MVKLTLLVALLGAICVVCASLAGTRTADMDFLHKQKKIFDLLLLYMKQTDLSDAEWYDTG
RNYNVEITNIDMYRDKNVVQKFLWWWKQGMFLDQGAIFTPFNSEQKYEMKMLFELFYNAKD
FQTFYKTASWARIHTNNGMFTSAFTAALVLRNDCRYIRLPAIYEIYPNYFFDSGVIEEAQ
NLKMSRSGSAAAGMNNIETYLVMANYSSKYMTPYMDEEYKLDYFMEDVGINAYYYYMRQM
FPFWMPSSKYSMPKDIRGQLYFFHQQLLARYFLERMSNGLGKIEDFDWNKPIYPGYST
MTYLNQVHFPQRDRFSAIPYKYKYLKEINALEFRIMNAIDSGYMLSETGKRLDLYTSEG
LNMLGNVIEGNADSCNNRFYGYDALARDILGFNDFQNKVKVIPSVLQSYSTSMRDPAF
YMLYKKIVSYFLRYKKFQPQYSQSELQLPGVKFESVNIDKLYTFFDTCDTLINNAVSVEN
FKGGLYPRLKARRACLNYQPFTYNINIKSDKELKGTLRIFLGPAPFDEVKQDAIYLQKYF
YFVEMDRFPVKLRPGSNSIERHSSSEFFTAPKQMSSEQYYEKLNKAISGSEPFTYTERIF
GFPERLTLPRGKPEGMRFKMFFFLSPLEEGGINTYELPLIGKLYDGRPFGLDRPTWW
NFTIPNMYFKDVYIYNRPYEKEKLN

>KOX67352.1 Arylphorin subunit alpha [Melipona quadrifasciata] - 755 aa

MLKLTLLVALLSAICVVHGASLAGTRTADMDFLHKQKKIFDLLLLYVKQTDLSDAEWYDIGRNYNVESNID
MYKDKNVVQKFLWWWKQGMFLARDAIFTPFNSEQKYEMKMLFELFYNAKDFQTFYKTASWARIQMNGMF
TSAFTVAVLYRNDCRYMRLPAIYEIYPNYFFDSGVIEAQNLMKSRGFSAAAGMNNIETYLVMANYSSNY
MMPYMDEEYKLDYFIEDVGINAYYYYMRQMFPFWMSKYSMPKEIRGQLYFFHQQLLARYFLERMSNG
LGKIEDFDWNKPIYPGYSTMTYLNQVHFPQRDRFSAIPYKYKYLKEINALEFRIMSAIDSGYLLDETG
KKINLYTPEGLNMLGNVIEGNADSCNSRFYGYDALARDILGFNLDFQNKVKVIPSVLQSYSTSMRDPAF
YMLYKKIVSYFLRYKKFQPQYSQSELQLPGVKFESVNIDKLYTFFDTCDTLINNAVSVENFKGGMYLRK
ARHACLNYQPFTYNINIKSDKELKGTLRIFLGPAPFDEVKQDAIYLQKYYSYFVEMDQFVFLAATLSVT
VFTAPRQMSSEQYYEKLNKAISGSEPFTYSERMFGFPERLTLPRGKPEGMRFKMFFFLSPLEGGGINTYE
LPMIGKVITYDGRPFGLDRPTWSWNFTIPNMYFKDVYCLHLSNDLISEKLERLKNRESEAFPDVLGVS
VKYWPAKHNSANLQRCIFSDLDNLDFTKYANKNVRFAGITVFPSSRLTKARIAED

Sequence 1: NP_001092187.1 686 aa

Sequence 2: Hex70c 686 aa

Sequence 3: KOX67352.1 755 aa

Start of Pairwise alignments

Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 73

Sequences (1:3) Aligned. Score: 72

Sequences (2:3) Aligned. Score: 89

```

MLsKVVLLVAL-AAICGAQGASYAGRHTADMDFLHKQKKIFDLLLYVRQADLSDAEWYDVGGRNYDMESNMMDYKDKNVVQ 79
MV-KLTLLVALLGAICVVCASLAGTRTADMDFLHKQKKIFDLLLYMKTDLSDAEWYDTGRNYNVETNIDMYRDKNVVQ 79
ML-KLTLLVALLSAICVHVGASLAGTRTADMDFLHKQKKIFDLLLYVKQTDLSDAEWYDIGRNYNVESNIDMYKDKNVVQ 79

KFLWVYKQGMFLSRNAIFTPLNSEQKYEVRMLFELLYNAKDFQTFYKTAAWARLRMNSGMFTTAFS IAVLYRPDTKYMKF 159
KFLWVYKQGMFLDQGAIFTPLNSEQKYEVRMLFELLYNAKDFQTFYKTASWARIHTNNGMFTSAFTAALYRNDCRY IRL 159
KFLWVYKQGMFLARDAIFTPLNSEQKYEVRMLFELLYNAKDFQTFYKTASWARIQMNGMFTSAFTVAVLYRNDCRYML 159

PAIYEIYPNYFFDSVIEEAQNLMKSRGSSVVTGMNNIETYIVNTNYSKKNMREYNDPEYKLDYFMEDVELNAYYYYMR 239
PAIYEIYPNYFFDSVIEEAQNLMKSRGSGAAAGMNNIETYLVMANYSKYMTPYMDEEYKLDYFMEDVGINAYYYYMRQ 239
PAIYEIYPNYFFDSVIEEAQNLMKSRGSAAGMNNIETYLVMANYSKYMTPYMDEEYKLDYFIEDVGINAYYYYMRQ 239
MLPYWSSSQYHMPKIRGQLYFFLHKQLMTRYFLERMSNDLKGTAEDFNKPIINSGFYSTIMYSNGVTFFPQRNRFSSLP 319
MFPFWMPSSKYSMPKDIRGQLYFFHQQLLARYFLERMSNGLKIEDFDWNKPIYPGYYSTMTYLNGLVHFPQRDRFSAIP 319
MFPFWMPSSKYSMPKIRGQLYFFHQQLLARYFLERMSNGLKIEDFDWNKPIYPGYYSTMTYLNGLMHFPQRDRFSAIP 319

YYKYKLVNINALEMRLMDAIDSGYLIDEYGGKIDIYTPPEGLNMLGNVIEGSSDSINTKFGYMDILARDILGYNFDFQN 399
YYKYKLVNINALEFRIMNAIDSGYMLSETGKRLDLYTSEGLNMLGNVIEGNADSCNNRFYGYMDALARDILGYNFDFQN 399
YYKYKLVNINALEFRIMSAIDSGYLLDETGGKINLYTPEGLNMLGNVIEGNADSCNSRFYGYMDALARDILGYNFDFQN 399

KNNLIPSAQSYSTSMRDPAFYMLYQNILSYFLRYKQLQPYQSQSELQMPGVKVFESVNIIDKLYTYFDKCDTLINNAV 479
KNKVIQSVLQSYSTSMRDPAFYMLYKIVSYFLRYKQLQPYQSQSELQMPGVKVFESVNIIDKLYTYFDKCDTLINNAV 479
KNKVIQSVLQSYSTSMRDPAFYMLYKIVSYFLRYKQLQPYQSQSELQMPGVKVFESVNIIDKLYTYFDKCDTLINNAV 479

NFKGGMYLRLKARRACMNYERFTYKININSDKELKGLTRIFLGPAPFDEIKHDMVYLQKYFYLFMEMDRFAVTLRPGNS 559
NFKGGMYLRLKARRACMNYERFTYKININSDKELKGLTRIFLGPAPFDEIKHDMVYLQKYFYLFMEMDRFAVTLRPGNS 559
NFKGGMYLRLKARRACMNYERFTYKININSDKELKGLTRIFLGPAPFDEIKHDMVYLQKYFYLFMEMDRFAVTLRPGNS 559

ERQSSESPFTTSTIMPSDIFYDKLNKAIGGSEPFYSEKMLGFPERLILPRGKPEGMRKMFLLSSMDESNTKSYEIP 639
ERHSSESPFTTAPKQMSSEQYKLNKAISGSEPFYTERIFGFPERLTLPRGKPEGMRKMFLLSPLLEGGINTYELPL 639
-----TVFTAPRQMSSEQYKLNKAISGSEPFYSERMFGFPERLTLPRGKPEGMRKMFLLSPLLEGGINTYELPL 639

YGKMTLDDKVFVGFPLDRPMAWNTIPNMYFKDV IYNRPNE- ESMNY 686
IGKLYDGRPFVGFPLDRPTW-WNFTIPNMYFKDV IYNRPYEK EKLNY 686
IGKLYDGRPFVGFPLDRPTW-WNFTIPNMYFKDV [15] LKNRESE [30] DNLD [29] 755

```

Hexamerin 110

```

>NP_001094493.1 hexamerin 110 precursor [Apis mellifera] - 1010 aa
MRYFIIILLALVALGVCAPNVKQRAADQDLLNKQQDVIQLLQKISQPIPNQELQNLGASYDIESNSHQYKN
PIIVMYAGAVKAGLVQPQGTTFNSISQLRKEVSLLYRILLGAKDYQTFKTAAWARVHVNEGQFLKAF
VAAVLTRQDTQSVIFPPVYEILPQHHLDSRVIQEAQNIAIQNTQGKNNQQNIIIPVNY SALLSHDEQQLS
YFTQDIGLAAYYAQVNLAGYIQEQNQQQQQQPLTQQQYQQQIVGKYLQQQAGQQDQQANIGRGAQYLYLH
QQLLARYELNRLSNGLGPIKDIDYENVQSLYQPHLRGLNGLEFAGRPQNLQLQSQRNQLIQYVATLEKRL
RDAIDSGNVITPQGVFLSLYQPQGMNIGDLIEGTGRSVNPRYYSGLQAAARKLLGNAPEVENIWDYTPS
SLELGEVAVHDPVFYQLYKVMNLYQQYQQSLPVYQYNDLILPGVTIQNVDSQLVTLFTDFYVDLDAVT
GHQSQQQQEEQTSRVRHLKRLDHQPYQYKIAVHSEQNVPGAVVRVFLGPKHHDHQRPI SISKNHFLV
ELDQFIQNLHAGENTIIRNSQQAPGQSPDWPSTSIQIRGVNAAIRSQEPFYITEPHQIFSFPARLSLPKG
QPQGFPLQFLVVISSSNPLNVPYGPVPIEQSLTYQDQQYQVVSVEQYQQQLKEQGQISQVGGGIQQNVEVL
PENLVNAQQQVQAVRNYYANLYTKYHGQYPNTQIQNPVGGQDMTYSVQGVGVNAGGWLQGGNSWSQQ

```


LVFHHGQPINDITQP

Sequence 1: NP_001094493.1 1010 aa

Sequence 2: Hex110 926 aa

Sequence 3: KOX79856.1 855 aa

Start of Pairwise alignments

Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 68

Sequences (1:3) Aligned. Score: 65

Sequences (2:3) Aligned. Score: 78

```

MRYFIILLALVALGVCAPNVKQRAADQDLLNKQDDVIQLLQKISQPIPNQELQNLGASYDIESNSHQYKNPIIVMYIYAGA 80
MRFLIILSALVALGVYGSVSQQQAANQDLLNKQDDVIQLLQKISQPIPNQELQNLGETYDIESNSHQYNNPIIVKYIVSA 80
MRFLIILSALIALGACGSVNQQ-AAQDLLKKQDDVIQLLQKISQPIPNQELQNLGETYDIESNSHQYNNPIIVKYIVGA 79

VKAGLVQPQGTTFNSNISQLRKEVSLLYRILLGAKDYQTFLKTAAWARVHVNEGQFLKAFVAAVLTRQDTQSVIFPPVYE 160
VKAGLVQPQGTIHSVVSQLRKEVSLLYRILLGAKDYLTFLKTAAWARLHVNEIQFVKALIGAVLTRPDTRGVILPPIYE 160
VKAGLVQPQGTVYSQVVSQLRKEISLLYRILLGAKDYLTFLKTAAWARLHVNEVQFAKALIVAVLSRPDTKGVILPPIYE 159

ILPQHHLDSRVIQEAQNIAIQNTQKGNNQqNILIPVNSALLSHDEQQLSYFTQDIGLAAYYAQVNLAGYIQEQN QQ 237
ILPQYHLDRVIQEAQNIAIQRLLQGGNNQ-NIVI PVNHSALLSQEEQRVSYFTQDVGLAIFYGYVSLVGGILSEQ [5] QQ 241
IFPQYHLDRVIQEAQNIAIQGLQGGNNQ-NIVI PVNHSALLSQEEQQVSYFTQDVGLAIVYYSYIKLVGDILSE- -- 232

QQQQPLTQQQYQQQIVGK--YLQQQAgQQDQANIGRGAQYLYLHQQLLARYELNRLSNGLGPIKIDYENVQSLYQPHL 315
QQQQPLNQQQYQQQIVGR--YLQQGV-QNDQQSANGLAGAYLFLHQQLLALYELNRLSNGLGPVPEINLENVNALYQPHL 318
----PHLRGLNGLQLLGRpeILQLQP-QKNK-----LIQHVMSLIQRKIDSIDSGNVITPQ---GNFSLYQFQG 294

RGLNGLEFAGRPNLQLQSQRNQLIQYVATLEKRLRDAIDSGNVITPQGVFLSLYQFQGMNIGDLIEGTGRSVNPRYYG 395
RGLNGLQLPGRPEILQLQPHKKELIQHVTSLQLRLKDAIDSGNVITPQGNFSLYQFPHGRNIGDLIQSGSRISINPRYYG 398
RNILG-----DLIQ-----GSGRSINPR--YYSLELAARKLLGN----- 327

SLQAARLKLGNAPVENIWDYTPSSLELGEVAVHDPVFYQYLYKVMNLYQQYQSLPVYQYNDLILPGVTIQNDV-SQ 474
SLEVAARLKLGNAPVQNIWDYTPSVLEIKQSSVYDPAFYQLFKVINLYQRYQSLPVYQSDLILPVQAGQNVIIrNS 478
-----TPEVQNIWDYTPSVLEIEQCNVYDPAFYQLLKKIMNLYQQYQSLPAYQSDLILPGVTIQDQDV-SQ 394

LVTL [12] GHQSQQQEEQTQSRV RAHLK -----RLDHQPYQYKIAVHSEQNVPGA-----VVRVFLGPK 542
QQAS GQSADLPSTSQIVQGV NAAIR SQHPFFITQPHHIYSFPARLSLPRGLPQGLPLQLLVISSSNPL 547
LSTL AKTLLLETPSKLLDRV [10] KASML [4] STHSSSLRFPHHIYSFPARLSLPRGQPQGLPLQLLVISSSNPL 477

HDHQG-----RPISISKNHFLVELDQFIQNLHAGENTIIRNS-QQAPGQSPDWPSTSQIQRG---VNAAIRSQEPFYIT 613
NMPHGVPVPEQELTYQAHQFQIVNTEQYQQQLNQGGQVSQLGGGLQQNVEVLPEGLVNAQQQIE-----AIRLQNAHIHT 621
NMPYGPVVPPEQELTYQAHQFQIVNAEQYQLKQQGQLSQLGGGLQQNVEVLPEGLVNAQQQIEgalYSNTVRNQNAHIYT 557

EPHQIFSFpaRLSLPKGQPQG-FPLQFLVVISSSNP [10] EQSLTYQDQYQVVSVEQYQQLKEQGQI--SQVGGG-IQQ 695
KYHGHSM--QLQNP IGGQN-MGIQGGVNVNAGGS SSGIQSWGSGLSGISVQNNQQMQQQAQQVQQQIQAA-VQQ 693
RYH--SNM--QIQNPVGGQGNwMGIQGGVNVNAGGS S-GVQSWGSGLSDIPVQNNQQMQQQPQQAAQQQIQAA-tVQQ 628

NVEVLPEN-LVNAQQQ [13] KYHGQYPN [35] WSQQVqQAQQVQQQMQAAMA -AVQQSQQR [4] AQMIYGHQ [28] 835
GQKNLSGQ-IWNAQQQ HSHGQHVN WSPSN--SAQSVSQQSQGV- QGVQGGIQG VQGVQGVQ 751
GQQSQSGQmIWNAQQQ QSHGQHVN WSPSN--SAQSVSQQSQRGLS [5] QGVQQLQH VQGVVGLQ 693

GVQGVQ--QGVQGVQTAQ-GVQG-VQGVQGVQ-GVQGVQGVQG VPGLLQGVQqvfgQGVQGMN [5] QRQSGGGQTSW 909
GVQGVQ--QGVQGVQGVQGVQGVQ-VQGVQGAQQGVQGVQGVQ VQGLLQGIQ---QGGIQGLG QGILQGGLLQS 819
GVQGVQgvQGVQGVQGVQGGIQGsAQGV--LQVGVQSQGVQ [5] VMQGVQGIS---GG----- 750

NSQ-VQGV----AVPGSGIVASGQQHAGGWQSIYAQPQTVDQIVSEYYQNKPISEVIGGAIISLDGKPLGFPDRPLSLG 984
HQQGVQGVQSGGVSNSIVASGQQHAGGFQGVYAESHTLQDPSVIEYYQNRPISEIIGGAIISLDGKPLGFPPLERPLSSG 899
--QSGSNVQIQGGVSGSNIVASGQQHAGGFQGVYAESQTVQDPSVIEYYQNKPISEIIGGAIISLDGKPLGFPPLERPLSPG 828

ALSVPNIFVKDVLVHHGQPPTNDITQ- 1010
ALSVPNIFVKDVLVHHGQPPTNDITQP 926
ALNVPNIFVRDVLVHHGQPINDITQP 855

```

Forked - sugestão espin-like

>XP_016772893.2 uncharacterized protein LOC409402 isoform X1 [Apis mellifera] - 787 aa

MGIHETSETHCTNVTGRMARDRCGSEYSENMSDVTTCSCOTTSSADKCSLRGCGMFQEPFFLHPPGSRPRD
GIYINPMSAYISEPVKPKDTESEFYLHSPHDLVYTRITRLFADTEKHRHFEKKDETLTVSVPVKVDVHFNN
GVLDRPLNENGYTNKSEMGQEPSEHAYEQICLRQSDTGGIVSSSQKKLDNTSDRSRSRKTDRRYSRSSS
ASESSNISSEIPCFSSSASTPSLSRNSSNERVGKNGKLSIESSYEKENSTKSSQVESEKEIKPVNGGANF
AKPPPPPPPPPLPKEDIVVLMVNTKQNAELTAKEEKRDASGDANRNGRSENGSVPSTAINKSDVSCGER
QQPEVPPASPPADTEEIKTSQTAHLVNKHMVLPFI PPKFANADSNTLLKPSEYLKSICKVSTKSNLLKAR
SVDNLDIQSRSGDRRENCIRSEGIEDQEPEILVVAATEGERERRGVEEEEERIIVEEEKELTAGPPPPMMS
PLQKLRRTNEESGMIANVDLES PKTPQPLATISIQDLTSIQLRRTTTKMNATKTF SAPP PRSVSMTNVSE
SFFIQKTDLIAELKRTKDIPGIKKLVEMAQVEKTQE QNLMSEINKVFVNSNFVDQIPEKDSSGNVPIPIW
KRQMLARKAAERAKKELEEQIARENEERRQKAI PAWKRQLLAKKDNEEKRLSQAHVMP TFKVDATPSPRR
DVSPSPNPSNPN
PWRAQLRKTTSKLNILD

>Forked - Fvar02717-1.2 542 aa

MSYLMSSRYETQPVYTCIVDQTRAPSAEHRPATDTSICRIDFSRPRKTD RRYSRSSSASE
SSNVSSSEVPCFSSSASTPSLSRNSSNERERKNGKLPVVESSSHEKKHPSNLSSQVESEKE
TRSANGGAILARPPPPPPPPPPPLPKEDVVVLVNAKQNT EPTARDEKRDVFG EANRNGR
SENLPSSSTAVNKSDASCGEHQPEVPPASPPADTEEIKTSQTSHLVNKHMVLPFI PPKF
ANADSNTLLKPSEYLKSICKISSKSSLLKTRSVTSTDDHRDTKEQLTVVVVVVIVIVVVV
VGGGGDRSVDNLDIQSRGRIEGSSSRSEGAEELASEVTARRGGGGGEGEGEGEEEAEGRV
VVVIEEGKESSAGPPPPPLSPLRRSRLPRSNDEPTADPDS PRVASQPLATISIQDLTSIQ
LRRTTAKMNATKTF SAPP PRSVSMTNESFFVQKTDLIAELKRTKDIPGIKKLVEMAQVE
KTQE QNLMSEINKAFVNSNFVDQTHTDATMTNQT LVEPNQKSLSRCYNVIRRISSVCK
NG

>KOX80036.1 hypothetical protein WN51_06450, partial [Melipona quadrifasciata] - 731 aa

DVTGGMARDRSGSEYSENMSDATTCSCOTTSSADKASRCSLRGCGMFQEPFFLHPPGSRPRDGLYVNPMSA
YLGEVPKPKDTESEFYLHSPHDLVYTRITRLFADADAKHRHHFEKKDETLTVKVDVHINNGILERSPGENG
YQTTKAEIAREPPEHAYEQICLRQDPDISGGNVNTNQ RKTQHADNATDRRLKMKHFEHMYTICVVDYIRG
PSAEHWLATDTPICRIDFSRPRKTD RRYSRSSSASESSNVSSSEVPCFSSSASTPSLSRNSSNERERKNGK
LPVVESSSHEKKHPSNLSSQVESEKETRSANGGASLARPPPPPPPPPPPLPKEDVVVLVNAKQNM EPTA
RDEKRDVFG EANRNGRSENLVSTAVNKSDVSCGEHQPEVPPASPPADTEEIKTSQTSHLVNKHMVLPFI

PPKFANADSNLLKPSSEYLKSIICKISSKSSLLKTRSVNLDIQSRGSGDRRIEGSSRSEEAEQVELASE
 VAARRREGEREDEEAEGRVVVVIEEGKESSAGPPPPPLSPLRRSRLPRSNDEPNADPDCPRVASQPLAT
 ISIQDLTISIQLRRTTAKMNATKTFSAAPPRSVSMTNVSESEFFVQKTDLIAELKRTKDIPIGIKKLVEMAQ
 VEKTQEQLMSEINKAFNVSNFVDQIPEKDSCGNVPIWKRQMLARKAAERAKKELEEQIARENEERRQK
 AIPAWKRQLLAKKDNEERRCAFFFSFFLPCD

Sequence 1: XP_016772893.2 787 aa

Sequence 2: Forked 542 aa

Sequence 3: KOX80036.1 731 aa

Start of Pairwise alignments

Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 57

Sequences (1:3) Aligned. Score: 71

Sequences (2:3) Aligned. Score: 78

```
[12]NVTGRMARDRCGSEYSENMSDVTTCSCCTTSSADK---CSLRGCGMFQEPFFLHPPGSRPRDGIYINPMSAYISEPV 85
-----
DVTGGMARDRSGSEYSENMSDATTCSCCTTSSADKsrCSLRGCGMFQEPFFLHPPGSRPRDGLYVNPMSAYLGEV 76

KPKDTEFYLHSPHDLVYTRITRFLFADTE-KHR-HFEKKDETLT [4] VKVDVHFNNGVLDRLNENGY-TNKSEMGQEPS 163
-----
KPKDTEFYLHSPHDLVYTRITRFLFADADaKHRhHFEKKDETLT VKVDVHINNGILERSPGENGYqTTKAEIAREPP 153

EHAYEQICLRQDSD-TGGIVSSSQK---LDNTSDR-----SRS 198
-----MSYLMSSRYETqpVYT-CIVDQTRAPSAEHRPATDTSICRIDFSRP 45
EHAYEQICLRQDPDiSGGNVTNTQRKtqhADNATDRRLKMKHFEH--MYTiCVVDYIRGPSAEHWLATDTPICRIDFSRP 231

RKTDRRYSRSSASSESSNISSEIPCFSSSASTPSLSRNSSNERVGNKGLSI--ESSYEKEN-STKSSQVESEKEIKFPVN 275
RKTDRRYSRSSASSESSNVSEVPCFSSSASTPSLSRNSSNERERKNGKLPVVESSSHEKKHPSNLSSQVESEKETRSAN 125
RKTDRRYSRSSASSESSNVSEVPCFSSSASTPSLSRNSSNERERKNGKLPVVESSSHEKKHPSNLSSQVESEKETRSAN 311

GGANFAK-PPPPPPPLPKEDIIVLMVNTKQNAELTAKEEKRDASGDANRNGRSENGSVPSTAINKSDVSCGERQQPE 354
GGAILARPPPPPPPLPKEDVVLVNAKQNTTEPTARDEKRDVFGEANRNGRSENLPSTAVNKSDASCGEHQQPE 205
GGASLARPPPPPPPLPKEDVVLVNAKQNMETARDEKRDVFGEANRNGRSEN--LVSTAVNKSDVSCGEHQQPE 389

VPPASPPADTEEIKTSQTAHLVNKHMVLPFIPPKFANADSNLLKPSSEYLKSIICKVSTKSNLLKAR SVDNLDIQSR 430
VPPASPPADTEEIKTSQSHLVNKHMLVLPFIPPKFANADSNLLKPSSEYLKSIICKISSKSSLLKTR [36] SVDNLDIQSR 317
VPPASPPADTEEIKTSQSHLVNKHMLVLPFIPPKFANADSNLLKPSSEYLKSIICKISSKSSLLKTR SVDNLDIQSR 465

-SGDRR-EN-CIRSEGIEDQEPEILVVAATE GERERRGVEEER---IIVEEEKELTAGPPPPMSPLQKLR--RTN 499
G----RIEGsSSRSEGAE---ELASEVTARR [4] GEGEGEGEEAEGRVVVIEEGKESSAGPPPPPLSPLRRSRLPRSN 391
GSGDRRIEG-SSRSEEAEQVELASEVAARR REGEREDEEAEGRVVVVIEEGKESSAGPPPPPLSPLRRSRLPRSN 541

EE [4] ANVDLES PK-TPQPLATISIQDLTISIQLRRTTAKMNATKTFSAAPPRSVSMTNVSESEFFIQKTDLIAELKRTKDI 579
DE PTADPDCPRVASQPLATISIQDLTISIQLRRTTAKMNATKTFSAAPPRSVSMTN--ESFFVQKTDLIAELKRTKDI 466
DE PNADPDCPRVASQPLATISIQDLTISIQLRRTTAKMNATKTFSAAPPRSVSMTNVSESEFFVQKTDLIAELKRTKDI 618

PGIKKLVEMAQVEKTQEQLMSEINKAFNVSNFVDQ-IPEKDSSGNVPIWKRQMLARKAAERAKKELEEQIARENEER 658
PGIKKLVEMAQVEKTQEQLMSEINKAFNVSNFVDQtHTDATTMTNQTTLVEPNQKLSRCYNVIRR-ISSVCKNG--- 542
PGIKKLVEMAQVEKTQEQLMSEINKAFNVSNFVDQ-IPEKDSCGNVPIWKRQMLARKAAERAKKELEEQIARENEER 697

RQKAI PAWKRQLLAKKDNEEK [95] LRKTTSKLNILD 787
-----
RQKAI PAWKRQLLAKKDNEERR CAFFFSFFLPCD 731
```

Takeout

>XP_396220.3 protein takeout [Apis mellifera] - 251 aa
MKTISFVLACSLVIGVQAIGRYRGGLEFLEPCSRSDYNVESCLARSANVLTDRFRHGLPQLGYTEVEVEPIIL
DELHIALGEGPDGYRAQFKNITARGVSTLRVTGLRARLSDDEVQLQLALSIPKIRAAAKYRSSGTTTTLVK
ASGAGDYWGEYEGVKAKVFIKAKPFLVQDRRYLRLQQLKMDFSVQNIKMGVENVRDSNAIILAALNLFIN
TNSQELLKEMKPDRLRRKLVQVMTTFVERIFAQVPYDAWILD

>Takeout - Fvar12762-1.2 - 251 aa
MKSILLVCVCSLLIGVQAIGRYRGGLEFLEPCSRDYNVENCLARSANALTEHFRHGLPQL
GYPEVEVEPIILDELHIALGGGPDGYRAQFKNITARGVSTLRVTGLRARISEDEVQLQLALS
IPKIRAAAKYRSSGTTTTLVKASGAGDYWGEYEGVKAKVFIKAKPFVQGRNYLRLQQLKMD
DFSVQNIKMGVENVRDSNAIILAALNLFINTNSQELLKEMKPDRLRRKLVQVMTSFVERIF
AQVPYDAWIID

>KOX71718.1 Protein takeout [Melipona quadrifasciata] - 251 aa
MMSVLLVFCVCSLLIGVQAIGRYRGGLEFLEPCSRDYNVENCLARSANSLTEHFRHGLPQLGYPEVEVEPIIL
DELHIALGGGPDGYRAQFKNITARGVSTLRVTGLRARISEDEVQLQLALSIPKIRAAAKYRSSGTTTTLVK
ASGAGDYWGEYEGVKAKVFIKAKPFVQDRNYLRLQQLKMDFSVQNIKMGVENVRDSNAIILAALNLFIN
TNSQELLKEMKPDRLRRKLVQVMTSFVERIFAQVPYDAWIID

Sequence 1: XP_396220.3 251 aa

Sequence 2: Takeout 251 aa

Sequence 3: KOX71718.1 251 aa

Start of Pairwise alignments

Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. **Score: 92**

Sequences (1:3) Aligned. Score: 91

Sequences (2:3) Aligned. **Score: 98**

```

MKTISFVLACSLVIGVQAIGRYRGGLEFLEPCSRSDYNVESCLARSANVLTDRFRHGLPQLGYTEVEVEPIILDELHIALGEG 80
MKSILLVCVCSLLIGVQAIGRYRGGLEFLEPCSRDYNVENCLARSANALTEHFRHGLPQLGYPEVEVEPIILDELHIALGGG 80
MMSVLLVFCVCSLLIGVQAIGRYRGGLEFLEPCSRDYNVENCLARSANSLTEHFRHGLPQLGYPEVEVEPIILDELHIALGGG 80

PDGYRAQFKNITARGVSTLRVTGLRARLSDDEVQLQLALSIPKIRAAAKYRSSGTTTTLVKASGAGDYWGEYEGVKAKVFI 160
PDGYRAQFKNITARGVSTLRVTGLRARISEDEVQLQLALSIPKIRAAAKYRSSGTTTTLVKASGAGDYWGEYEGVKAKVFI 160
PDGYRAQFKNITARGVSTLRVTGLRARISEDEVQLQLALSIPKIRAAAKYRSSGTTTTLVKASGAGDYWGEYEGVKAKVFI 160

RAKPFVQDRRYLRLQQLKMDFSVQNIKMGVENVRDSNAIILAALNLFINTNSQELLKEMKPDRLRRKLVQVMTTFVERIF 240
RAKPFVQGRNYLRLQQLKMDFSVQNIKMGVENVRDSNAIILAALNLFINTNSQELLKEMKPDRLRRKLVQVMTSFVERIF 240
RAKPFVQDRNYLRLQQLKMDFSVQNIKMGVENVRDSNAIILAALNLFINTNSQELLKEMKPDRLRRKLVQVMTSFVERIF 240

AQVPYDAWILD 251
AQVPYDAWIID 251
AQVPYDAWIID 251

```

SPH41

>XP_006563756.3 protein masquerade isoform X1 [Apis mellifera] - 774 aa
MKEAKMILRTFPGGIALFLLLSGLISAQDDDSLGSFSLGLLDSITSTANSADCPGVCVHAFATLICYEY
LEHVQCPASMRCCIEAPINSTGTSENIANDDDSTSTVVTTVKTTITTTSTPTTSSTALTTVSSTVSSKTT
ESQKETANKTSLKTCSGICMAERIADYCDAILVIDTSLCKPGYKCCVSRDAFGDSPPPELLVIDRTNSS
RFEEKTVNTSYKSSPTVRPNMVSPTSISSTTVATTTITTTKQPTTITTTIKPKITMRKPKGECVSGFF
ALLCDKVDTEAECDDGSCCVDAFLKTEATTSTTTTMTTTTIGSTTKPAQAKLQPCPGFCLLTIMAAFC
RPNLIIAKTATCQSGYICDNTKSSPQTVNVVTPSSPYQTSRPRPRPTSRSITTVPLPPDLRPECPGSC
IVSYLSFTCFRNAELTNLFKCKKQGHQCCAPKSLIREFNGGNSSEPILSNRNDTMYVTSRPYTTPLTTVL
YETTSTTTMRSPVYSKYVCGVKGTSRGPIQVRSSEREARVVGEDADANEWCWHVGLINAHNQYLCGGAL
IGTQWVLTAAHCVTNIVRSGDAIYVRVGDYDLTRKYGSPGAQTLRVATTYIHHNHNSQTLDNNDIALKLH
GQAEKLDGVCLVCLPARGVSHTAGKRCTVTGYGYMGEAGPIPLRVREAEIPVVSDAECIRKVNAVEKIF
ILPASSFCAGGEQGNDACQGDGGGPLVCQDDGFYELAGLVSWGFGCGRLDVPGVYVKVSAFIGWINQIIS
VNNV

>SPH41 - 769 aa - junção de predicoes = Fvar09074-1.2 + Fvar11595-1.2

MRKAKMILRTVPGGIVLFLLLSGSIAAQDDDSLGSFSLGLLDSITSTANSADCPGVCVH
AFATLICYEYVLEHVECPTSMRCCIEAPINGTGTSENAVSPHDDSTSTIITTVKTTTTTS
TTTTPSTTTALTTPSTTSVKATSESQKEAVNKTSKTCSGICMAERIADYCDAVLVIDTLC
KPGYKCCVSRDAFGDSPPPELLVIDRANSSRFDEKTGLNTSYKSSPSTTMRPNMITSTS
IASTTIATTTMITKQPTTITIRPKITMRKPKGECVSGFFALLCDKVDGEAECDDGSCCV
IDAFKTETTTTITTTTIGPTTKPPEPKLQPCPGFCLLTIMAAFCERPSAIIAKTSTCQSGY
ICDNTKSSPQTVNVVTPSSPYQTPRPRPRPTARPSITTIISLPRDTRAECPGSCIVSYLS
FTCFRNAELTNLFKCKKQGHQCCAPKSLIRELNGNSTEAILSNRNDTMYVTSRPYTTPL
STSVYETTTMTTMRSPVYSKYVCGVKGTSRGPIQARSLERGARVVGEDADANEWCWQV
ALINSLNQYLCGGALIGTQWVLTAAHCVTNIVRSGDAIYVRVGDHDLTRKYGSPGAQTLR
VATTYIHHNHNSQTLDNNDIALKLHGGQAEKLDGVCLVCLPARGVSHTAGKRCTVTGYGYM
GEAGPIPLRVREAEIPIVSDAECIRKVNAVEKIFILPASSFCAGGEQGNDACQGDGGGP
LVCQDDGFFELAGLVSWGFGCGRLDVPGVYVKVSAFIGWINQIISVNNL

>KOX79829.1 Plasma kallikrein [Melipona quadrifasciata] -744 aa

MHFQKISGEVFTSGIVSHGYFYFFSGLLDSITSTANSADCPGVCVHAFATLICYEYVLEHVECPTSMRCC
IEAPINGTGTSENAVSPHDDDTSTIITTVKTTTTITSTTPSTTTALTTVSSTTSVKATSESQKEAVNKTS
SKTCSGICMAERIADYCDAVLVIDTLCKPGYKCCVSRDAFGDSPPPELLVIDRANSSRFDEMTGLNTSYK
GSSPSTTMRPNMITSTSIASTTVATTTTITKQPATITIRPKITVRKPKGECVSGFFALLCDKVDGEAEC
DDGSCCVDAFLKTETTTTTTTTVGPPTTKPPEPKLQPCPGFCLLTIMAAFCERPSAIIAKTSTCQSGYIC

DNTKSSPQTPRRPRRPTARPSITTTISLPRDTRAECPGSCIVSYLSFTCFRNAELTNLFKCKKQGHQCCAP
 KSLIRELNNGNSTEAILSNRNDTMYVTSRPYTTPLSTSVYETTTMMTTMRSPVYSKYVCGVKGTSRGP IQ
 ARSLERGARVVGEDADANEWCWQVALINSLNQYLCGGALIGTQWVLTAAHCVTNIVRSGDAIYVRVGDH
 DLTRKYGSPGAQTLRVATTYIHHNHNSQTLDNNDIALLLKHLGQAELKDGVLVCLPARGVSHTAGKRCTVT
 GYGYMGEAGPIPLRVREAEIPIVSDAECIRKVNATEKIFILPASSFCAGGEQGNACQGDGGGPLVCQD
 DGFYELAGLVSWGFGCGRLDVPGVYVKVSAFIGWINQIISVNNL

Sequence 1: XP_006563756.3 774 aa

Sequence 2: SPH41 769 aa

Sequence 3: KOX79829.1 744 aa

Start of Pairwise alignments

Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. **Score: 89**

Sequences (1:3) Aligned. Score: 85

Sequences (2:3) Aligned. **Score: 95**

```

MKEAKMILRTFPGGIALFLLLSGLISAQDDDSLGS--FLSGLLDSITSTANSADCPGVCVHAFATLICYEVLHVQCPA 78
MRKAKMILRTVPGGIVLFLLLSGSIAAQDDDSLGS--FLSGLLDSITSTANSADCPGVCVHAFATLICYEVLHVCEPT 78
MH-----FQKISGEVFTSGIVSHGYfyFFSGLLDSITSTANSADCPGVCVHAFATLICYEVLHVCEPT 65

SMRCCIEAPINSTGTSENIAN--DDSTSTVVTTKTITITSTPTTSST-ALTTVSSTVSSKTTSESQKETANKTlS-KT 154
SMRCCIEAPINGTGTSENAVSPHDDDTSTIITTVKTTTTTSTTTPTTTALTTPSTTSVKATSESQKEAVNKT-S-KT 156
SMRCCIEAPINGTGTSENAVSPHDDDTSTIITTVKTTTTTSTT-PSTTTALTTPSTTSVKATSESQKEAVNKT-SsKT 143

CSGICMAERIADYCDAILVIDTLslCKPGYKCCVSRDAFGDSPPELLLVIDRTNSRFEEKTGVTNTSYKGSSP--TVRPN 232
CSGICMAERIADYCDAVLVIDTL--CKPGYKCCVSRDAFGDSPPELLLVIDRANSRFDKTLNTSYKGSSPSTTMRPN 234
CSGICMAERIADYCDAVLVIDTL--CKPGYKCCVSRDAFGDSPPELLLVIDRANSRFDKTLNTSYKGSSPSTTMRPN 221

MVSPTSISSTVATTTITtKQPTTItTIKPKITMRKPKGECVSGFFALLCDKVDTEAEC-DDGSCCVIDAFLKTE [ 6] 314
MITSTSIASSTIATTTMIT-KQPTT--TIRPKITMRKPKGECVSGFFALLCDKVDGEAECDDGSCCVIDAFLKTE 308
MITSTSIASSTVATTTIT-KQPAT--TIRPKITVRKPKGECVSGFFALLCDKVDGEAECDDGSCCVIDAFLKTE 295

TTMTTTTIGSTTKPAQAKLQPCPGFCLLTIMA AFCERPNLIIAKTATCQSGYICDNTKSSPQTVNVVTPSSPYQTSRPR 394
TTITTTTIGPTTKPEPKLQPCPGFCLLTIMA AFCERPSAIIAKTSTCQSGYICDNTKSSPQTVNVVTPSSPYQTPRPR 388
TTTTTTVGPPTKPEPKLQPCPGFCLLTIMA AFCERPSAIIAKTSTCQSGYICDNTKSSPQT-----PRPR 363

PRPTSRSPTTIVPLPDLRPECPGSCIVSYLSFTCFRNAELTNLFKCKKQGHQCCAPKSLIREFNGGNSSEPILSNRNDT 474
PRPTARPSITTTISLPRDTRAECPGSCIVSYLSFTCFRNAELTNLFKCKKQGHQCCAPKSLIRELNNGNSTEAILSNRNDT 468
PRPTARPSITTTISLPRDTRAECPGSCIVSYLSFTCFRNAELTNLFKCKKQGHQCCAPKSLIRELNNGNSTEAILSNRNDT 443

MYVTSRPYTTPLTTLVLYETTST-TTMRSPVYSKYVCGVKGTSRGP IQVRSSEREARVVGEDADANEWCWHVGLINAHNQ 553
MYVTSRPYTTPLSTSVYETTTMMTTMRSPVYSKYVCGVKGTSRGP IQARSLERGARVVGEDADANEWCWQVALINSLNQ 548
MYVTSRPYTTPLSTSVYETTTMMTTMRSPVYSKYVCGVKGTSRGP IQARSLERGARVVGEDADANEWCWQVALINSLNQ 523

YLCGGALIGTQWVLTAAHCVTNIVRSGDAIYVRVGDYDLTRKYGSPGAQTLRVATTYIHHNHNSQTLDNNDIALLLKHLGQA 633
YLCGGALIGTQWVLTAAHCVTNIVRSGDAIYVRVGDHDLTRKYGSPGAQTLRVATTYIHHNHNSQTLDNNDIALLLKHLGQA 628
YLCGGALIGTQWVLTAAHCVTNIVRSGDAIYVRVGDHDLTRKYGSPGAQTLRVATTYIHHNHNSQTLDNNDIALLLKHLGQA 603

ELKDGVLVCLPARGVSHTAGKRCTVTGYGYMGEAGPIPLRVREAEIPIVSDAECIRKVNATEKIFILPASSFCAGGEQ 713
ELKDGVLVCLPARGVSHTAGKRCTVTGYGYMGEAGPIPLRVREAEIPIVSDAECIRKVNATEKIFILPASSFCAGGEQ 708
ELKDGVLVCLPARGVSHTAGKRCTVTGYGYMGEAGPIPLRVREAEIPIVSDAECIRKVNATEKIFILPASSFCAGGEQ 683

GNDACQGDGGGPLVCQDDGFYELAGLVSWGFGCGRLDVPGVYVKVSAFIGWINQIISVNNV 774
GNDACQGDGGGPLVCQDDGFYELAGLVSWGFGCGRLDVPGVYVKVSAFIGWINQIISVNNL 769
GNDACQGDGGGPLVCQDDGFYELAGLVSWGFGCGRLDVPGVYVKVSAFIGWINQIISVNNL 744

```

SPZ2

>XP_006562326.2 neurotrophin 1 [Apis mellifera] - 573 aa
MMARGLLFLTVAFVLLSSIDVRAEKKNPKEKLDNDRKESNETNVALMSDDLKNRTDQVREGRLKVRALL
SNGTRQNGSRELVLRSMDIVKIVSDDATGDEETVEELPEPQELKIVRPNLRKRPSYRPPRRPAPLNRR
NVFTDLRSRPSLIRPNLRRPTETKKRDPSEDECTFFTKTVCLEAVDYPHEAIARSLRSNKEMIAALLTDY
KSQDFDDSAETLPVALPLESKFENRYENNEIRRRSDLNPSFENVEEGFTCPVSIKYARPQLARAASGVWK
YIINTGEHTQTLRLEKCSNPQASCAFISENYRSSCSQVYNYHRLLTWDNKLGLHMDIFKVPTCCNCHVHG
YAEIFPPHQKQDPARIKESFPGSDFITSEQKDDFESSSKLNYFNKFISSNFDSVASNGKKPGIETAPS
RPSTSFTLPVTRQNKKPSATSSRPFDKLPQQHAPNTRAPGYTGPLLKSRPNRAPPSPYPYRRESHIEDH
TETVNSTILNRYSQPYDLEMDATSRLQNGGFDEYQEPQRRVNYNYHPIIDFFRPEAMQLQSSETTSMMSG
QNDSNSWKPMIAS

>SPZ2 - Fvar08975-1.2 - 527 aa
MARGLFFIAVVVLLSSIDVNAEKDSKDDVDLNERKESNETTVVTSIKINDDSFRNRTNK
IWENQLGKIRALLNNGSRQNVSRLEMLPKSVDIKVISDDATGDEEGLEELPEASPQELK
IIRPSLRKRPGYRPPQRRPSSLNRRNVYADLSRTPLIRPPRRPTEVKRDPTEKECTFFTK
TVCLEAADYPHDAIARSLRSNKEMVTALLTDYKSQDFDDSGESPPIALPLENKYENRYE
SNEIRRRSDMSSSFENVEEGFTCPVSIKYARPQLARAASGIWKYIINTGEHTQTLRLEKC
TNPQASCFSISENYRSSCMQVYNYHRLLAWDNKLGLHMDIFKVPSCCSCHVHG YAEIFPP
HQKDPSPRVKESFPGSDFATTDQKDDYEDSPKLNLYLNKYTFDSSLGSSNKKPIIESTPSR
PPFVLPVTRTRSKKPSSTSSRPFDKLPQQHAPNTRAPGYTGPLLKGSRPSRPNRPPYRRES
ISHIEEQTAANSTILNRPEAMMLQSSEASSTSDQNNNSNSWKPLIAS

>KOX69952.1 hypothetical protein WN51_04467 [Melipona quadrifasciata] -
reduzido manualmente de 2835 aa para 573 aa
MARGLLLFVAVKVSICPRSCNGVKVTQPDSLIHRKQRNQVVVLLSSIDVNAEKDSKDDVDLNERKENNE
TTIVASIKINDDSFRNRTNKVRENQLGKIRAPLNNGSRQNVSRLEMLPKSVDIARVISDDSTGDEEGLEE
LPEASAKKFIMPRLRKRPSYRPPRRPSSLNRRNVYADLSRTPLIRPPRRPTEAKRDPTEKECTFFTKTV
CLEAADYPHDAIARSLRSNKEMVTALLTDYKSQDFDDSGESPPIALPLENKYENRYESNEIRRRSDMSSS
FENVEEGFTCPVSIKYARPQLARAASGIWKYIINTGEHTQTLRLEKCSLLAWDNKLGLHMDIFKVPSCCS
CHVHG YAEIFPPHQKDPSPRVKESFPGSDFATSEKDDYEDSSKLNLYLHKYTFDSSLGSSNKKPVIESTP
SRPPFVLPVTRTRPKKPSSTSSRPFDKLPQQHAPNTRAPGYTGPLLKGSRPSRPNRPPYRRESISHIEEQT
EAANSTILNRYSQPYDLEMDATSRLQNGGFDEYQEPQRRVNYNYHPIIDFFRPEAMMLQSSEASPTSDQ
NNSNSWKPGCLTP

Sequence 1: XP_006562326.2 573 aa

Sequence 2: SPZ2 526 aa

Sequence 3: KOX69952.1 573 aa

Start of Pairwise alignments

Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 73

Sequences (1:3) Aligned. Score: 69

Sequences (2:3) Aligned. Score: 87

```
mMARGLL-FLTV      AFVLLSSIDVRAEKKNPKEKLDNDRKESNETNVA----LMSDDLKNRDQVREGRLEKVRALLS 71
-MARGLF-FIAV      -VLLSSIDVNAEKDSDVDLNERKESNETTVVTSIKINDDSFRNRNTNKIWENQLGKIRALLN 73
-MARGLLlFVAV[29] VVLLSSIDVNAEKDSDVDLNERKENNETTIVASIKINDDSFRNRNTNKVRENQLGKIRAPLN 104

NGTRQNGSRELVLRSMDIVKIVSDDATGDEETVEELPE--PQELKIVRPNLRKRPSYRPPRRPAPLNRNRFVTDLSRS 149
NGSRQNVSRRELMLPKSVDIKVISDDATGDEEGLEELPEASPOELKIIRPSLRKRPGYRPPQRRPSSLNRRNVYADLSRT 153
NGSRQNVSRRELVLKPSVDIARVISDDSTGDEEGLEELPEASAK--KFIMP SLRKRPSYRPPRRPSSLNRRNVYADLSRT 182

PsLIRPNlRRPTETKkrdPSEDECTFFTKTVCLEAVDYPHEAIARSLRSNKEMIAALLTDYKSQDFDSDAETLP-VALPL 228
P-LIRPP-RRPTEVK-RDPTEKECTFFTKTVCLEAADYPHDAIARSLRSNKEMVTALLTDYKSQDFDSDGESFPPIALPL 230
P-LIRPP-RRPTEAK-RDPTEKECTFFTKTVCLEAADYPHDAIARSLRSNKEMVTALLTDYKSQDFDSDGESFP-IALPL 258

ESKFENRYENNEIRRRSDLNPSFENVEEGFTCPSPVIKYARQLARAASGVWKYIINTGEHTQTLRLEKCSNPQASCAFIS 308
ENKYENRYESNEIRRRSDMSSSFENVEEGFTCPSPVIKYARQLARAASGIWKYIINTGEHTQTLRLEKCTNPQASCSFIS 310
ENKYENRYESNEIRRRSDMSSSFENVEEGFTCPSPVIKYARQLARAASGIWKYIINTGEHTQTLRLEKCS----- 328

ENYRSSCSQVYNYHRLLTWDNKLGLHMDIFKVPTCCNCHVHGAEIFPPHQDQPARIKESFPGSDFITSEQKDDFEES 388
ENYRSSCMQVYNYHRLLAWDNKLGLHMDIFKVPSCCSCHVHGAEIFPPHQDPPSRVKESFPGSDFATTDQKDDYEDSP 390
-----LLAWDNKLGLHMDIFKVPSCCSCHVHGAEIFPPHQDPPSRVKESFPGSDFATSEQKDDYEDSS 393

sKLNyFNKFISsnfdSVASNGKKPGIETAPSRPstSFTLPVTRTRnKKPSATSSSRPFDKLPQQHAPNTRAPGYTGPLLK 468
-KLNyLNKYTFDS---SLGSSNKKPIIESTPSRP--PFVLPVTRTR- KKPSSTSSRPFDKLPQQHAPNTRAPGYTGPLLK 463
-KLNyLHKYTFDS---SLGSSNKKPVIESTPSRP--PFVLPVTRTR- KKPSSTSSRPFDKLPQQHAPNTRAPGYTGPLLK 466

-SRPNRrapPSRPPYRRE--SHIEDHTETVNSTILNRYSQPYDLEMDATSRlQNGGFDEYQEPQRRVNYNYHPIIDFFRP 545
GSRPSR--PNRPPYRRESISHIEEQTAANSTILNR-----P 498
GSRPSR--PNRPPYRRESISHIEEQTEAANSTILNRYSQPYDLEMDATSRlQNGGFDEYQEPQRRVNYNYHPIIDFFRP 544

EAMQLQSSETTSMGQNDNSWKP-MIAS 573
EAMMLQSSEASSTSDQNNNSWKP-LIAS 526
EAMMLQSSEASPTSDQNNNSWKPgCLTP 573
```

Figura 19 - Alinhamento global das seqüências de aminoácidos dos transcritos realizado entre *A. mellifera*, *F. varia* e *M. quadrifasciata*. Em vermelho: análises de alinhamento múltiplo através da ferramenta COBALT.

Fontes: Alinhamento global: Nunes, comunicação pessoal; Alinhamento múltiplo: Da autora.