

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG**

JOSEANA VIEIRA

**Determinantes moleculares da diferenciação inicial do cérebro em castas de abelhas**  
*Apis mellifera*

Alfenas/MG,  
2014

JOSEANA VIEIRA

**Determinantes moleculares da diferenciação inicial do cérebro em castas de abelhas**

*Apis mellifera*

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 R. Barchuk

Alfenas/MG,  
2014

Vieira, Joseana.

Determinantes moleculares da diferenciação inicial do cérebro em castas de abelhas *Apis mellifera* / Joseana Vieira - 2014.

132 f. –

Orientador: Angel Roberto Barchuk.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -  
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. *Apis mellifera*. 2. Neurogênese. 3. Cérebro. 4. Alimentação. 5.  
Expressão genica. I. Barchuk, Angel Roberto. II. Título.

CDD: 612.8

JOSEANA VIEIRA

**Determinantes moleculares da diferenciação inicial do cérebro em castas de abelhas**  
*Apis mellifera*

Aprovada em: 20/05/2014

Prof. MARCELO BERTOLINI BARCELLOS

Instituição: Unifal-MG

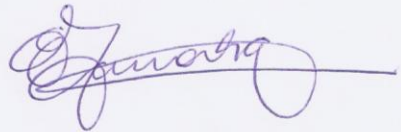
Assinatura:



Prof. ÉRICA DONATO TANAKA

Instituição: FMRP-USP


Assinatura:



Prof. JÁQUELINE CARVALHO DE OLIVEIRA

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



*Aos meus pais, Ana Rosa e José Eduardo,  
À minha irmã Juliana Vieira...  
À minha avó Odete...  
Ao meu namorado Adriano...*

*...Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela oportunidade, confiança, crescimento, força e amparo inexplicável.

Aos meus pais, pelas orações, amor incondicional, apoio inquestionável, esforços imensuráveis e por me proporcionarem o melhor, em todos os momentos.

À minha irmã, Juliana Vieira, pela amizade, força, risos e por me fazer querer ser sempre um bom exemplo.

À minha avó, Odete Dias Bernardino, pelo carinho, torcida, afeto e disposição de sempre.

Ao Adriano Cesar pelo amor, companheirismo, apoio, paciência de sempre e socorro nos momentos de desespero.

Às minhas grandes amigas de Alfenas, Camila Garnica Conterato e Livia Mello, pela companhia, risadas, pela confiança, pelo carinho, apoio e momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk, pela oportunidade, confiança, orientação, ensinamentos, dedicação e bom humor.

A todos os colegas do Programa Biociências aplicadas à Saúde, em especial à Juliane Lima Passos e Fernando Felicioni, pela amizade, pelo apoio, desabafos, pela torcida e ajuda.

Aos colegas de laboratório Évila Salles, Camila Miranda Pernambuco, Bruno Zavan pelo apoio e pela amizade.

A todos os “abelhudos” do grupo de pesquisa pelos ensinamentos, companhia e amizade.

Aos amigos, professores e demais funcionários do Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt) pela amizade, apoio e bons momentos.

Aos meus amigos de Muzambinho, em especial Livia Riboli, Mariana Campos e Izadora Bueno pela força, apoio e amizade.

À Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade, suporte e experiência de vida.

Aos professores que ministraram as disciplinas que cumpri durante o mestrado.

À Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, ao Dr. Daniel Guariz Pinheiro, Msc. Flávia Freitas, e todo o Laboratório de Biologia e Desenvolvimento de Abelhas da Faculdade de Medicina da USP – campus Ribeirão Preto pelas colaborações e ensinamentos.

A CAPES pelo suporte financeiro.

E a todos aqueles que, a pesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

## RESUMO

O desenvolvimento do cérebro é influenciado por ambos os fatores genéticos e ambientais. Entre os últimos, a dieta tem sido considerada de um papel fundamental. Demonstramos recentemente que em abelhas, larvas de rainha, que são alimentadas com grandes quantidades de geleia real, experimentam o maior e mais rápido desenvolvimento do cérebro do que as de operárias. Também mostramos que esta morfogênese diferencial é evidente a partir do 4º estágio larval (L4). Esta constatação implica que uma grande ingestão de alimento impulsiona o desenvolvimento do sistema nervoso. Estudos recentes mostraram que a composição de geleias real e de operária diferem entre si, levando a diferenças no padrão da expressão gênica. Alguns miRNAs são mais abundantes na geleia de operárias que na geleia real durante o desenvolvimento larval inicial, sugerindo um papel para estas pequenas moléculas na determinação de castas. Como não há diferenças morfológicas entre cérebro de rainhas e operárias antes de L4, a hipótese é de que as primeiras diferenças observadas são molecularmente promovidas no início do desenvolvimento. Neste estudo temos o objetivo de identificar genes que respondem a alimentação em cérebros de rainhas e operárias na fase larval L3. Utilizando seqüenciamento de nova geração (RNA-Seq) identificamos 60 genes diferencialmente expressos (GDEs), 31 mais expressos em operárias e 29, em rainhas. Os produtos de sete transcritos super-expressos em rainhas já foram associados com atividade neuronal: aromatic-L-amino-acid decarboxylase-like, Spatzle-2, three serine proteases (SP25, SP33 and SPH41), apolipoprotein D-like, and forked. Oito dos genes super-expressos em operárias estão envolvidos na inibição de proteínas que promovem desenvolvimento cerebral ou são importantes para o desenvolvimento de características desta casta: *chymotrypsin inhibitor-like*, *chymotrypsin inhibitor*, GB51989 (domínio conservado *pacifastin*), três hexamerinas (*hex-110*, *-70c* e *-70b*) e *citocromo P450 9Q1* e *nesprin 1-like*. Além disso, doze genes, dos 60, estão localizados no cromossomo 15, sugerindo a co-regulação deste grupo de genes. Análises da complexa rede sugere que muitos dos DEG são alvos de miRNAs presentes nas geleias, portanto, fazem parte de uma complexa via que leva ao desenvolvimento do difenismo observado no cérebro em castas de abelhas.

Palavras-chaves: *Apis mellifera*. Neurogênese. Cérebro. Alimentação. Expressão gênica.

## ABSTRACT

Brain development is driven by both genetic and environmental factors. Among the latter, diet has been considered to play a key role. We have recently shown that in honeybees, queen larvae, which are fed on copious amounts of royal jelly, experience larger and faster brain development than workers. We have also shown that this differential morphogenesis is evident from the 4th larval (L4) stage on. This finding implies that a high nutritional input drives nervous system development. Recent studies have shown that the composition of royal and worker jellies differs, leading to differences in gene expression patterns. Some miRNAs are more abundant in worker jelly than in royal jelly during early larval development, suggesting a role for these small molecules in caste determination. Since there are no morphological differences between queens' and workers' brain before L4, we hypothesized that the first observed differences are molecularly promoted early in development. Herein we aimed at identifying nutritionally-responsive genes in brains of queens and workers at the 3rd larval stage. Using RNA-Seq, we identified 60 differentially expressed genes (DEG), 31 upregulated in workers and 29 in queens. Among the genes upregulated in queens, seven are known to be associated to neuronal activity: aromatic-L-amino-acid decarboxylase-like, Spatzle-2, three serine proteases (SP25, SP33 and SPH41), apolipoprotein D-like, and forked. Eight out of 31 genes upregulated in workers have functions associated to brain growth impairment or are relevant for the development of caste-specific traits: *chymotrypsin inhibitor-like*, *chymotrypsin inhibitor*, GB51989 (with a *pacifastin* conserved domain), three hexamerins (*hex-110*, *-70c* and *-70b*), *cytochrome P450 9Q1* and *nesprin 1-like*. In addition, twelve genes, out of the 60, are located on chromosome 15, thus suggesting co-regulation of this group of genes. Complex network analysis suggests that many of the DEG are targets of miRNAs present in the jellies and, thus, are part of a complex pathway leading to the development of the observed brain dimorphism in honeybee castes

Keywords: *Apis mellifera*. Neurogenesis. Brain. Food. Gene expression.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 10-HDA** - ácido 10-hidróxi-2-decenóico
- 20H** - 20-hidroxicdisona
- AADC** - aromatic-L-amino-acid decarboxylase-like
- ALS** - subunidade ácido-lábil
- APOD** – apoliproteína D
- BDNF** - fator neurotrófico derivado do cérebro
- CA** – corpora allata
- CHIT** - quitotriosidase
- CHT-3** – quitinase 3
- CCGs** - genes de controle de relógio
- CP** – proteína cuticular
- CYP** – citocromo P450
- DDC** – dopa decarboxilase
- EPO** - peroxidase eosinofílica
- GDE** – gene diferencialmente representado
- GMCs** – células-mães ganglionares
- HBGase** -  $\alpha$ -glucosidase
- HEX** - hexamerina
- HJ** – hormônio juvenil
- JHBP** - proteína de ligação ao hormônio juvenil
- LDR** - desidrogenase/ redutase de cadeia longa
- LPO** - lactoperoxidase
- MAS** – masquerade
- MDR** - desidrogenase/ redutase de cadeia média
- MHP** - heme peroxidases de mamíferos
- MPO** – mieloperoxidase
- MUR89F** – mucin related 89F
- NSP** - proteína nitrílica especificador desintoxicante

**NT** – neurotrofina

**P450** - citocromo P450

**PAR** - receptores ativados por protease

**PM** – matriz peritrófica

**SDR** – desidrogenase/ redutase de cadeia curta

**SNC** – sistema nervoso central

**SNP** – sistema nervoso periférico

**SP25** – serina protease 25

**SP33** – serina protease 33

**SPH41** - serina protease homólogo 41

**SPZ2** – spatzie 2

**TDR** – transcrito diferencialmente representado

**TOP2** – topoisomerase 2

**TPO** - peroxidase

**ZPD** – domínio da zona pelúcida

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1	O MODELO <i>A. MELLIFERA</i> .....	10
1.2	DIFERENCIAÇÃO DE CASTAS EM <i>A. MELLIFERA</i> .....	12
1.3	O SISTEMA NERVOSO E A NEUROGÊNESE DE <i>A. MELLIFERA</i> .....	14
1.4	AMBIENTE E NEUROGÊNESE .....	18
1.5	SOBRE O PRESENTE TRABALHO .....	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
3.1	VISÃO GERAL .....	28
3.2	COLETA DAS AMOSTRAS .....	28
3.3	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL .....	32
3.4	SEQUENCIAMENTO DOS RNAs POLI-A+ .....	33
3.5	ANÁLISE DAS BIBLIOTECAS .....	34
<b>3.5.1</b>	<b>Mapeamento .....</b>	<b>35</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Normalização .....</b>	<b>35</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Obtenção dos GDEs .....</b>	<b>35</b>
3.6	ANÁLISES <i>IN SILICO</i> DOS GDES .....	36
3.7	IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO PARA OS miRNAs PRESENTES NAS GELÉIAS REAL E DE OPERÁRIAS NAS REGIÕES 3' UTRs DOS GDES .....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1	SOBRE OS TRANSCRIPTOMAS DE CÉREBROS DE LARVAS L3 DE RAINHAS E OPERÁRIAS .....	37
<b>4.1.1</b>	<b>Genes super-expressos em cérebro de larvas de rainhas e operárias L3 .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.2</b>	<b>GDEs em cérebros L3 como alvos de regulação por miRNAs de geléia real .....</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
5.1	SOBRE OS GENES MAIS EXPRESSOS NO CÉREBRO DE RAINHAS L3 .....	53
5.2	SOBRE OS GENES MAIS EXPRESSOS NO CÉREBRO DE OPERÁRIAS L3 .....	70
5.3	REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE TRANSCRITOS POR miRNAs DAS GELEIAS .....	82
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>
	<b>ANEXO A – IMAGENS DOS DOMÍNIOS CONSERVADOS DOS GENES MAIS EXPRESSOS EM CÉREBROS DE RAINHAS L3 .....</b>	<b>124</b>

**ANEXO B – IMAGENS DOS DOMÍNIOS CONSERVADOS DOS GENES MAIS EXPRESSOS EM CÉREBROS DE OPERÁRIAS L3..... 126**

**ANEXO C - COMPARAÇÃO DOS TRANSCRIPTOMAS DE CÉREBROS DE LARVAS L3 DE RAINHAS E OPERÁRIAS E DE EMBRIÃO DIPLÓIDE (72H) ..... 129**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O MODELO *A. MELLIFERA*

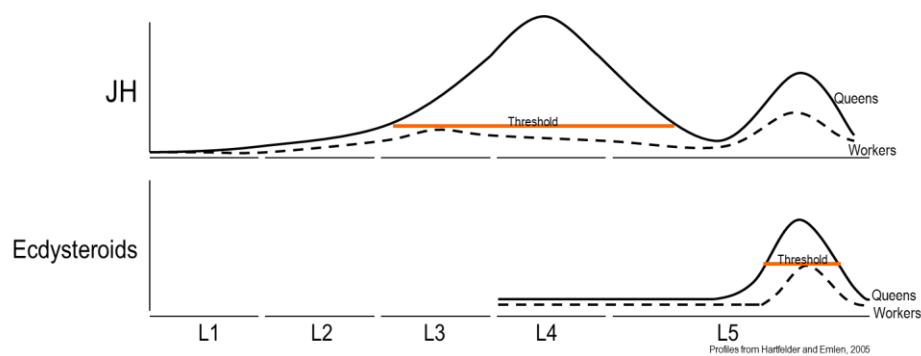
Insetos sociais são os principais exemplos de polifenismo induzido pelo ambiente. Dentre os insetos sociais a abelha *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) é considerada um dos mais interessantes modelos de estudo em Biologia, principalmente pela existência de sistemas altamente eficientes de divisão do trabalho (WILSON, 1971, 2008) e também por possuir memória bem desenvolvida e alta capacidade de aprendizado, além de um sistema de orientação espacial sofisticado (MENZEL, 1985; MENZEL; GREGGERS; HAMMER, 1993; HORRIDGE, 2009; SRINIVASAN, 2011).

As abelhas são insetos holometábolos, uma vez que apresentam metamorfose completa. Após o período embrionário, ocorre a eclosão das larvas, as quais passam por quatro mudas. Estas mudas designam cinco estágios larvais (L1 a L5), sendo caracterizados por intensa alimentação e crescimento. Após o período larval, a ontogênese prossegue com uma muda metamórfica, dando início ao período pupal, quando os indivíduos não se alimentam e ocorre a substituição dos tecidos larvais por tecidos adultos. Todas estas grandes transições no desenvolvimento são governadas por ecdisteróides, cujos títulos são bastante altos durante o período pupal (Figura 1). Na fase adulta, as abelhas desempenham funções específicas, havendo sobreposição de gerações, cuidado cooperativo da prole e divisão do trabalho reprodutivo, características das organizações eussociais (WILSON, 1971). Apenas um tipo de macho é observado na colônia, sendo denominado zangão, cuja única função é fecundar a rainha durante o vôo nupcial.

As larvas fêmeas se diferenciam em castas, operárias ou rainhas, dependendo do tipo de dieta que recebem (BEETSMA, 1979). As rainhas são férteis, maiores e de maior longevidade, enquanto as operárias são facultativamente estéreis e executam tarefas de manutenção da colônia, tais como: cuidado com a prole, limpeza, forrageamento e guarda (PAGE; PENG, 2001).

A rainha põe ovos fecundados que podem produzir tanto larvas de rainha ou larvas de operária, ambas diplóides ( $n=32$ ), bem como alguns ovos não fertilizados haplóides ( $n=16$ ) que se desenvolvem em zangões (WINSTON, 1987). Sendo, portanto, o sistema de determinação do sexo em *A. mellifera* haplo-diplóide. O desenvolvimento embrionário tem a

duração de três dias. As larvas que eclodem dos ovos, até o estágio L3, são todas alimentadas com geleia real, substância secretada pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares de operárias adultas jovens (PIERRE, 1981). A partir de então, a alimentação passa a ser casta-específica e é onde reside a base nutricional para o surgimento de organismos, sistemas nervosos e comportamentos diferentes a partir do mesmo genoma. Dessa forma, a trajetória de desenvolvimento de uma larva fêmea em rainha ou operária é inicialmente flexível e depende da qualidade e quantidade do alimento que ela recebe. Este exemplo representa atualmente o máximo em flexibilidade de desenvolvimento em qualquer Filo.



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

Fonte: Barchuk et al. (2007)

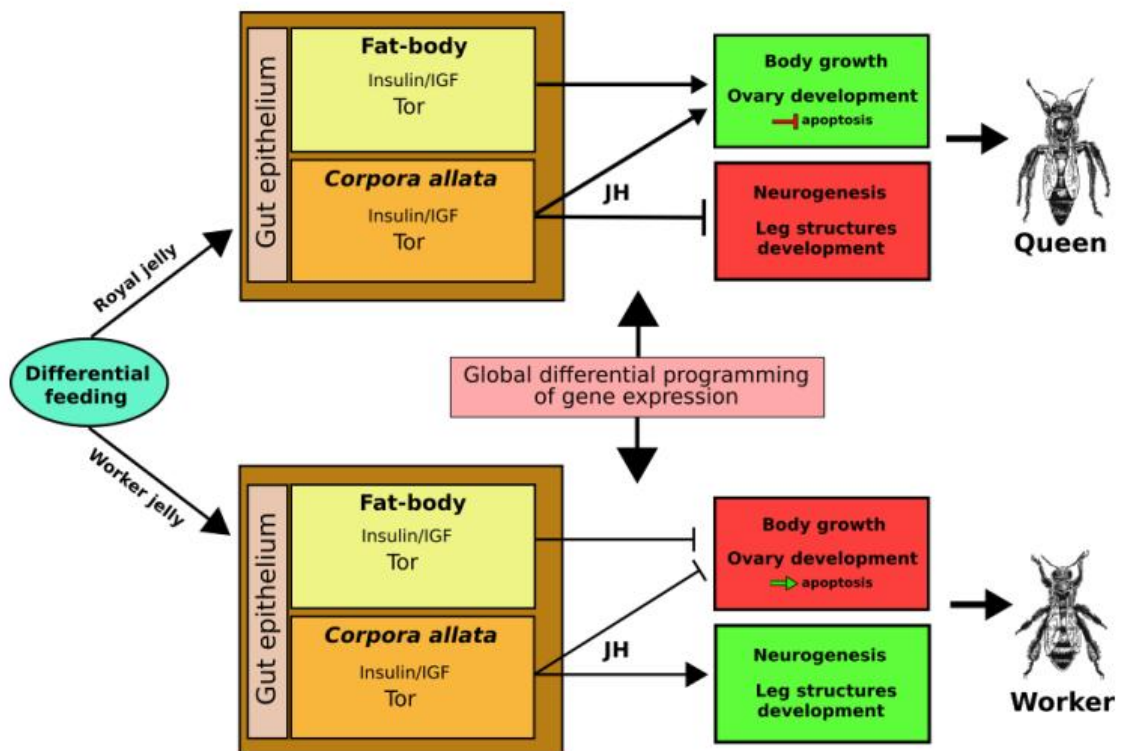
Qualquer larva selecionada para o papel de uma futura rainha é alimentada com grandes quantidades de geleia real. Em contraste, as larvas destinadas a se tornar operárias são alimentadas com uma mistura de geleia real, mel e pólen, denominada “geleia de operária” (MICHENER, 1969). A geleia real difere da “geleia de operária” pela quantidade de secreção de cada glândula das operárias, afetando sua composição. O teor de carboidratos da geleia real é quatro vezes maior do que o oferecido às larvas de operárias. Contudo, a razão glicose:frutose é praticamente a mesma nas duas secreções (ASENCOT; LENSKY, 1988). A geleia real é um alimento rico em carboidratos, vitaminas do complexo B, minerais, proteínas, lipídios e sais minerais (BENITEZ, 2000).

Neste inseto altamente eussocial, a alimentação diferencial de larvas destinadas a ser rainha ou operária, nos primeiros estágios larvais, desencadeia uma resposta endócrina importante, marcada por diferenças pronunciadas nos títulos de hormônio juvenil (HJ) na hemolinfa, sintetizado pelos *corpora allata* (CA), um par de glândulas localizadas no complexo retrocerebral (NIJHOUT; WHEELER, 1982; WHEELER, 1986; RACHINSKY; HARTFELDER, 1990; HARTFELDER; ENGELS, 1998). Sob níveis desiguais de HJ

(Figura 1), as larvas que originarão cada casta seguem linhas distintas de desenvolvimento, pela ativação de diferentes redes gênicas. Em *A. mellifera* entre o terceiro e o início do quinto estágio larval os títulos de HJ são mais altos em rainhas do que em operárias (RACHINSKY et al., 1990; HARTFELDER; ENGELS, 1998). O HJ é considerado o fator endógeno decisivo que induz o desenvolvimento de larvas de abelhas *A. mellifera* em rainha (RACHINSKY; ENGELS, 1995).

## 1.2 DIFERENCIAÇÃO DE CASTAS EM *A. MELLIFERA*

A disponibilidade da sequência do genoma de *A. mellifera* (A Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) facilitou as abordagens genômicas para investigar fatores moleculares e mecanismos subjacentes à organização social e estabeleceu firmemente a abelha como um organismo modelo para tais estudos (ROBINSON et al., 2005). A partir de resultados de análise da expressão gênica diferencial durante o período crítico do desenvolvimento de operárias e rainhas, obtidos mediante hibridação de *microarrays* de cDNA, nosso grupo propôs o primeiro modelo para a diferenciação de castas em *A. mellifera* (BARCHUK et al., 2007; ver Figura 2). Neste, a informação nutricional é reconhecida pelo sistema nervoso estomatogástrico da larva e transmitida ao cérebro e ao sistema endócrino, regulando a atividade dos CA e o comportamento dos tecidos alvos através de moléculas da via insulina/IGF, eventualmente, secretadas pelas células neurosecretoras do cérebro larval (BOLELI et al., 1998; WHEELER et al., 2006). Outro órgão sensível, o corpo gorduroso, recebe a informação do estado nutricional através da hemolinfa. Em futuras rainhas, mediante a ação promotora da geleia real, esta via resulta em altos níveis de ativação dos sistemas insulina/IGF e TOR, o que aumenta os níveis de síntese de HJ nos CA (ver recente trabalho de CAMERON; DUNCAN; DEARDEN, 2013, que mostra a super-expressão de genes da via de síntese em rainhas), e pode disparar o caminho de comunicação sistêmica mediada por ALS (subunidade ácido-lábil) no corpo gorduroso. A “geleia de operária”, por outro lado, afeta a via insulina/IGF de uma maneira menos pronunciada e pode não ser capaz de aumentar os níveis de HJ acima de um limiar específico (BARCHUK et al. 2007).



**Figura 2** - Modelo geral da diferenciação de castas em *Apis mellifera*. A espessura da flecha indica o nível de ação relativa ao fator considerado.

Fonte: BARCHUK et al., 2007.

Como resultado dos altos títulos de HJ em rainhas, a expressão de genes fisiometabólicos é regulada positivamente e, em conjunto com os nutrientes provenientes da geleia real, determinam o padrão de crescimento corporal. Neste modelo, a regulação positiva de *tor* em larvas de rainhas pode ser vista como um determinante da taxa de crescimento diferencial (BARCHUK et al., 2007; PATEL et al., 2007). De maneira interessante, estudos feitos em *Blattella germanica* mostraram uma relação funcional entre atividade de Tor e síntese de HJ (MAESTRO; COBO; BELLÉS, 2009), o qual explicaria os elevados níveis de expressão de *tor* em larvas de rainhas e os simultâneos altos títulos deste hormônio.

O HJ parece atuar determinando dois tipos de alterações no padrão de desenvolvimento: alterações de aquisição, que determinam um maior crescimento corporal da larva ou de campos específicos, especialmente dos ovários, e alterações de perda de estruturas específicas, como o órgão coletor de pólen e as glândulas de cera (BARCHUK et al., 2007; BOMTORIN et al., 2012; MEDVED; HUANG; POPADIC, 2014). Além disso, o HJ é, provavelmente, o controlador da expansão do desenvolvimento neural, especificamente dos corpos cogumelares, resultando em um cérebro proporcionalmente maior em rainhas quando comparado ao de operárias na fase larval (MODA et al., 2013). A regulação da síntese de HJ



em abelhas pode ter ainda a participação de outra via, a do EGFR, como reportado por Kamakura (2011). Este autor demonstrou que uma proteína presente na geleia real, designada como “royalactina” (57 kDa), é uma das responsáveis por induzir a diferenciação de larvas de abelhas melíferas em rainhas. Esta proteína ativa a quinase p70, a qual é responsável pelo aumento do tamanho do corpo e da atividade da proteína quinase ativada por mitógenos, estando envolvida na redução do tempo de desenvolvimento e no aumento dos títulos de HJ.

Mais de uma via de regulação parece, assim, participar dos processos de diferenciação de castas em *A. mellifera*. Em 1974, Rembold et al., em uma corrida pela identificação do “determinador” de castas, conseguiram isolar da geleia um composto pequeno e hidrofílico, que poderia ser o responsável pelo desenvolvimento de rainhas. De maneira interessante, recentemente foi demonstrado que as diferenças nos tipos de geleia oferecida a larvas de rainhas e operárias estendem-se ao conteúdo de moléculas que atualmente estão sendo bastante estudadas, o miRNA, uma molécula pequena e hidrofílica. As geleias de rainhas e operárias possuem diferentes perfis quantitativos e qualitativos destas moléculas, participando, também, na regulação dos eventos de desenvolvimento que levam à diferenciação de castas (SHI et al., 2012; GUO et al. 2013).

### 1.3 O SISTEMA NERVOSO E A NEUROGÊNESE DE *A. MELLIFERA*

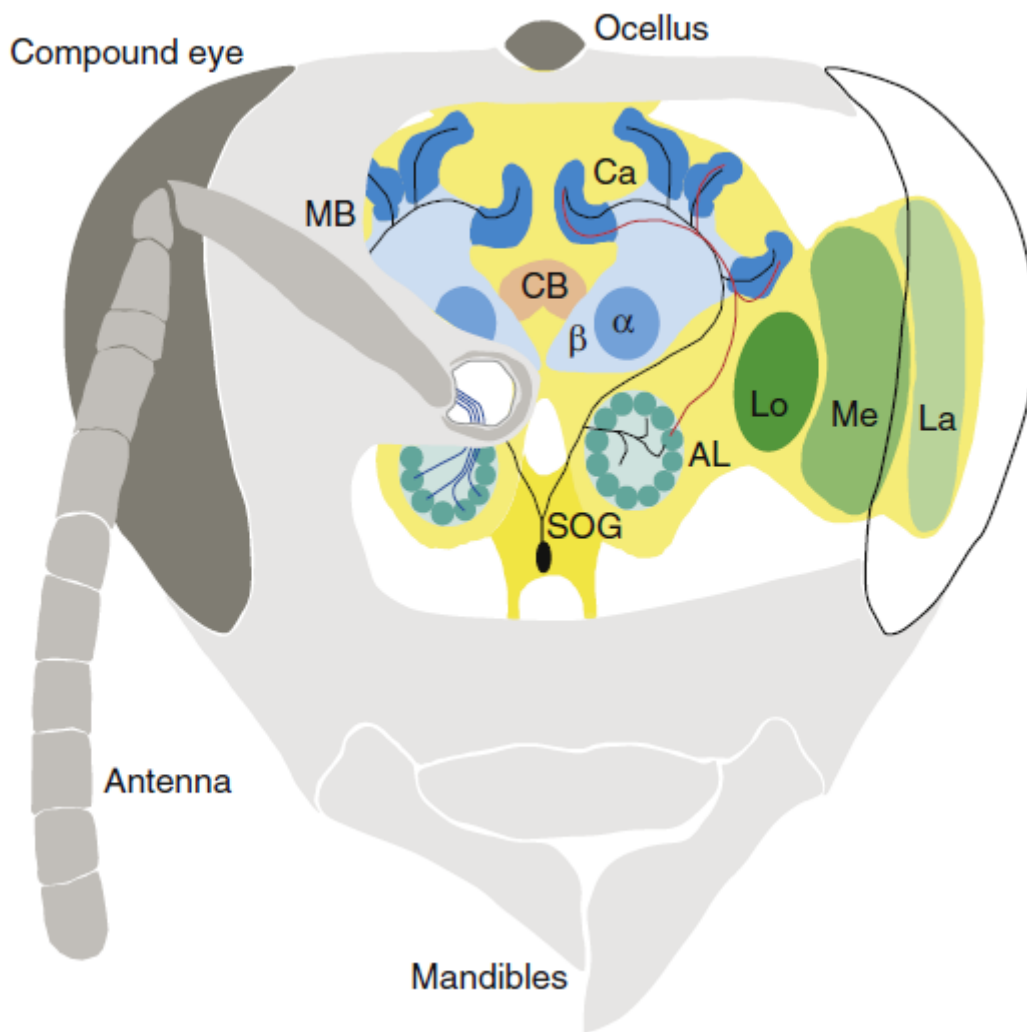
As estruturas cerebrais de abelhas são bem estabelecidas, sendo que os primeiros relatos datam do século XIX (KENYON, 1896; MOBBS, 1982). Dentre as espécies que não possuem neurogênese adulta (FAHRBACH; STRANDE; ROBINSON, 1995), as abelhas são insetos com um sofisticado sistema de orientação espacial, apresentando memória e capacidade de aprendizado bem desenvolvidos, sendo estas características associadas às estruturas cerebrais (MENZEL, 1985; MENZEL; GREGGERS; HAMMER, 1993; HORRIDGE, 2009; SRINIVASAN, 2011). Somando estes fatos, as abelhas *A. mellifera* são organismos ideais para estudos sobre o desenvolvimento do cérebro.

Em embriões de insetos, o cérebro é diferenciado a partir da ectoderme da cabeça embrionária e os gânglios corporais são gerados a partir do cume da neuro-ectoderme (SNODGRASS, 1984). O sistema nervoso das abelhas é formado por um cérebro, que se localiza acima do gânglio subesofágico e um longo cordão nervoso ventral com três gânglios no tórax e oito no abdômen, todos unidos (NIVEN; GRAHAM; BURROWS, 2008).

O cérebro de *A. mellifera* consiste em três regiões principais: o protocérebro, deutocérebro e o tritocérebro (Figura 3). O deutocérebro abriga os lóbulos dorsais e os antenais, os quais contêm, aproximadamente, 160 glomérulos e recebem informações sensoriais dos receptores olfativos das antenas. A partir dos lobos dorsais, principalmente, são projetadas as fibras mecanossensoriais (SUZUKI,1975; SNODGRASS, 1984). O tritocérebro é composto por dois lóbulos bilaterais, relativamente pequenos, na base do cérebro. Tais lóbulos são conhecidos por terem conexões sensoriais e motoras com o aparelho bucal e o trato digestivo, estando adjacentes ao gânglio subesofágico, um relé entre o cérebro e o cordão nervoso ventral (MOBBS, 1982).

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

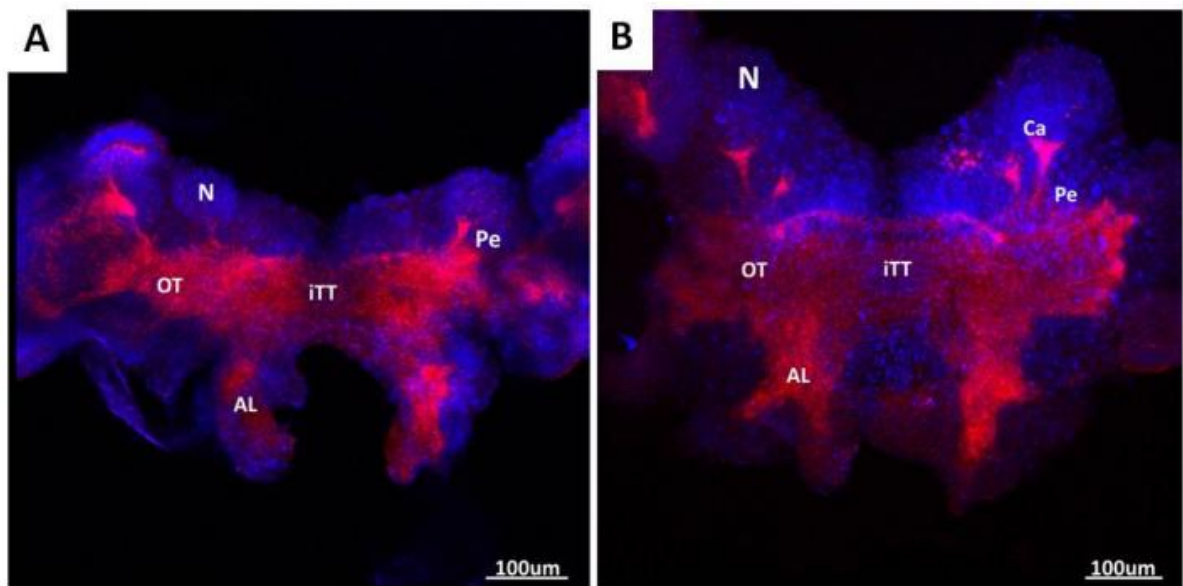
Os corpos cogumelares são estruturas pares, localizadas simetricamente em cada lado do protocérebro e descritas como sendo o centro da base neural para processamento e armazenamento da informação olfatória (DAVIS, 2001; GERBER; TANIMOTO; HEISENBERG, 2004), estando também envolvidas em outras formas de aprendizado (LIU et al., 1999; MIZUNAMI; WEIBRECHT; STRAUSFELD, 1993). Cada corpo cogumelar é formado por aproximadamente 170.000 células Kenyon, neurônios intrínsecos dessa estrutura (KENYON, 1896). As suas arborizações dendríticas originam neuropilas dispostas concentricamente formando os cálices medial e lateral. Cada cálice é dividido em três subcompartimentos, denominados lábio, colar e anel basal (RYBAK; MENZEL, 1998; STRAUSFELD, 2002), os quais recebem impulsos sensoriais processados das regiões óptica e olfatória do cérebro e impulsos mecanossensoriais da cabeça. Projeções axonais das células de Kenyon originárias dos cálices projetam feixes para o mesencéfalo, formando assim o pedúnculo e os lobos verticais e medial dos copos cogumelares (STRAUSFELD, 2002).



**Figura 3** - Desenho esquemático dos três principais compartimentos do cérebro de *A. mellifera*. O protocérebro contém os lóbulos ópticos, a lâmina (La), a medula (Me) e o lóbulo (Lo), um par de corpos cogumelares (MB) e o complexo central (CB). Cada corpo cogumelar consiste em um cálice lateral e um cálice mediano (Ca), os quais são conectados aos lóbulos  $\alpha$  ( $\alpha$ ) e  $\beta$  ( $\beta$ ) pelo pedúnculo. O lóbulo antenal (AL) é parte do deutocérebro, o qual contém o lobo dorsal (não mostrado). O tritocérebro (não mostrado) é composto por dois pequenos lóbulos laterais na base do cérebro.

Fonte: CHITTKA; NIVEN, 2009.

A estrutura dos corpos cogumelares é primeiramente determinada pela morfologia das células Kenyon, que são os neurônios intrínsecos dos corpos cogumelares (KENYON, 1896; MOBBS, 1982). Em *A. mellifera*, três tipos de células Kenyon podem ser facilmente identificadas, de acordo com o tamanho e localização de seus corpos celulares (MOBBS, 1982). Cada uma dessas subpopulações é gerada em períodos distintos do desenvolvimento dos corpos cogumelares (FARRIS; SINAKEVITCH, 2003; MODA et al., 2013, FIGURA 4).



**Figura 4** - Cérebro de operária (A) e rainha (B) *A. mellifera* durante o quinto estágio do desenvolvimento larval. Os cérebros foram corados com DAPI (núcleos, em azul) e faloidina (filamentos de actina-F, em vermelho). Notam-se claramente estruturas dos corpos cogumelares: cálices (Ca) e pedúnculos (Pe), e lobos antenais (AL) bem mais desenvolvidos em rainhas.

Fonte: MODA et al., (2013).

A proliferação neural nos corpos cogumelares inicia-se no primeiro estágio larval, pela divisão celular simétrica de neuroblastos (MALUN, 1998; FARRIS et al., 1999). Roat e Landim (2008) mostraram que o cérebro de rainhas apresenta uma área maior de neuroblastos em relação ao cérebro de operárias durante o último estágio larval e a primeira metade do desenvolvimento pupal. Este crescimento manifesta-se morfologicamente em cérebros diferencialmente desenvolvidos, sendo mais aparente entre o quarto e o quinto estágio larval (MODA et al., 2013).

Embora algumas poucas células menores estejam associadas aos grupos de neuroblastos nos dois primeiros estágios, um grande número de células-mães ganglionares (GMCs) aparece inicialmente em L4. GMCs com fusos mitóticos aparecem primariamente nos limites exteriores de cada grupo de neuroblastos, aparentemente movendo-se para a superfície do grupo antes de se dividirem para produzir duas células Kenyon. Conforme a neurogênese procede, mais GMCs migram para a superfície do grupo e dividem-se e as novas células Kenyon deslocam as células nascidas anteriormente para longe do centro. Células Kenyon movem-se, de maneira preferencial, dorsalmente e externamente, como uma consequência das diferentes posições dos grupamentos de neuroblastos relativas à neurópila dos corpos cogumelares. O resultado neste caso é um arranjo concêntrico de corpos de células Kenyon associado a cada cálice de corpos cogumelares adultos (FARRIS et al., 1999).

A neurópila de corpos cogumelares aumenta seu volume cerca de 30% nas três primeiras semanas de vida, evento que coincide com o início do forrageamento. Este processo de crescimento pode ser acelerado pelo início precoce deste tipo de comportamento (WITHERS; FAHRBACH; ROBINSON, 1993, 1995; DURST; EICHMULLER; MENZEL, 1994), mas ocorre mesmo em abelhas criadas no isolamento social e no escuro (FAHRBACH et al., 1998). Como esperado, as operárias possuem corpos cogumelares proporcionalmente maiores e mais desenvolvidos do que as rainhas (MICHENER, 1974; MODA et al., 2013). Notavelmente, apesar dos corpos cogumelares não apresentarem neurogênese adulta, eles permanecem muito plásticos durante a vida adulta, exibindo um volume dependente de experiências, devido a dendritos maiores e mais ramificados (WITHERS; FAHRBACH; ROBINSON, 1993; FARRIS; ROBINSON; FAHRBACH, 2001).

Sistemas nervosos geram e controlam o comportamento. Comportamentos mais elaborados devem, portanto, exigir cérebros ou componentes do cérebro mais complexos e/ou maiores. Visto isso, operárias adultas necessitam de um cérebro mais desenvolvido que o da rainha, para que possa realizar todas as complexas tarefas exigidas para sua casta de manutenção da colônia. Ao maior desenvolvimento do cérebro de rainhas durante o período larval seguem extensivos eventos de morte celular durante o segundo estágio do desenvolvimento pupal (MALUN, 1998; GANESHINA; SCHÄFER; MALUN, 2000; MALUN; MOSELEIT; GRÜNEWALD, 2003). Estes eventos tornam o cérebro dos indivíduos desta casta proporcionalmente menos desenvolvido que o da operária, o que seria um dos motivos das relações cérebro/corpo e tamanho dos corpos cogumelares/cérebro características de operárias adultas (MICHENER, 1974).

#### 1.4 AMBIENTE E NEUROGÊNESE

A plasticidade fenotípica é a capacidade de um único genótipo produzir mais de um fenótipo, a nível morfológico, fisiológico e/ou o comportamental em resposta às condições ambientais (WEST-EBERHARD, 1989). Por muito tempo se acreditou que o cérebro não era uma estrutura plástica, sendo fixo e imutável (KANDEL, 2006). Até as últimas décadas pensou-se que a neurogênese estava presente apenas no período crítico de desenvolvimento, e que durante a vida adulta de mamíferos o cérebro não seria capaz de formar novos neurônios. Porém, mais recentemente, trabalhos demonstraram que os cérebros de camundongos,

macacos, homens, e inclusive vertebrados não mamíferos, como pássaros, possuem células proliferativas que migram, se diferenciam, estendem axônios, formam novas conexões e expressam proteínas marcadoras de células nervosas (ERIKSSON et al., 1998; GAGE, 2000; CHAPOUTON; JAGASIA; BALLY-CUIF, 2007). Genes associados à neurogênese adulta foram identificados mediante abordagens genômicas em vários vertebrados, particularmente em camundongos e ratos (GETCHELL et al., 2005; KEMPERMANN et al., 2006; LOUA et al., 2008; WU et al., 2009).

Uma variedade de fatores endógenos, como dominância social, ambientes favoráveis ou mesmo a mudança de ambiente, induzem as células tronco nervosas do cérebro de camundongos adultos, e até mesmo de alguns insetos, como o grilo, a se multiplicarem, aumentarem de tamanho e o número de sinapses (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000; CAYRE et al., 2007; WU et al., 2009). Este fenômeno parece ser mediado, em alguns casos, pela produção de neurotrofinas, e, em outros, pelo aumento da sobrevivência celular, aumentando o número de novos neurônios (NILSSON et al., 1999; LEE; SEROOGY; MATTSON, 2002; MOLTENI; YING; GOMEZ-PINILLA, 2002; KOZOROVITSKIY; GOULD, 2004). O exercício voluntário aumenta significativamente a proliferação de células progenitoras do hipocampo e do número total de neurônios recém-nascidos em grilos, camundongos e ratos (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999; ZHAO et al, 2006; LOUA et al., 2008), e também regula a retrotransposição de L1 em células progenitoras neuronais e em neurônios maduros, o que afetaria a expressão de genes neuronais, contribuindo para a plasticidade neuronal (MUOTRI et al., 2009)

Estudos recentes demonstraram que as interações sociais (como acasalamento, gestação, interação com a prole) também modulam a neurogênese adulta e esta modulação varia dependendo do tipo de estímulo social, região do cérebro, fase de neurogênese adulta e da espécie (LIEBERWIRTH; WANG, 2012).

Embora o alimento tenha sido classicamente percebido como um meio para obter energia e matéria-prima para a síntese de estruturas necessárias para o corpo, a sua capacidade de influenciar a neurogênese está começando a ser reconhecida. Em particular, pesquisas dos últimos anos, apresentaram diversas evidências da influência de fatores nutricionais sobre específicos sistemas e mecanismos moleculares que medeiam o desenvolvimento do cérebro. Pesquisas realizadas por Lee, Seroogy e Mattson (2002) demonstraram que uma redução na ingestão de calorias de 30-40% aumenta a neurogênese hipocampal adulta em roedores, e que esta alimentação restritiva muda a expressão gênica no hipocampo. Estes genes de expressão alterada seriam responsáveis pelo aumento dos níveis de fatores neurotróficos como BDNF

(fator neurotrófico derivado do cérebro) e neurotrofina-3 responsáveis pela proliferação e diferenciação neuronal no hipocampo.

Park et al. (2010) demonstraram que dieta rica em gordura prejudica a proliferação de células progenitoras neuronais e a neurogênese, devido ao aumento de peroxidação lipídica e diminuição da produção de fator neurotrófico BDNF no hipocampo, participante da diferenciação neuronal. A obesidade causada por esse tipo de dieta poderia induzir disfunção cognitiva e de aprendizagem e perda de memória. No mesmo âmbito, Lee et al., (2010) estudaram a influência destas dietas sobre a transcrição gênica no hipotálamo de camundongos. Dentre os transcritos diferencialmente representados (TDRs), cinco sequências codificadoras de moléculas relacionadas à síntese e liberação de dopamina, um crítico neurotransmissor relacionado à sensação de prazer, foram reguladas positivamente no grupo tratamento em relação a animais que receberam dieta controle. O desequilíbrio nas concentrações de diferentes neurotransmissores, dentre eles a dopamina, em regiões do cérebro relacionadas às atividades emocionais tem sido proposto como a base neurológica da doença de Alzheimer (LANARI et al., 2006).

Do ponto de vista molecular, pesquisas confirmam que dietas com alto teor de gordura apresentam um papel importante no desenvolvimento de desordens neurodegenerativas. Mateos et al. (2009) identificaram 37 genes diferencialmente transcritos entre o cérebro de camundongos tratados com a dieta citada em relação a camundongos controles. Destes, genes codificadores de moléculas relacionadas à doença de Alzheimer foram regulados positivamente no grupo tratado. O gene codificador da proteína associada ao citoesqueleto, Arc, relacionada à plasticidade sináptica, foi regulado negativamente no mesmo grupo.

A ingestão em nível correto de algumas vitaminas vem sendo relacionada à regulação do sistema nervoso. Hyland et al. (2006) encontraram 45 genes diferencialmente transcritos entre o córtex cerebral de animais tratados com dieta pobre em vitamina E em relação ao grupo controle. Dentre estes, genes codificadores de componentes protéicos da mielina e de determinantes da propagação do sinal neural foram regulados negativamente no primeiro grupo. Bonnet et al. (2008) fizeram trabalhos com ratos Wistar tratados com dietas deficientes em vitamina A, e descobriram que esta vitamina está envolvida na desregulação da neurogênese adulta do hipocampo, devido à interrupção da via de sinalização retinóide. Essa desregulação pôde ser corrigida pelo tratamento destes animais com ácido retinóico, sugerindo uma importante participação da vitamina A e do ácido retinóico na modulação do cérebro em ratos adultos. Somando a essas descobertas, as deficiências de ambas as vitaminas são apontadas como fatores responsáveis por síndromes neurológicas características, como

transtornos afetivos, esquizofrenia e doença de início tardio de Alzheimer, as quais podem ser acompanhadas por anormalidades eletrofisiológicas da função neural e visual (HAYTON; MULLER, 2004; GOODMAN, 2006; PALHA; GOODMAN, 2006; BREMNER; MCCAFFERY, 2008).

A geleia real, substância secretada pelas glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias adultas jovens (PIERRE, 1981), é conhecida por suas atividades biológicas em vários tipos de células e tecidos de modelos animais. Hashimoto et al. (2005) demonstraram que a administração oral de geleia real regula positivamente a transcrição do mRNA do fator neurotrófico derivado de células gliais, um potente fator neurotrófico do cérebro, e do neurofilamento H, marcador específico predominantemente encontrado em axônios, no hipocampo de camundongos adultos. Além disso, o ácido 10-hidróxi-2-decenóico (10-HDA), principal componente da fração lipídica da geleia real, estimula a diferenciação de células-tronco neurais em neurônios, um fenômeno também observado usando butirato de sódio e ácido valpróico (HATTORI et al., 2007; YU et al., 2009; YAO et al., 2010). Em mamíferos, o 10-HDA pode reativar a expressão de genes silenciados epigeneticamente (DOLINOY; WEIDMAN; JIRTLE, 2007). Spannhoff et al. (2011) constataram que o 10-HDA apresenta atividade inibitória de histonas desacetilases. Tal atividade nos leva a especular que o 10-HDA esteja envolvido na regulação epigenética do desenvolvimento diferencial de castas em *A. mellifera*, particularmente do cérebro.

Durante o desenvolvimento do cérebro, os nutrientes provenientes da dieta também podem interferir no processo de neurogênese. Dietas deficientes ou desbalanceadas durante estágios críticos do desenvolvimento podem alterar o desenvolvimento normal do cérebro, além de surtirem efeitos de longa duração e potencialmente irreversíveis na função neural, independentemente da adoção tardia de uma dieta adequada (DOBBING; HOPEWELL, 1971). No início do desenvolvimento de humanos, a privação de comida por um longo prazo pode aumentar as chances de se desenvolver diabetes e obesidade na vida adulta (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976; RAVELLI et al., 1998). Outros trabalhos estabeleceram associações fortes entre dieta pobre em proteínas durante as primeiras semanas de vida e alterações estruturais e comportamentais em ratos (RUDY; CASTRO, 1990; FUKUDA; FRANÇOLIN-SILVA; ALMEIDA, 2002). Um experimento realizado com ratos Sprague–Dawley mostra que a restrição de nutrientes durante o início da vida induz um duradouro déficit na proliferação de células no hipocampo, mas não afeta negativamente o processo de diferenciação de novas células geradas (MATOS et al., 2011). Isto explica a redução no



número absoluto de neurônios em animais mal alimentados durante o desenvolvimento perinatal.

Os ácidos graxos  $\omega$ -3 encontram-se enriquecidos nas membranas de células do cérebro, e podem alterar a taxa de neurogênese por meio de suas contribuições para a estrutura dinâmica e função das membranas neuronais (YEHUDA; RABINOVITZ; MOSTOFISKY, 1998). Outra forma destes ácidos graxos modularem a neurogênese é pela influência nos níveis de citocinas e neurotrofinas, moléculas associadas à regulação e promoção da neurogênese e sobrevivência neuronal (SHAHBAKHTI et al., 2004; WU; YING; GOMEZ-PINILLA, 2004). Estes ácidos graxos são essenciais em grandes quantidades durante a neurogênese de mamíferos, principalmente durante o desenvolvimento fetal e neonatal (MARTINEZ, 1992; INNIS, 2003). Uma vez que as células dos mamíferos não apresentam enzimas que sintetizam ácidos graxos do tipo  $\omega$ -3, este deve ser proveniente da dieta. Bertrand, O'Kusky e Innis (2006) e Innis (2007) mostraram alterações no desenvolvimento do cérebro de ratos que receberam uma dieta deficiente em  $\omega$ -3. Trabalhos semelhantes realizados com aves e, também, com lagostas mostraram resultados equivalentes (ANDERSON; CONNOR; CORLISS, 1999, BELTZ et al., 2007).

Um dos poucos trabalhos publicados vinculados tangencialmente à influência da dieta sobre padrões de transcrição durante o desenvolvimento do cérebro refere-se aos efeitos tóxicos da ingestão de metil-mercúrio sobre a expressão gênica no desenvolvimento do cérebro com consequências comportamentais (GLOVER et al., 2009). Vários trabalhos mostram estes fenômenos focalizando-se em um ou poucos genes, como o caso da regulação positiva da transcrição do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) em tecidos musculares e no fígado e a não alteração de sua expressão em cérebros de aves (MATSUMURA et al., 1996).

Embora estes estudos dêem ênfase à importância do efeito do ambiente sobre o cérebro, destacando a alimentação, trabalhos adicionais são necessários para determinar os mecanismos moleculares associados a esta influência durante o período de desenvolvimento. Neste contexto, as abelhas melíferas fornecem uma forma de estudo rápida e natural para pesquisas sobre a integração de fatores genômicos e dietários.

## 1.5 SOBRE O PRESENTE TRABALHO

A quantidade e a qualidade de alimento recebido no início do estágio larval de abelhas *A. mellifera* determinam a direção do desenvolvimento: tornar-se rainha ou operária. Uma larva alimentada com “geleia de operária” segue o caminho de desenvolvimento que leva ao surgimento de uma operária adulta, abelha com cérebro proporcionalmente mais desenvolvido do que o das rainhas, que foram alimentadas com geleia real. Um cérebro mais desenvolvido permite às operárias realizar uma variedade de deveres necessários para manter a vida da colônia: forrageamento, cuidado das larvas, limpeza do ninho, proteção, etc. Durante a maior parte do desenvolvimento larval, de alguma forma, os cérebros de rainhas *A. mellifera* apresentam uma maior área de neuroblastos do que os de operárias, o que talvez reflita a importância da qualidade da dieta como responsável por um maior desenvolvimento do sistema nervoso. As rainhas em desenvolvimento, além de receberem maior quantidade de alimento, possuem uma dieta de melhor qualidade, sendo mais homogênea do que a de operária, devido à grande quantidade de proteínas específicas da geleia real (principalmente *major royal jelly proteins*, que correspondem a 90% das proteínas constituintes desta geleia; DRAPEAU et al., 2006). Em resumo, larvas geneticamente idênticas se desenvolvem em duas castas interdependentes quando adultas, rainhas e operárias, dependendo da nutrição recebida nos períodos iniciais do desenvolvimento (PATEL; HAYDAK; GOCHNAUER, 1960; HAYDAK, 1970). Portanto, os primeiros passos da neurogênese diferencial das larvas de abelhas constituem um experimento natural e bom modelo para a identificação de genes envolvidos no desenvolvimento diferencial do sistema nervoso, particularmente do cérebro, e que são influenciados por diferenciais nutricionais.

Apesar de mais de um século de estudos sobre as causas do polifenismo das castas de *A. mellifera*, informações sobre os genes envolvidos no desenvolvimento diferencial do cérebro entre as castas continuam limitadas. Um trabalho anterior realizado por nosso grupo mostrou uma assincronia no desenvolvimento do cérebro entre rainhas e operárias. Isto foi revelado a partir de análises morfológicas do cérebro de rainhas e operárias do terceiro (L3) ao quinto (L5) estágios larvais. Na fase de alimentação do último estágio larval (L5F) duas estruturas bem formadas, pedúnculos e cálice, foram identificadas nos corpos cogumelares de rainhas, mas que não estão presentes nas operárias até uma fase posterior (L5S) (MODA et al., 2013). Neste mesmo trabalho foram analisados, utilizando a técnica de hibridação de lâminas de *microarray* de oligonucleotídeos, quais os transcritos diferencialmente expressos

em cérebros em castas que sofrem influência da alimentação diferencial. O estágio escolhido para análise foi o L4, justamente aquele de maior pico de HJ (ver Figura 1). Essa análise resultou em 16 TDRs que foram analisados *in silico* e demonstraram alto potencial de serem responsáveis por mediar a ação nutricional sobre o desenvolvimento diferencial do cérebro de castas de *A. mellifera* durante o período larval (MODA et al., 2013). Estes genes apresentam padrões de transcrição específicos para cada casta (por exemplo, *APC-4*, *GlcAT-P*, *fax*, *kr-h1* e *shot*), e codificam proteínas que estão potencialmente envolvidas no desenvolvimento dos tecidos cerebrais através do controle da taxa de proliferação celular (*APC-4*, *kr-h1*) e fasciculação (*GlcAT-P*, *fax*, e *shot*). *Shot*, cuja expressão é conhecida por ser necessária para a extensão axonal e proliferação celular, foi encontrado transcrito em níveis significativamente mais elevados em rainhas L4 em comparação operárias.

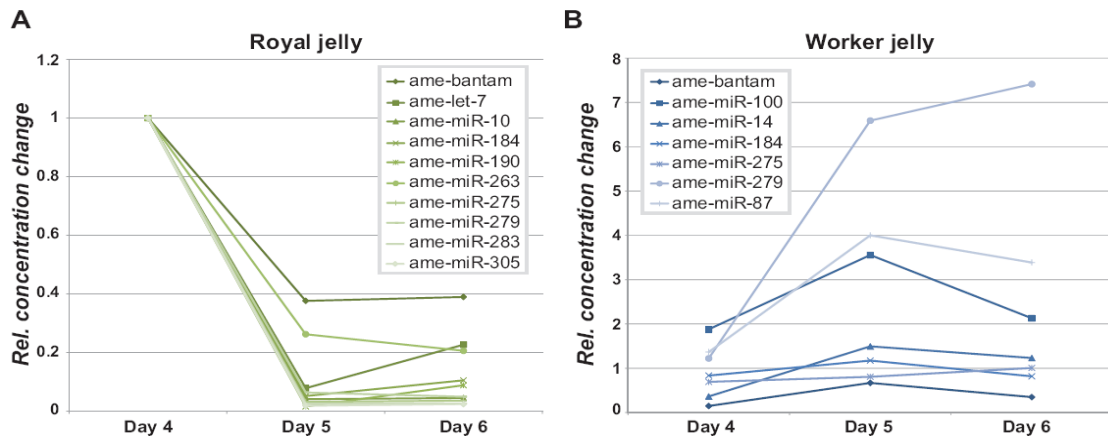
Porém, como não há diferenças morfológicas aparentes entre cérebros de rainhas e operárias antes de L4, hipotetizamos que a alimentação diferencial recebida após a eclosão larval (LEIMAR et al., 2012) promove o estabelecimento de cascatas moleculares em estágios anteriores, que levam à morfogênese diferencial do cérebro observada a partir de L4. O surgimento de novas técnicas de sequenciamento (como o sequenciamento direto de RNA; OZSOLAK et al., 2009) está a permitir a obtenção de bibliotecas transcriptômicas completas de um organismo, tecido, órgão ou mesmo de células. A exploração de bibliotecas de cérebros de L3 de rainhas e operárias possibilitaria uma análise quantitativa de transcritos expressos (mRNAs, miRNAs, lncRNAs) e a realização de estudos mais profundos dos mecanismos moleculares (transcrição diferencial, *splicing* alternativo, eventos epigenéticos, etc.) potencialmente envolvidos no processo de geração do difenismo em *A. mellifera*, podendo levar à identificação de novos genes ou vias associados com o desenvolvimento diferencial do cérebro entre as castas deste organismo. Particularmente, os micro RNAs (miRNAs; RNA não-codificantes de 20-22 nucleotídeos) são moléculas que, em eucariotos, desempenham papéis importantes na regulação gênica pós-transcricional e em outros processos biológicos (AMBROS, 2004; BARTEL, 2004; HE; HANNON, 2004).

Os miRNAs regulam entre 30 e 66% de todos os genes codificadores de proteínas, pelo que são considerados os maiores reguladores da expressão gênica (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005; FRIEDMAN et al., 2009). Estes RNA não-codificantes tem função de silenciar pós-transcricionalmente a expressão do gene através de pareamento de bases com o mRNAs alvo, o qual reprime a tradução, por deadenilação ou degradação. Muitas famílias de miRNA são altamente conservadas, com implicações na regulação de muitos processos biológicos, incluindo a diferenciação celular, o metabolismo, o ciclo celular e o

envelhecimento (FINEBERG; KOSIK; DAVIDSON, 2009; ROUX; GONZALEZ-PORTA; ROBINSON-RECHAVI, 2012; MCLOUGHLIN et al., 2012). O elemento de reconhecimento de miRNA canônico num mRNA alvo consiste de um complemento inverso perfeito ou quase perfeito dos nucleótidos nas posições 2 a 8 através da extremidade 5' do miRNA (conhecida como a região de *seed*), em conjunto com a complementaridade parcial ao longo do resto das seqüências de miRNA e transcrito alvo. Diversos algoritmos são capazes de prever essas interações entre miRNA e mRNA alvo (GRIFFITHS-JONES et al., 2005).

Um trabalho recente (GUO, 2010) mostrou que os miRNAs encontram-se também na geleia real, junto com inúmeros outros tipos moleculares (proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais, e um grande número de substâncias bioativas, especialmente peptídeos e proteínas imunológicas antibacterianas (ZENG et al., 2006; DRAPEAU et al., 2006; FANG; VIUDA-MARTOS et al., 2008; FENG; LI, 2010). Guo et al. (2013) analisaram a composição de miRNAs nas geléias real e de operária. Os resultados mostram que a geleia de operária é muito mais abundante em tipos e concentração de miRNA que a geleia real.

A determinação dos caracteres que distinguem rainha e operárias ocorre em momentos específicos do desenvolvimento larval (PAGE; AMDAM, 2007). Guo et al., (2013) analisaram os miRNAs nas geléias real e de operária durante o curso do desenvolvimento larval. Mediram as concentrações de 22 miRNAs conhecidos na geleia real e de operária coletadas 4, 5 e 6 dias após a eclosão das larvas. Os dados (Figura 5) mostram uma forte queda na concentração de todos os miRNAs testados em geleia real a partir do dia 4 ao dia 5, após o qual os níveis se mantiveram estáveis. Em comparação, as variações nas concentrações de miRNA na geleia de operária eram menores, menos sistemáticas e, em geral positivas, particularmente a partir do dia 4 ao dia 5. Embora miRNAs individuais geralmente não provoquem alterações fenotípicas distintas (BARTELL, 2009), Guo et al., (2013) mostraram que determinados miRNAs fornecidos pela alimentação às larvas de rainhas são capazes de alterar suas características morfológicas específicas na direção das operárias. Além disso, alguns dos mais abundantes miRNAs presentes na geleia de operária, entre outras coisas, parecem regular coletivamente uma série de mRNAs com funções no sistema nervoso (GUO et al., 2013).



**Figura 5** - Concentração de miRNAs em geleias durante o desenvolvimento larval. As amostras foram coletadas nos dias 4, 5 e 6 após a eclosão das larvas e as concentrações dos miRNAs já conhecidos foram avaliadas por qRT-PCR.

Fonte: Guo et al. (2013).

Sabendo da existência de micro RNAs (miRNAs; RNA não-codificantes de 20-22 nucleotídeos) nas geleias real e de operária de *A. mellifera* e de que estes atuam como moléculas reguladoras da expressão de genes codificadores de proteínas (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; WU; BELASCO 2008), particularmente daquela com funções no sistema nervoso, hipotetizamos que podem ser responsáveis pela regulação da expressão de genes casta-específicos expressos em cérebros de L3, e assim, indiretamente, pela diferenciação morfológica inicial observada a partir de cérebros L4 (MODA et al., 2013).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral de nosso trabalho foi identificar determinantes moleculares da diferenciação inicial do cérebro em castas de *A. mellifera*.

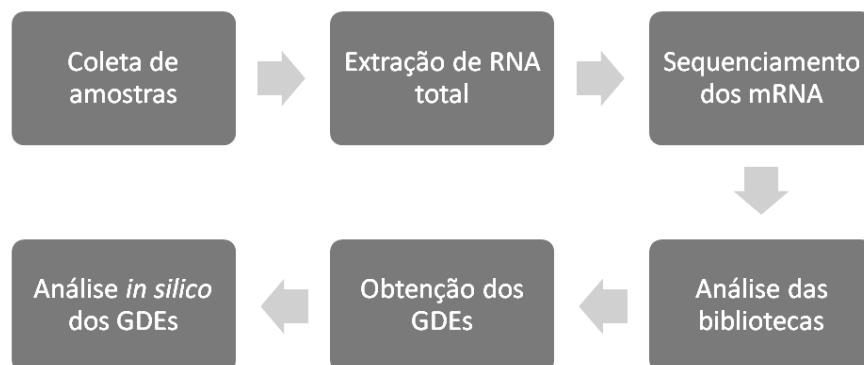
Os objetivos específicos foram:

- Identificar genes diferencialmente expressos (GDE, codificadores de poli-A+) em cérebro de castas de *A. mellifera* no estágio L3.
- Caracterizar os GDEs entre as castas de *A. mellifera* no estágio L3.
- Identificar potenciais alvos de miRNAs da geleia real nos genes diferencialmente expressos em cérebros de L3 de rainhas e operárias.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 VISÃO GERAL

Para o *screening* inicial mediante RNA-Seq, rainhas e operárias de *A. mellifera* do terceiro estágio de desenvolvimento larval (L3) foram coletadas do Apiário Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo. As abelhas coletadas tiveram o cérebro dissecado, do qual foi extraído RNA total. O RNA total passou por purificação com *beads* magnéticas com cauda poli-T, para a obtenção apenas de RNAs poli-A+. Estes foram quebrados em pequenos fragmentos (*reads*) e seqüenciados e agrupados em duas bibliotecas: de rainha L3 e operárias L3. As *reads* foram mapeadas no genoma de referência de *A. mellifera* (versão 4.5). Os dados de ambos mapeamentos, rainha e operária, foram comparados estatisticamente para seleção dos GDEs. Estes dados foram, então, analisados *in silico*. Por outro lado, usando ferramentas informáticas, identificamos, nos GDEs, elementos *cis* que, nos mRNAs, poderiam atuar ligando miRNAs e assim participariam na regulação da sua tradução.



**Figura 6** - Fluxograma experimental.  
Fonte: Da autora.

#### 3.2 COLETA DAS AMOSTRAS

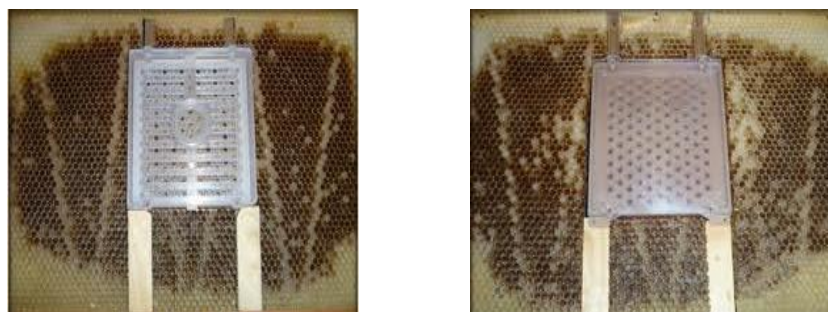
Foram utilizadas abelhas africanizadas provenientes do Apiário Experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão – Universidade de São Paulo. Escolhida a colônia, a rainha foi limitada à caixa inferior do ninho utilizando-se uma

tela excludora (Figura 7). A rainha foi aprisionada para postura por 6h em uma caixa Jenter (Figura 8). O aprisionamento de 6 horas permite que a diferença em idade entre as crias resultantes não seja superior às iniciais 6h. Após esse tempo, a rainha foi solta e logo em seguida foi conferida a existência de ovos (postura) (Figura 9). Completadas 72h de desenvolvimento embrionário, foram feitas as transferências de parte das larvas recém eclodidas, ou larvas de primeiro estágio, destinadas para o desenvolvimento de rainhas, para uma realeira artificial do Kit Jenter, fixada com cera derretida (Figura 10). As outras larvas foram deixadas nas células, nas quais seus respectivos ovos foram depositados, para o desenvolvimento de operárias. Um bastão presente no Kit Jenter foi acoplado à cúpula e por sua vez, esta foi acoplada à realeira artificial, sem a necessidade de adição de geléia real, pois ela já está presente na cúpula transferida. Subsequentemente, a realeira artificial foi inserida numa colônia, permanecendo nela até o dia da coleta. As larvas de ambas castas foram coletadas na fase de desenvolvimento escolhida para estudo (L3), sendo identificadas segundo Michelette e Soares (1993) (Tabelas 1 e 2).



**Figura 7** - A) “Ninho” Caixa para criação de abelhas. B) Tela excludora. Limita o acesso da rainha apenas a um local da colmeia.

Fonte: <criacaodeanimais.blogspot.com>.



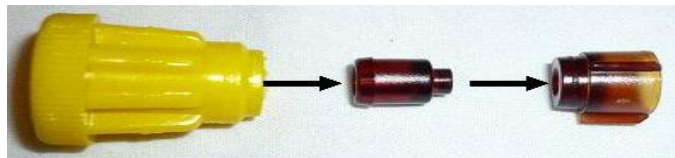
**Figura 8** - Frente e verso de caixa Jenter inserida em quadro limpo.

Fonte: (Cornwall Honey – Beepedia Using the Karl Jenter Kit for Honey Bee Queen Rearng)





**Figura 9** - Cúpulas para ovoposição da rainha contendo larvas recém eclodidas (L1).  
Fonte: (Cornwall Honey – Beepedia Using the Karl Jenter Kit for Honey Bee Queen Rearing)



**Figura 10** - Realeira artificial. A cúpula (primeira peça de cor marrom) é utilizada pela rainha para a postura. Encontra-se inserida na caixa Jenter. Assim que ocorre a eclosão da larva após 72h, esta é acoplada à célula (segunda peça de cor marrom) e ambas acopladas à peça amarela, formando uma realeira artificial, identificada como tal pelas operárias por seu tamanho. A peça amarela é colada com a própria cera da abelha, em uma barra que deve ser inserida na caixa selecionada para criação de rainha, no mínimo 24h antes da transferência.  
Fonte: Cornwall Honey – Beepedia Using the Karl Jenter Kit for Honey Bee Queen Rearing

A dissecação de cérebros foi realizada em solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada. Cada amostra continha uma média de 50 cérebros, incubados em reagente TRIzol® (Invitrogen) e congelados em freezer (-80°C) até o momento da extração do RNA total.

**Tabela 1** - Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) e pupal (P) de operárias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas. A duração dos estágios larvais no desenvolvimento pré-imaginal refere-se às horas após eclosão. Detalhe em cinza: estágio das abelhas que foram utilizadas em nosso trabalho (L3).

Fonte: modificado de Michelette e Soares, (1993).

FASE	CARACTERIZAÇÃO	DURAÇÃO (horas)
Ovo	Embriões de 0 a 72 horas	72 (antes da eclosão)
L1	Peso – 0,0001 a 0,0003 g	0-20 (após eclosão)
L2	Peso – 0,0003 a 0,001 g	20-35
L3	Peso – 0,0015 a 0,004 g	35-55
L4	Peso – 0,004 a 0,0248 g	55-80
L5F1	Peso – 0,029 a 0,06 g	80-95
L5F2	Peso – 0,06 a 0,11 g	95-105
L5F3	Peso – 0,11 a 0,16 g	105-115
L5S1	Célula operculada, larva com intestino	115-130
L5S2	Célula operculada, larva com intestino	
L5S3	Célula operculada, larva com intestino	130-145

<b>PP1</b>	Comprimento tibia-tarso = 1,4 a 1,99 mm	145-160
<b>PP2</b>	Comprimento tibia-tarso = 2,0 a 2,6 mm	160-180
<b>PP3</b>	Comprimento tibia-tarso > 2,6 mm	180-190
<b>Pw</b>	Pupa de olho branco ( <i>white</i> )	190-230
<b>Pp</b>	Pupa de olho rosa ( <i>pink</i> )	230-250
<b>Pdp</b>	Pupa de olho rosa-escuro	250-265
<b>Pb</b>	Pupa de olho marrom ( <i>brown</i> )	265-305
<b>Pbl</b>	Pupa de olho marrom, com pigmentação leve no tórax	305-330
<b>Pbm</b>	Pupa de olho marrom, com pigmentação torácica intermediária	330-370
<b>Pbd</b>	Pupa de olho marrom com pigmentação torácica forte	370-390
<b>RN</b>	Operárias com até 24 horas de vida	

**Tabela 2** - Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) e pupal (P) de rainhas de abelhas européias, *Apis mellifera carnica* Detalhe em cinza: estágio das abelhas que foram utilizadas em nosso trabalho (L3).

Fonte: modificado de Rembold *et al.*, (1980).

<b>FASE</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO</b>	<b>DURAÇÃO (horas)</b>
<b>Ovo</b>	Embriões de 0 a 72 horas	72 (antes da eclosão)
<b>L1</b>	Peso – 0,0001 a 0,0003 g	0-20 (após eclosão)
<b>L2</b>	Peso – 0,0003 a 0,001 g	20-35
<b>L3</b>	Peso – 0,0015 a 0,004 g	35-55
<b>L4</b>	Peso – 0,004 a 0,0248 g	55-80
<b>L5F1</b>	Peso – 0,029 a 0,06 g	80-95
<b>L5F2</b>	Peso – 0,06 a 0,11 g	95-105
<b>L5F3</b>	Peso – 0,11 a 0,16 g	105-115
<b>L5S1</b>	Célula operculada, larva com intestino cheio	115-130
<b>L5S2</b>	Célula operculada, larva com intestino semi	
<b>L5S3</b>	Célula operculada, larva com intestino vazio	130-145
<b>PP1</b>	Comprimento tibia-tarso = 1,4 a 1,99 mm	145-160
<b>PP2</b>	Comprimento tibia-tarso = 2,0 a 2,6 mm	160-180
<b>PP3</b>	Comprimento tibia-tarso > 2,6 mm	180-190
<b>Pw</b>	Pupa de olho branco ( <i>white</i> )	190-230
<b>Pp</b>	Pupa de olho rosa ( <i>pink</i> )	230-250
<b>Pdp</b>	Pupa de olho rosa-escuro	250-265
<b>Pb</b>	Pupa de olho marrom ( <i>brown</i> )	265-305

<b>Pbl</b>	Pupa de olho marrom, com pigmentação leve no tórax	305-330
<b>Pbm</b>	Pupa de olho marrom , com pigmentação torácica intermediária	330-370
<b>Pbd</b>	Pupa de olho marrom com pigmentação torácica forte	370-390
<b>RN</b>	Operárias de até 24 horas de vida	

### 3.3 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

Todas as amostras de cérebros tiveram seu RNA total extraído seguindo o protocolo para extração de RNA do reagente Trizol® (Invitrogen), descrito abaixo.

As amostras foram maceradas em Trizol® para que ficassem homogêneas. A amostra, de um volume total de 0,5 mL do reagente, foi deixada em repouso em temperatura ambiente por 5 min. A seguir, adicionou-se 0,1 mL de clorofórmio para a separação de fases. Os tubos foram agitados rigorosamente por 15 s. e deixados a temperatura ambiente por 2-3 min. A agitação foi repetida e os tubos foram deixados por mais 2-3 min a temperatura ambiente. Os RNAs, foram, então, centrifugados (12.000 g) por 15 min a 4 °C. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa, que foi transferida para um novo tubo. À fase aquosa adicionou-se 0,5 mL de álcool isopropílico para a homogeneização inicial. Para aumentar a eficiência na precipitação do RNA total foram usados 10 µg de glicogênio em cada amostra. Os RNAs foram incubados durante a noite a -20 °C e centrifugados por 1 hora para obtenção do precipitado. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com 1 mL etanol 75%. As amostras foram invertidas para homogeneização e centrifugadas (7.500 x g por 5 min a 4°C).

Para finalizar o procedimento, o sobrenadante foi descartado e o RNA seco em termobloco a 55°C. Depois de seco, o RNA foi redissolvido em H<sub>2</sub>O DEPC e incubado em termobloco a 55°C por 10 min.

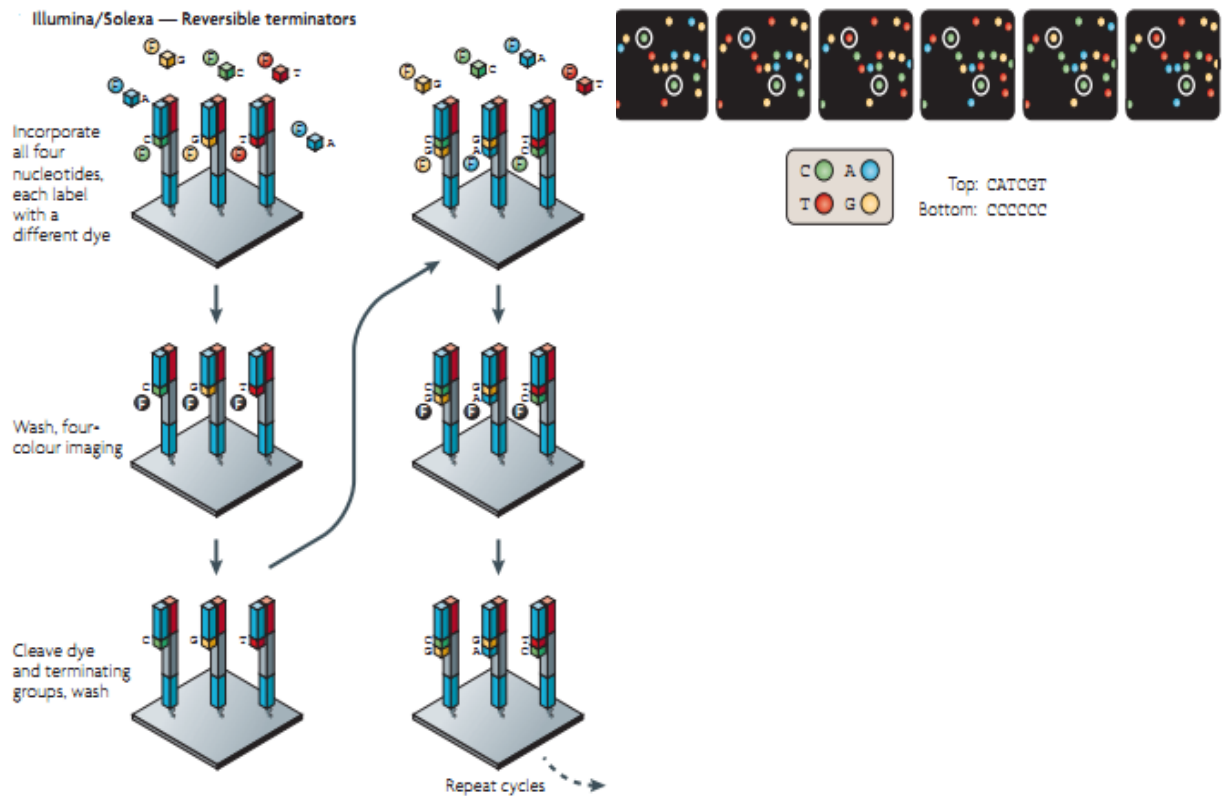
As amostras foram, então, quantificadas em Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), para determinar se havia quantidade mínima (5 µg) para que pudessem ser realizadas as próximas etapas e também para determinar o grau de pureza do RNA. Para isso, foi observada a razão entre as leituras de 260 e 280 nm que devem estar dentro do intervalo de

1.9 e 2.0, utilizado como ideal. Considerou-se que uma unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 40 µg/ml de RNA (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

### 3.4 SEQUENCIAMENTO DOS RNAs poli-A+

O RNA poli-A+ foi obtido com *beads* magnéticas com caudas de poli-T a partir das amostras de RNA total (obtidas como descrito na Seção anterior). Seu sequenciamento foi realizado em plataforma Illumina (*Genome Analyzer II*, Life Sciences) no Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Jaboticabal), a partir de 5 µg de RNA total por amostra, preparados conforme protocolo do TruSeq RNA™ Sample Preparation v2 Guide, Illumina, Life Sciences (kit de preparação de amostras para geração de bibliotecas de mRNA). O RNA purificado foi, então, fragmentado e a partir de cada fragmento foram sintetizadas duas fitas de cDNA. Foram usadas *beads* para selecionar uma das fitas do cDNA, na qual as duas pontas foram ligados adaptadores que permitiram a fixação das fitas numa plataforma sólida para seqüenciamento. Usando o Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer™ verificou a integridade do cDNA e determinou a média de tamanho das moléculas. Tipicamente, o tamanho médio das moléculas é 260 pb (TargetSeq™ Custom Enrichment Kits).

Na plataforma sólida os cDNAs são ligados aleatoriamente, e cada um é usado como molde para a síntese de novas fitas idênticas ao molde. São usados nucleotídeos ligados a quatro moléculas fluorescentes de cores diferentes, uma para cada nucleotídeo (A, C, G e T) (Figura 11). Lasers são capazes de detectar cada nova adição de nucleotídeo em todas os cDNAs moldes simultaneamente. Dessa forma, se obtém os dados de cada uma das seqüências que foram amplificadas, e estes são agrupados para se obter a quantidade de cada uma delas. O sequenciamento permitiu obter bibliotecas de 30 milhões de *reads* de 50 pb de cada amostra de RNA poli-A+ de cérebro.

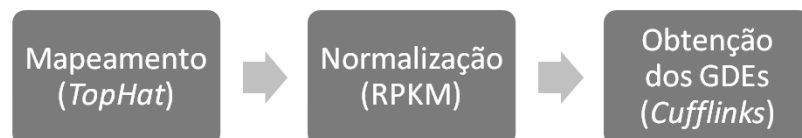


**Figura 11** - Sequenciamento por método Illumina.

Fonte: METZKER, 2010, *Nature reviews*

### 3.5 ANÁLISE DAS BIBLIOTECAS

As bibliotecas foram mapeadas no genoma de *A. mellifera* utilizando a ferramenta *TopHat*. Os dados foram normalizados pelo método RPKM. As análises para obtenção dos GDEs foram feitas utilizando a ferramenta *Cufflinks*.



**Figura 12** - Fluxograma experimental das análises das bibliotecas.

Fonte: Da autora.

### 3.5.1 Mapeamento

Para remover as sequências dos adaptadores (utilizados no preparo das bibliotecas) e para selecionar as *reads* com qualidade maior que 20 [reflete acerto de 99% do reconhecimento das bases ou *base calling*, (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998)], foram usados os programas *Cutadapt* (<http://code.google.com/p/cutadapt/>) e *Scythe* (<http://github.com/vsbuffalo/scythe>). Após a remoção dos adaptadores, as *reads* foram filtradas de acordo com a qualidade e tamanho (50 pb) e, então, mapeadas contra a versão 4.5 do genoma de *A. mellifera*. O mapeamento foi realizado usando o programa *TopHat* (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009) que promove a correspondência (*match*) entre as sequências das *reads* e as da base de dados (genoma de referência) por meio de um outro programa, o *Bowtie2* (LANGMEAD; SALZBERG, 2012). O programa TopHat gera arquivos no formato SAM que apresentam diversas informações sobre o mapeamento das *reads* (como a qualidade do sequenciamento para cada *read*, a sequência de nucleotídeos de cada *read*).

### 3.5.2 Normalização

Para as análises seguintes, foram selecionadas as *reads* que mapearam nas sequências codificadoras de *A. mellifera* (mRNAs). Para tornar esses valores comparáveis, os dados foram quantificados em *reads* por quilobase do transcrito por milhão de *reads* mapeadas (RPKM, MORTAZAVI et al., 2008). Essa normalização visa eliminar a diferença de tamanho entre as sequências, já que um gene maior provavelmente será quebrado em mais sequências dando a falsa impressão de que foi mais expresso do que um gene menor.

### 3.5.3 Obtenção dos GDEs

Os dados normalizados também foram analisados estatisticamente para a obtenção das sequências diferencialmente representadas entre as castas. Para isso utilizamos o pacote *Cufflinks* (TRAPNELL et al., 2013), que realiza a montagem de transcritos estimando suas

abundâncias e testando a expressão diferencial em experimentos RNA-Seq. A estimativa é feita baseada em quantas leituras suportam cada transcrito, levando em consideração os vieses nos protocolos de preparação das bibliotecas. A análise de expressão gênica foi realizada por meio de um roteiro de execução dos seguintes programas: *cufflinks*, *cuffmerge* e *cuffdiff*.

### 3.6 ANÁLISES *IN SILICO* DOS GDES

Os GDEs entre o cérebro de rainhas e operárias, ambas na fase larval L3, foram, então, analisados *in silico*. A sequência nucleotídica e a proteína predita de cada GDE foram obtidas por meio da ferramenta Genome Browser Gateway (<http://kerr.fmrp.usp.br:88/cgi-bin/hgGateway>). As sequências das proteínas preditas foram usadas para encontrar o ortólogo de *Drosophila melanogaster* correspondente a cada GDE permitindo estudar as possíveis funções destes através de artigos.

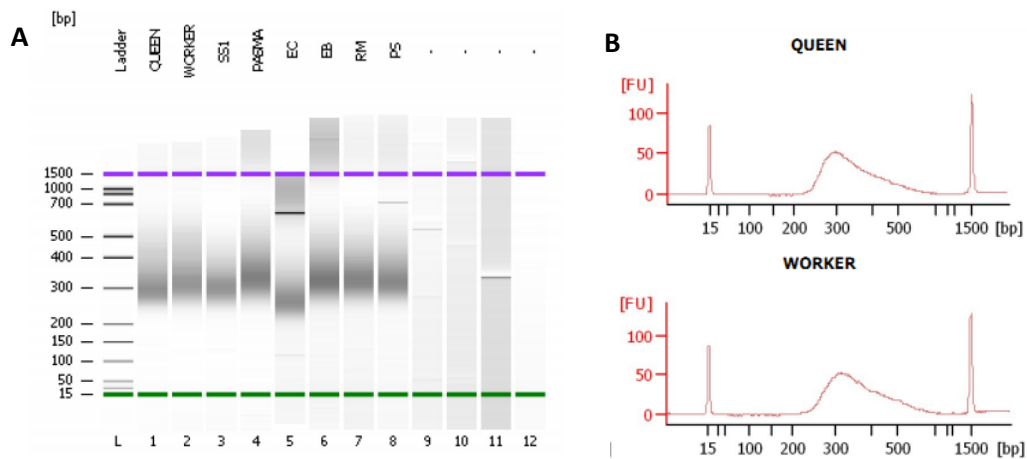
### 3.7 IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO PARA OS miRNAs PRESENTES NAS GELÉIAS REAL E DE OPERÁRIAS NAS REGIÕES 3' UTRs DOS GDEs

Buscou-se identificar as interações miRNA-alvo envolvendo GDEs identificados neste trabalho e os miRNAs encontrados nas geléias real e de operária (GUO et al., 2010). As sequências dos miRNAs presentes em geléias real e de operária foram recuperadas do miRBase (versão 20). Uma busca por sítios de ligação de miRNA foi realizada em uma região de 1000nt a jusante ao códon de terminação dos GDEs previamente identificados. Essas regiões 3' UTRs foram usadas para os genes da abelha cuja anotação ainda não foi concluída. Foi feita uma análise de enriquecimento dos mRNAs comparando o número de sítios alvos dos genes de todo o genoma para os miRNAs das geléias e o número dos GDEs encontrados neste trabalho. A busca por sítios de ligação de miRNAs, que tiveram  $p > 0,05$  na análise de enriquecimentoem, 3'UTRs de abelhas foi realizada pelo programa RNAhybrid (REHMSMEIER et al., 2004; KRUGER; REHMSMEIER, 2006). Foram consideradas apenas as previsões com energia livre  $\leq -20$  kcal /mol, e valor de  $p < 0,05$  e utilizado programa Cytoscape para gerar a rede de miRNA-alvo (SHANNON et al., 2003).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 SOBRE OS TRANSCRIPTOMAS DE CÉREBROS DE LARVAS L3 DE RAINHAS E OPERÁRIAS

As amostras de cDNA total foram analisadas por *Bioanalyzer* e se mostraram viáveis para o sequenciamento, visto que o tamanho da maioria dos fragmentos estava em torno de 260pb (Figura 13).



**Figura 13** – A) Imagem mostrando o resultado da eletroforese feita com as amostras de RNA total que tem sua maioria de fragmentos de tamanho em torno de 300 pb. B) Gráficos mostrando o resultado da eletroforese mostrada em “A”. Os picos de 15 e 1500 pb correspondem aos marcadores. BP: pares de base; L: Lane, número da coluna que está a amostra; FU: fluorescência

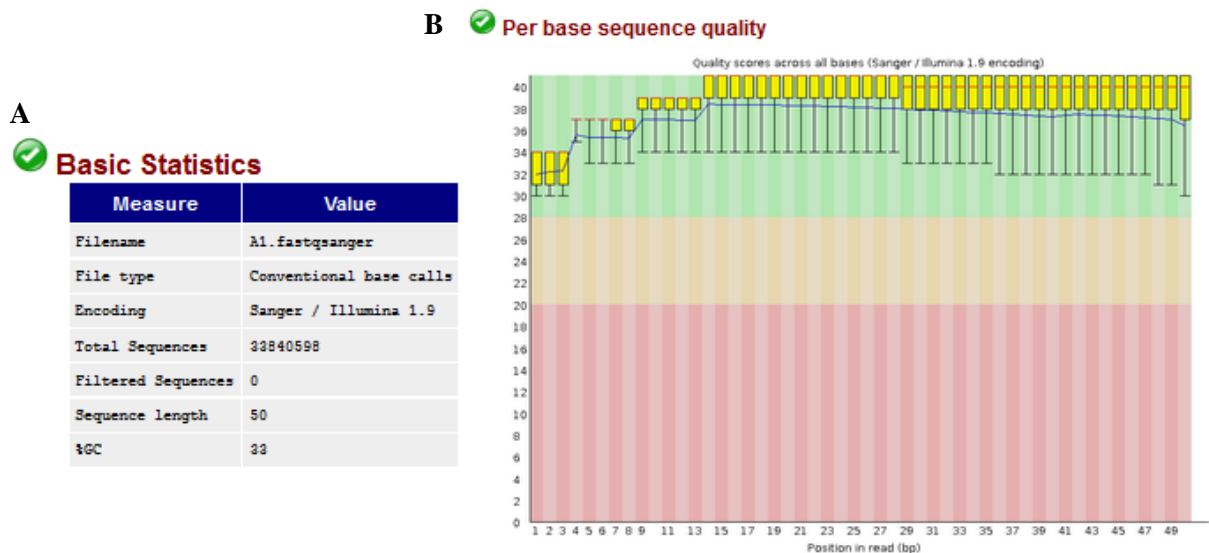
Fonte: Da autora.

As amostras de mRNA de cérebros de larvas de terceiro estágio de rainhas e operárias de *A. mellifera* foram sequenciadas em plataforma Illumina. Os dados gerados foram normalizados e comparados seguindo um *script* desenvolvido em *Shell*, que é uma interface para interpretação e execução de comandos de programação.

O sequenciamento gerou aproximadamente 30 milhões de sequências (*reads*) para cada uma das bibliotecas (cérebros de rainha e operárias em 3º estágio). Para analisar a qualidade do sequenciamento foi utilizada a ferramenta FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Pelas análises estatísticas básicas, as duas bibliotecas tiveram *reads* de tamanho esperado (50pb) (Figuras 14A e 15A). As bibliotecas tiveram também uma profundidade adequada garantindo que as *reads* geradas nos sequenciamentos cubram a maior parte do genoma (~30 milhões de *reads*), o que permite

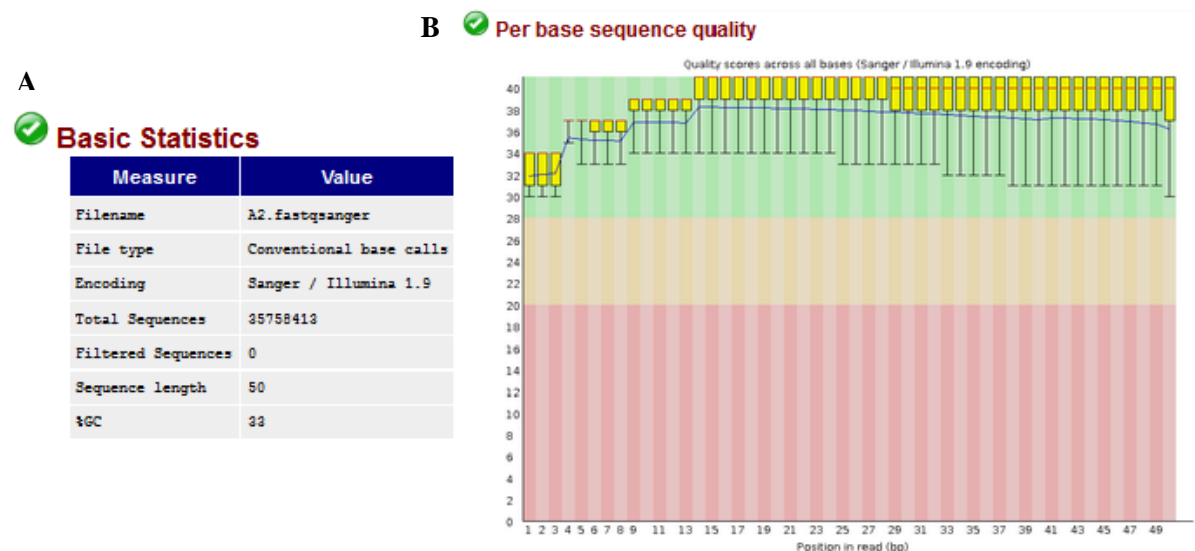


que genes com baixa expressão tenham cobertura. Uma segunda análise avaliou a qualidade de cada base sequenciada, mostrando que o sequenciamento foi de alta qualidade, pois a menor qualidade apresentada para uma base foi 30 (1 erro a cada 1000 bases) (Figuras 14B e 15B).



**Figura 14** - Resultado das análises do sequenciamento da biblioteca de cérebros de rainhas de *A. mellifera* na fase L3 pelo software FastQC. A) A tabela mostra as análises estatísticas básicas: nome da amostra, tipo, sequenciador, número total de seqüências, seqüências filtradas, tamanho das seqüências e porcentagem de GC. B) O gráfico representa a média de qualidade (eixo y) para cada base de mesma posição em cada uma das *reads* sequenciadas (eixo x).

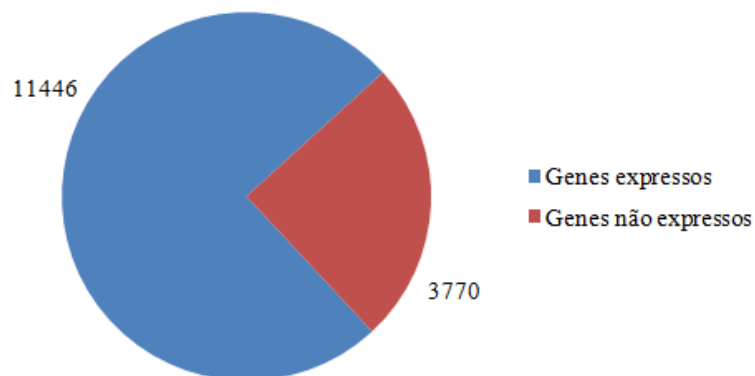
Fonte: Da autora.



**Figura 15** - Resultado das análises do sequenciamento da biblioteca de cérebros de operárias de *A. mellifera* na fase L3 pelo software FastQC. A) A tabela mostra as análises estatísticas básicas: nome da amostra, tipo, sequenciador, número total de seqüências, seqüências filtradas, tamanho das seqüências e porcentagem de GC. B) O gráfico representa a média de qualidade (eixo y) para cada base de mesma posição em cada uma das *reads* sequenciadas (eixo x).

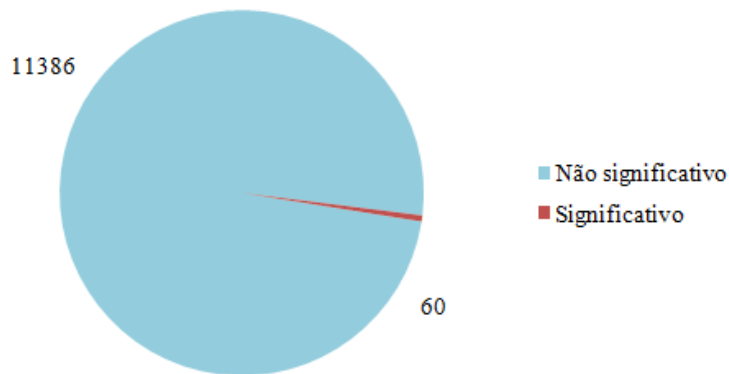
Fonte: Da autora.

As *reads* foram filtradas de acordo com qualidade e tamanho (50 pb), sendo que 761.645 *reads* na biblioteca de rainhas e 918.020 *reads* na biblioteca de operárias não estavam no tamanho esperado e foram excluídas, representando respectivamente 2,25% e 2,58% do total de *reads* de cada biblioteca (33.779.118 e 35.558.679). Após terem passado pelo filtro, as *reads* foram alinhadas ao genoma de *Apis mellifera* versão 4.5 (GenBank2011). Este procedimento permitiu mapear das aproximadamente 30 milhões de *reads* iniciais, 24.345.136 *reads* na biblioteca de rainha e 21.609.337 na biblioteca de operária. Estes valores correspondem a 73,73% de *reads* mapeadas para rainhas, e 62,38% para operárias. Estas *reads* encontraram correspondência com 11.446 genes dos 15.216 genes totais já preditos para este organismo (Figura 16). Dentre estes, consideramos diferencialmente expressos apenas aqueles que no teste estatístico obtiveram *p*-value e *q*-value menores que 0,05. Assim, 60 genes foram encontrados como diferencialmente expressos entre cérebros de rainhas e operárias em 3º estágio larval (Figura 17). Destes, 29 foram mais expressos em larvas de futuras rainhas e 31 em larvas de futuras operárias (Figura 18).



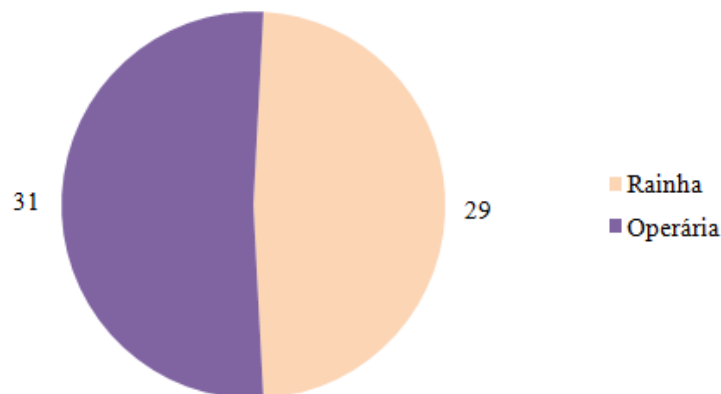
**Figura 16** - Gráfico representando o número de genes já preditos expressos no cérebro de larvas de rainhas e operárias de *A. mellifera* obtido por RNA-Seq. Do total de 15.216 genes, 11.446 foram expressos no cérebro.

Fonte: Da autora.



**Figura 17** - Gráfico representando os genes diferencialmente expressos entre os cérebros das castas de *A. mellifera* no 3º estágio larval. Significativo e Não Significativo: número de genes considerados diferencialmente expressos após análise estatística ( $p$ -value>0,05 e  $q$ -value>0,05), e que foram excluídos após a análise, respectivamente.

Fonte: Da autora.

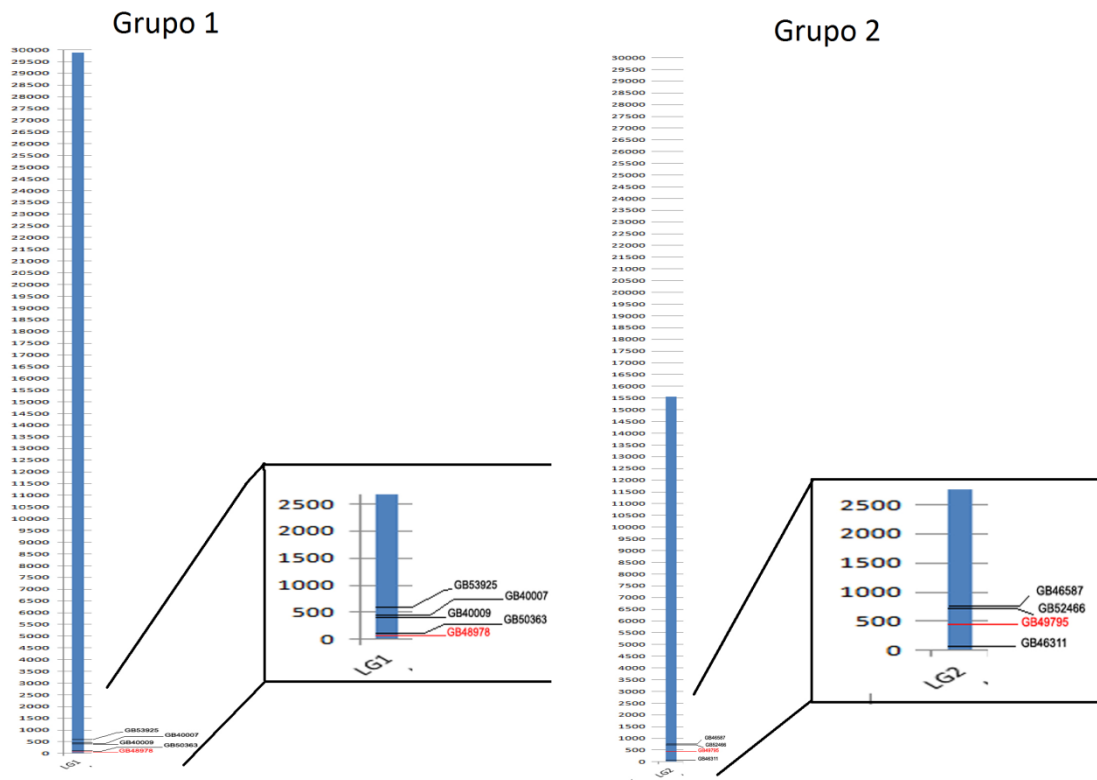


**Figura 18** - Gráfico representando a distribuição dos genes diferencialmente expressos entre os cérebros das castas de *A. mellifera* de 3º estágio larval.

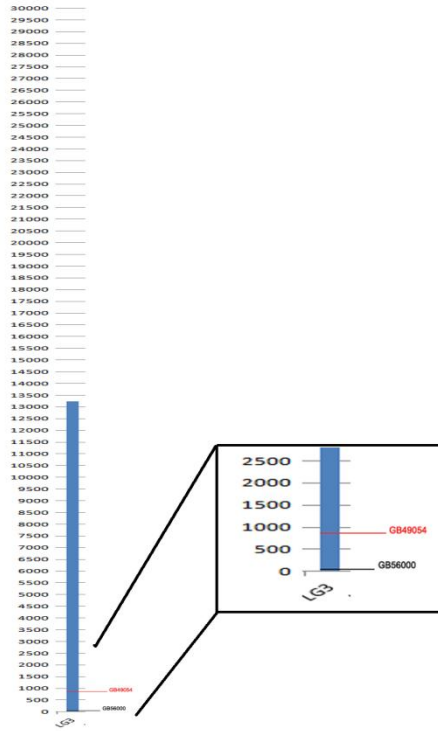
Fonte: Da autora.

Para caracterizar cada um dos 60 genes foi extraída a sequência fasta de cada um dos genes a partir do *Beebase* (MUNOZ-TORRES et al., 2010) utilizando o GB (código de referência para cada um dos genes já preditos de *Apis mellifera*). Sabe-se que a localização espacial do conjunto de genes de um organismo está associada às particularidades funcionais de cada um deles (SEMON; DURET, 2006). Comumente, genes codificadores para produtos proteicos que compartilham vias metabólicas são co-regulados, isto é, suas atividades são controladas por fatores de transcrição comuns. Isto é possibilitado, entre outros fatores, pelo compartilhamento espacial dentro do núcleo (territorialidade), e tem, ainda, implicações evolutivas (SEMON; DURET, 2006). Em razão disso, e com o objetivo de obter informações

iniciais sobre a existência de uma eventual co-regulação entre genes diferencialmente expressos entre castas, foi determinada a localização de cada um dos 60 genes nos 16 cromossomos de *A. mellifera* (*Beebase*) (Figura 19). Os resultados mostram que o cromossomo 15 merece especial atenção, visto que 12 genes estão localizados nele. Dentre esses 12, 3 genes de operárias (GB50116, GB50121, GB54419) encontram-se localizados em regiões bem próximas entre si, e 6 genes de rainhas (GB50560, GB50561, GB50562, GB50565, GB50566, GB50577). Estes resultados são bastante relevantes e sugerem a necessidade de realizar estudos que permitam identificar potenciais sítios de ligação de fatores de transcrição (sequências *cis*), que seriam os responsáveis pela eventual co-regulação desses genes.



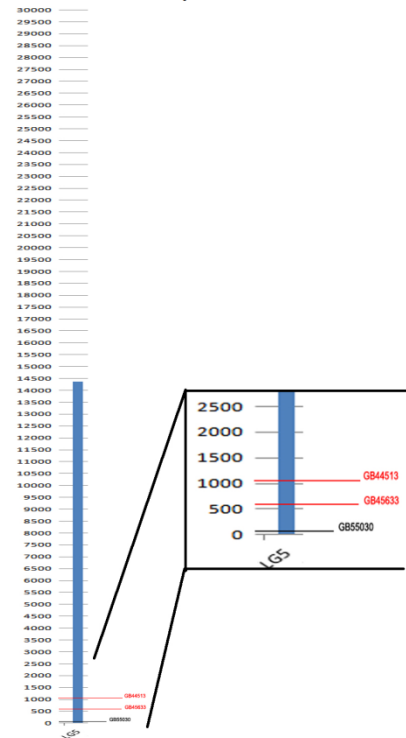
Grupo 3



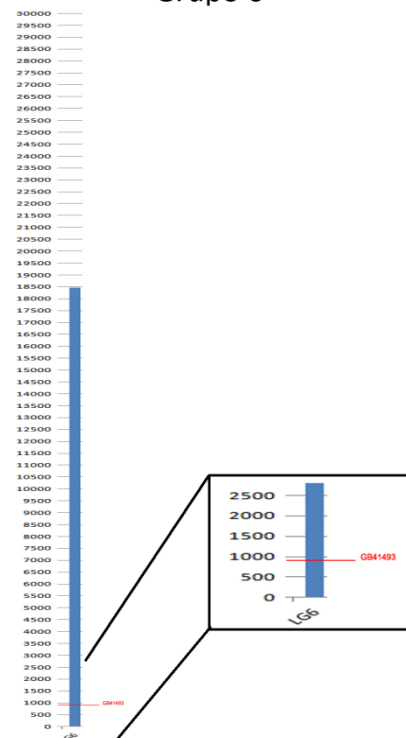
Grupo 4



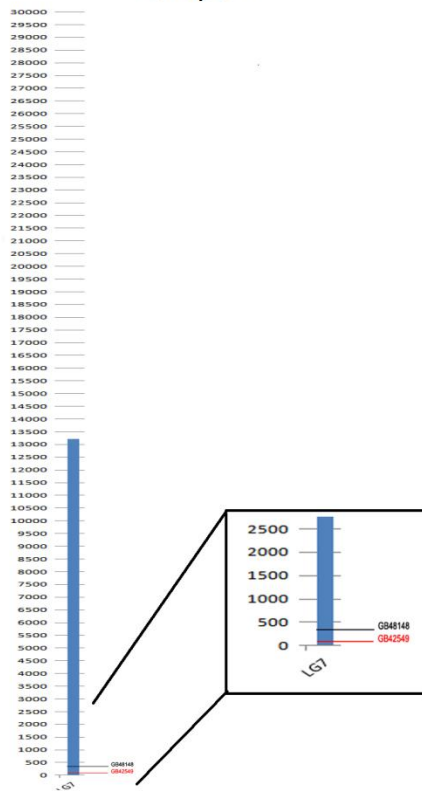
Grupo 5



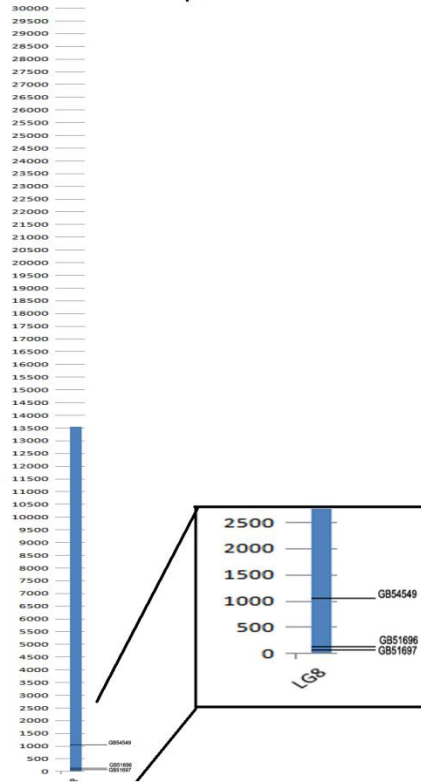
Grupo 6



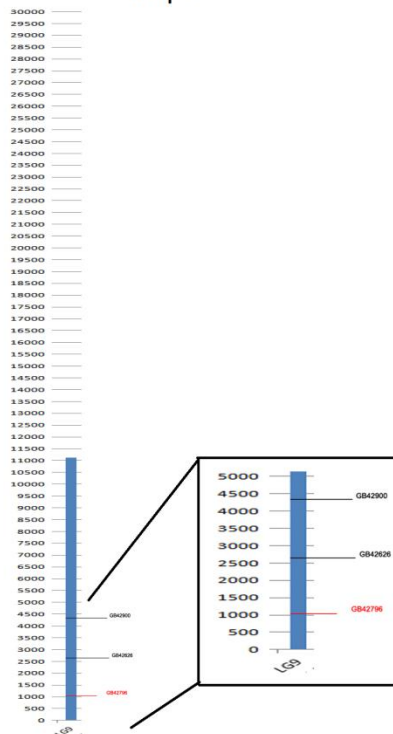
Grupo 7



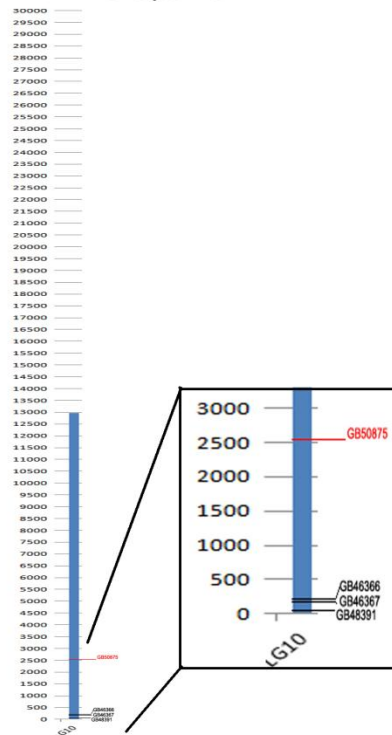
Grupo 8



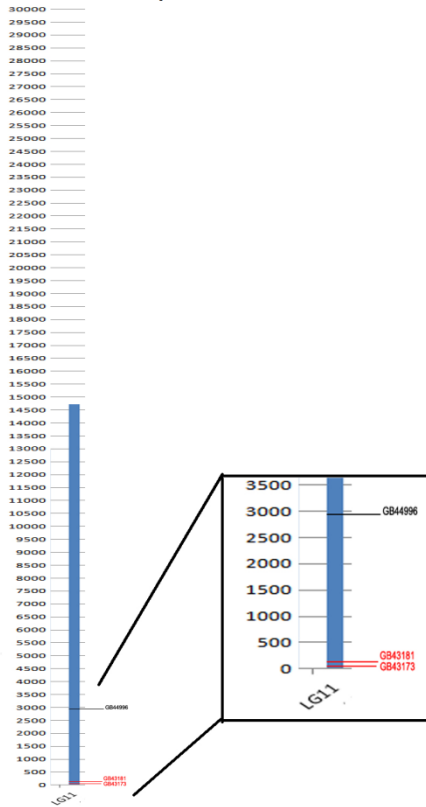
Grupo 9



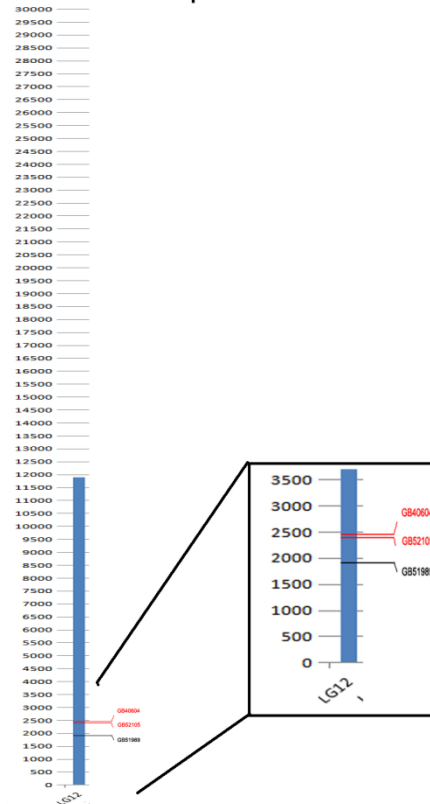
Grupo 10



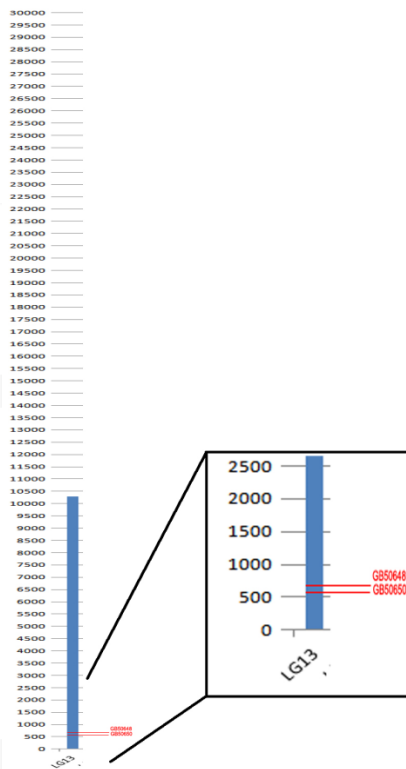
Grupo 11



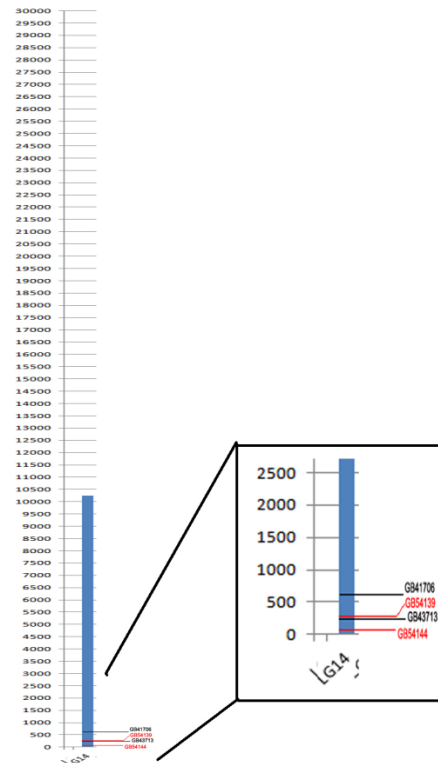
Grupo 12

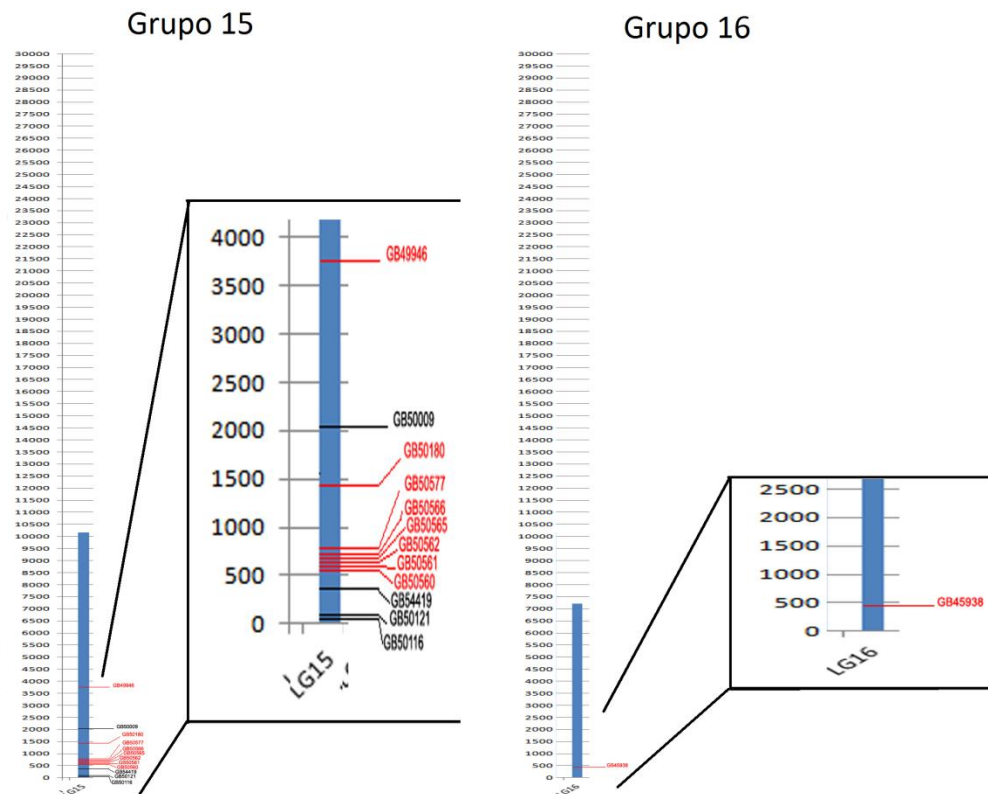


Grupo 13



Grupo 14





**Figura 19** - Localização cromossômica de cada um dos 60 genes encontrados como diferencialmente expressos em cérebros de rainhas e operárias de *A. mellifera*. GBs em vermelho: genes mais expressos em cérebro de rainhas L3. GBs em preto: genes mais expressos em cérebro de operárias L3.

Fonte: Da autora.

#### 4.1.1 Genes super-expressos em cérebro de larvas de rainhas e operárias L3

Dentre os 60 GDEs, 29 são mais representados no cérebro de rainhas e 31, em operárias. Para encontrar possíveis funções dos produtos protéicos destes genes, utilizando ferramentas de bioinformática procuramos a proteína ortóloga em *D. melanogaster* na respectiva base de dados (*Flybase*) (Tabela 3). Os outros 31 foram encontrados mais expressos em operárias. O mesmo procedimento foi usado para estes genes (Tabela 4). As figuras dos domínios conservados se encontram nos ANEXOS A e B.



**Tabela 3.** Características dos genes mais transcritos no cérebro de rainhas em relação ao de operárias.

Fonte: Da autora.

<b>Gene</b>	<b>Proteína</b>	<b>Ortólogo (<i>D. melanogaster</i>)</b>	<b>Proteína ortóloga</b>	<b>Domínio conservado (Pfam)</b>	<b>Fold-change</b>
<b>GB43173</b>	Cht-3	CG18140	Cht3-PA	Chitin binding Peritrophin-A domain /Glycosyl hydrolases family 18	8,179
<b>GB49946</b>	serine protease homolog 41 (SPH41)	CG15002	mas-PB	--	8,923
<b>GB50650</b>	serine protease 33 (SP33)	CG8213	--	Trypsin-like serine protease/ Late Protein L2 / Trypsin	9,301
<b>GB45633</b>	--	CG7201	--	DM4, DM12 family/ DUF1229	9,398
<b>GB52105</b>	--	--	--	--	9,644
<b>GB53286</b>	Forked	CG5424	f-PF (forked)	--	9,939
<b>GB42549</b>	4-nitrophenylphosphatase-like	CG2680	--	Haloacid Dehalogenase-like Hydrolases	11,026
<b>GB49795</b>	--	CG15239	--	--	11,645
<b>GB50566</b>	--	CG15591	Osi8-PA	DUF1676	12,049
<b>GB50648</b>	serine protease 25 (SP25)	CG34350	Np	Trypsin (pfam00089) e Herpes_UL32	12,413
<b>GB40604</b>	spatzle 2	CG42576	NT1-PH, -PG, -PF e -PD	--	12,850
<b>GB42796</b>	circadian clock-controlled protein-like	CG2016	CG2016-PD e -PB	Haemolymph juvenile hormone binding protein (JHBP)	13,007
<b>GB50875</b>	apolipoprotein D-like, transcript variant 2	--	--	Lipocalin / cytosolic fatty-acid binding protein family	13,334
<b>GB50560</b>	--	CG15589	Osi24-PA	--	14,190
<b>GB45938</b>	AADC	CG10697	Ddc-PC	--	14,190
<b>GB46975</b>	--	--	--	--	14,514
<b>GB50180</b>	--	CG8420	--	--	14,802

Gene	Proteína	Ortólogo ( <i>D. melanogaster</i> )	Proteína ortóloga	Domínio conservado (Pfam)	Fold-change
GB48978	--	--	--	BioY family / Sugar (and other) transporter	14,911
GB43181	--	CG4702	--	DUF4271	15,073
GB49054	--	CG17131	tyn-PD, -PC, -PB e -PA	--	15,713
GB50561	--	--	--	--	15,746
GB50565	Osiris 7	CG1153	Osi7-PA	DUF1676	17,778
GB44513	cytochrome P450 4AV1 (CYP4AV1)	CG9081	Cyp4s3	Cytochrome P450	18,421
GB43769	--	--	--	DUF1676	18,853
GB50562	--	CG1150	Osi3-PB e -PA	DUF1676	24,313
GB54144	--	CG42331	--	Animal heme peroxidases and related proteins	24,313
GB54139	mucin related 89F ortholog	CG4090	Mur89F-PC	--	27,166
GB41493	--	--	--	--	32,394
GB50577	Osiris 17	--	--	--	52,921

**Tabela 4** - Características de genes mais transcritos no cérebro de operárias em relação ao de rainhas

Fonte: Da autora.

Gene	Proteína	Ortólogo ( <i>D. melanogaster</i> )	Proteína ortóloga	Domínio conservado (Pfam)	Fold-change
GB50121	chymotrypsin inhibitor (Amci)	--	--	Trypsin Inhibitor cysteine rich domain	6,922
GB52466	--	--	--	Vitellogenin_N	7,445
GB48823	cuticular protein 2 (CPR2)	--	--	Chitin bind 4	7,788

Gene	Proteína	Ortólogo ( <i>D. melanogaster</i> )	Proteína ortóloga	Domínio conservado (Pfam)	Fold-change
<b>GB55030</b>	--	--	--	--	8,515
<b>GB42626</b>	--	--	--	--	8,545
<b>GB53925</b>	--	--	--	--	9,209
<b>GB50009</b>	--	CG8369	--	--	9,383
<b>GB54549</b>	alpha-glucosidase (Hbg2)	CG14934	Mal-B1-PA	Alpha amylase catalytic domain family	9,591
<b>GB51989</b>	--	--	--	Pacifastin inhibitor (LCMII)	9,747
<b>GB46587</b>	--	CG33998	--	--	12,372
<b>GB44996</b>	hexamerin 110 (Hex110)	--	--	Hemocyanin, all-alpha domain/ Hemocyanin, copper containing domain/ Hemocyanin, ig-like domain	12,385
<b>GB41706</b>	--	--	--	--	12,485
<b>GB50363</b>	--	--	--	Topoisomerase II-associated protein PAT1	15,063
<b>GB42900</b>	--	--	--	--	15,584
<b>GB43713</b>	cytochrome P450 9Q1 (CYP9Q1)	CG11466	Cyp9f2-PA	Cytochrome P450	16,490
<b>GB40009</b>	--	--	--	--	16,492
<b>GB48391</b>	--	--	--	Tymovirus 45/70Kd protein	19,690
<b>GB41110</b>	--	--	--	--	20,009

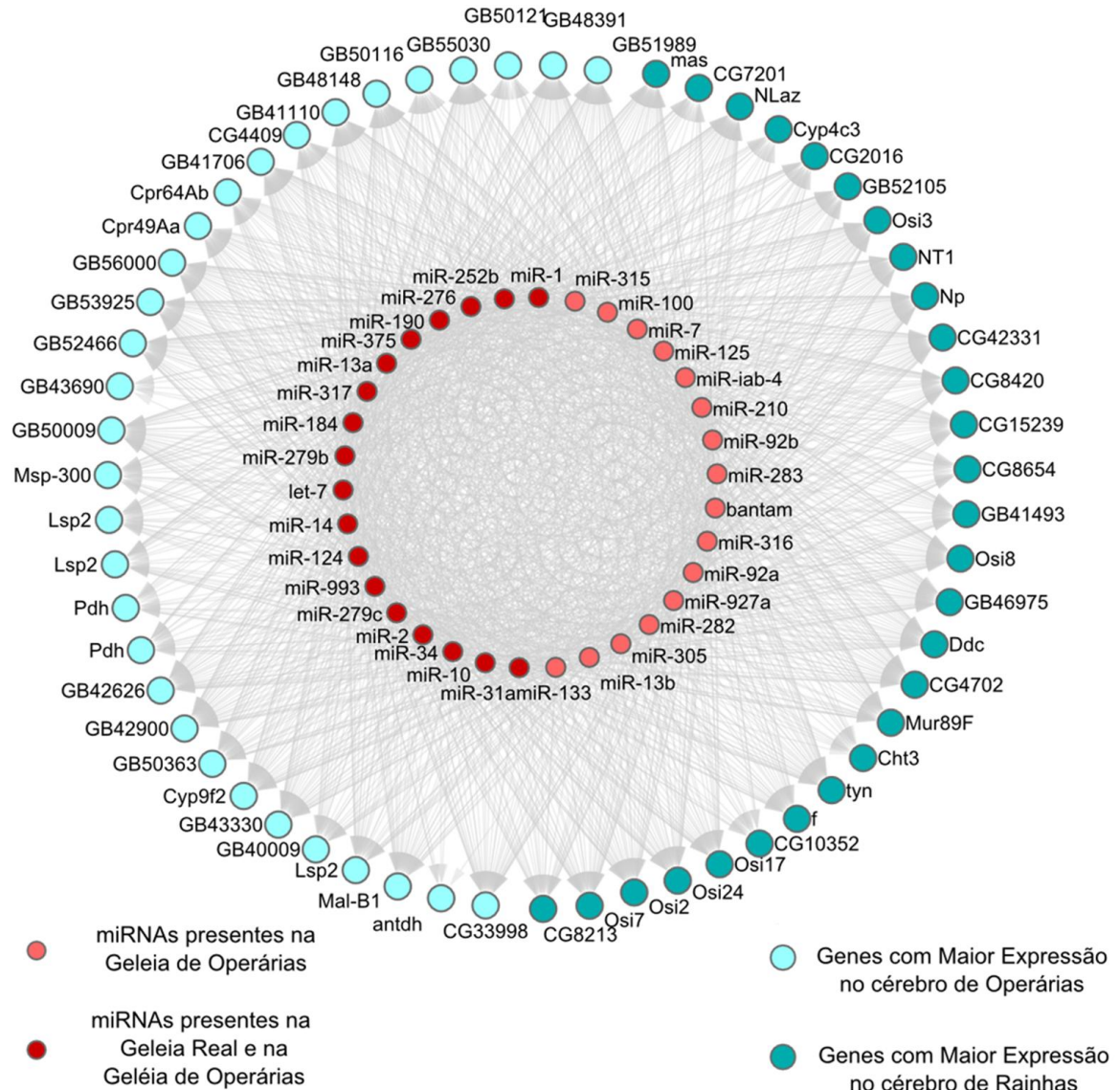
Gene	Proteína	Ortólogo ( <i>D. melanogaster</i> )	Proteína ortóloga	Domínio conservado (Pfam)	Fold-change
<b>GB56000</b>	--	-	--	--	20,452
<b>GB43690</b>	--	--	--	Insect allergen related repeat, nitrile-specifier detoxification	22,233
<b>GB46367</b>	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD <sup>+</sup> ]-like	--	--	Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins/ DUF4271	25,178
<b>GB51696</b>	Hexamerin 70c precursor	--	--	Hemocyanin, all-alpha domain/ Hemocyanin, copper containing domain/ Hemocyanin, ig-like domain	25,244
<b>GB46311</b>	cuticular protein 21 (CPR21)	CG30045	Cpr49Aa-PB	Chitin bind 4/ Laminin G domain	25,701
<b>GB50116</b>	chymotrypsin inhibitor-like	CG33259	--	Trypsin Inhibitor like cysteine rich domain	26,525
<b>GB48148</b>	--	--	--	--	36,147
<b>GB54419</b>	short-chain dehydrogenase/reductase	--	--	Short chain dehydrogenase	38,867
<b>GB51697</b>	Hexamerin 70b precursor	CG4178	Lsp1 $\beta$	Hemocyanin, all-alpha domain/ Hemocyanin, copper containing domain/ Hemocyanin, ig-like domain	41,532
<b>GB43330</b>	--	--	--	--	45,349
<b>GB40007</b>	nesprin-1-like	CG42768	Msp-300-PD	--	54,706
<b>GB46366</b>	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD <sup>+</sup> ]-like	--	--	--	76,270
<b>GB43689</b>	--	--	--	Insect allergen related repeat	121,228

#### 4.1.2 GDEs em cérebros L3 como alvos de regulação por miRNAs de geléia real

Guo et al. (2013) mostraram que determinados miRNAs fornecidos pela alimentação às larvas de rainhas são capazes de alterar a casta de destino das larvas, e que alguns dos mais abundantes miRNAs presentes na geléia de operárias parecem regular coletivamente uma série de mRNAs com funções no sistema nervoso (GUO et al., 2013). Como a fase larval estudada por nós (L3) é o momento em que ocorre uma grande diferenciação nutricional entre as castas, os miRNAs presentes nas geléias real e de operária podem participar da regulação pós-transcricional da expressão dos GDEs nos respectivos cérebros, e, assim, determinar seus destinos de desenvolvimento. Para testar esta hipótese, identificamos nas 3'UTRs desses genes as sequências *cis* que eventualmente ligariam miRNAs descritos por Guo et al. (2013). Consideramos genes alvos aqueles cujas previsões apresentaram ligações com energia livre  $\leq -20$  kcal /mol, e valor de  $p < 0,05$ , e cujo nível de enriquecimento para miRNA era significativo ( $p < 0,05$ ) em comparação com os sítios alvos de todo o genoma.

Foram utilizados dados de sequências de miRNAs disponíveis no banco de dados miRBase versão 20. Foram encontrados 48 miRNAs presentes nas geléias (GUO et al., 2013), dos quais todos estão presentes na geléia de operária e apenas 25 na geléia real. Identificaram-se 34 miRNAs (Tabela 5) que possuem sítios alvo enriquecidos nos GDEs ( $p$ -value  $< 0,05$ ), o que mostra que há maior probabilidade de ligação destes genes selecionados (GDEs) pelos miRNAs enriquecidos do que do restante de genes do genoma.

Todos os 60 DEGs mostraram ser possíveis alvos de pelo menos seis dos 34 miRNAs selecionados (Figura 20). Os genes que tiveram maior número de miRNAs compatíveis, de 34 a 32 miRNAs, foram GB51989 (domínio conservado Pacifastin inhibitor), GB49054 (trynity), GB50562 (Osíris 3), GB50565 (Osíris 7), GB50566 (Osíris 8), GB50648 (sp25) e GB50875 (alipoproteína D). E os miRNAs com maior número de genes alvo foram ame-miR-210, ame-miR-190 e ame-miR-34.



**Figura 20** – Rede de interação entre miRNA das geleias real e de operária e os GDEs. A rede mostra (linhas cinza) os GDEs que possuem sítio alvo nas suas regiões 3'UTR para os 34 miRNA enriquecidos das geleias real e de operária.

Fonte: Da autora.

**Tabela 5** – miRNAs enriquecidos. A tabela mostra o número total de genes do genoma (N\_genes) e aqueles que são alvos (N\_targets) do miRNA correspondente àquela linha. Mostra também o número de DEGs (N\_PPI) e o número daqueles que são alvos (targets\_PPI) do miRNA correspondente àquela linha. O p\_value corresponde ao grau de confiabilidade daquele gene ter mais chance de ter um DEG como alvo do que um gene qualquer do genoma.

Fonte: Da autora.

miRNA	N_targets	N_genes	targets_PPI	N_PPI	P_value
ame-miR-283	3140	14671	20	60	2.16E-02
ame-miR-927 <sup>a</sup>	4221	14671	24	60	4.03E-02
ame-miR-10	5669	14671	31	60	2.72E-02
ame-miR-13a	5672	14671	36	60	6.47E-04
ame-miR-125	5942	14671	36	60	1.75E-03
ame-miR-14	6514	14671	37	60	5.23E-03
ame-miR-100	6815	14671	39	60	2.87E-03
ame-miR-iab-4	7401	14671	39	60	1.61E-02
ame-miR-13b	6958	14671	41	60	8.46E-04
ame-miR-279b	7623	14671	41	60	7.35E-03
ame-miR-279c	7953	14671	41	60	1.82E-02
ame-miR-315	7032	14671	42	60	4.37E-04
ame-miR-133	7049	14671	43	60	1.72E-04
ame-miR-92b	8085	14671	43	60	6.29E-03
ame-miR-92a	8129	14671	43	60	7.15E-03
ame-miR-276	7882	14671	44	60	1.43E-03
ame-miR-316	9682	14671	47	60	2.66E-02
ame-miR-305	9818	14671	48	60	1.86E-02
ame-miR-1	9543	14671	49	60	3.68E-03
ame-miR-7	10356	14671	49	60	3.62E-02
ame-miR-2	9061	14671	50	60	2.42E-04
ame-miR-993	9638	14671	50	60	1.95E-03
ame-miR-375	9768	14671	50	60	2.99E-03
ame-miR-252b	11063	14671	52	60	2.48E-02
ame-miR-124	11109	14671	52	60	2.81E-02
ame-bantam	10121	14671	53	60	4.08E-04
ame-let-7	11006	14671	53	60	8.75E-03
ame-miR-184	10104	14671	54	60	1.03E-04
ame-miR-282	11131	14671	54	60	4.77E-03
ame-miR-31a	11758	14671	54	60	3.25E-02
ame-miR-317	11761	14671	54	60	3.27E-02
ame-miR-210	12098	14671	57	60	3.94E-03
ame-miR-190	12583	14671	57	60	2.14E-02
ame-miR-34	12298	14671	58	60	1.95E-03

## 5 DISCUSSÃO

Nosso grupo demonstrou recentemente que as primeiras diferenças morfológicas e moleculares entre os cérebros de rainhas e operárias foram encontradas no quarto estágio larval (MODA et al., 2013). Para testar a hipótese de que as diferenças morfológicas entre os cérebros de castas se originam a partir de diferenciações moleculares que acontecem em estágios anteriores, obtivemos e analisamos os transcriptomas do cérebro de L3 de rainhas e operárias. Os resultados de sequenciamento de poli-A+ mostraram 60 genes diferencialmente transcritos, o que indica que o difenismo cerebral entre castas em *A. mellifera* já existe em L3. Dos 60 GDEs, 29 são mais transcritos em cérebros de rainhas e 31 em cérebros de operárias. Neste trabalho mostramos, ainda, que a expressão destes genes pode sofrer regulação diferencial postranscricionalmente por miRNAs presentes nas diferentes geleias (real e de operárias).

### 5.1 SOBRE OS GENES MAIS EXPRESSOS NO CÉREBRO DE RAINHAS L3

De acordo com as análises *in silico*, 14 dos 29 genes mais expressos no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L3 apresentam proteína já conhecida ou domínio conservado.

*Genes envolvidos na atividade e desenvolvimento neuronal: forked, AADC, Spatzle-2 and apolipoprotein D.* A sequência de aminoácidos predita referente ao GB53286, super-expressa no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L3 (Fold-change: 9,939), apresenta identidade com a proteína *forked* de *A. mellifera*.

O citoesqueleto é constituído por actina, filamentos intermediários e microtúbulos, e têm papéis fundamentais em praticamente todas as funções de células, incluindo a divisão celular, motilidade, adesão, sinalização, tráfico por endocitose e transporte, bem como na regulação das formas celulares e de organelas e suas distribuições (AKHMANOVA; STEARNS, 2013). Naturalmente, isto também se aplica ao sistema nervoso, onde o citoesqueleto tem um papel essencial durante o desenvolvimento, a função, a regeneração e a degeneração dos neurônios.



Muitas proteínas de ligação a actina são importantes para a formação de estruturas de actina, incluindo scrin no processo acrossomal de espermatozóide de *Limulus*, singed em canais circulares de *Drosophila*, e fimbrina e vilina em microvilosidades, e fimbrina e espin em estereocílios (FATH; BURGESS, 1995; SANDERS et al., 1996). As proteínas forked em *Drosophila* são proteínas de ligação à actina. Forked é essencial para a formação das fibras de actina hexagonal que embalam feixes de cerdas presentes no desenvolvimento de *Drosophila* (PETERSEN et al., 1994). A proteína forked concentra nas pontas das cerdas, mesmo antes da actina podem ser detectadas por coloração com faloidina (PETERSEN; QIN, 1996). Estas observações sugerem que a proteína forked está envolvida na iniciação da formação de feixe de actina.

Experimentos realizados por Grieshaber e Petersen (1999) mostraram que a proteína forked A, quando expressa em células de mamífero, induz a formação de grandes feixes de actina, aumenta a quantidade total de actina-F na célula, e co-localiza com estes feixes de fibras de actina grandes. Sugerindo que forked não só é essencial para a construção de feixe, mas também está envolvida na iniciação da formação dos feixes de fibras de actina.

Claramente, o citoesqueleto tem um papel essencial durante o crescimento axonal. Como *forked* foi mais expresso no cérebro de larvas de rainhas L3, este gene poderia atuar na formação inicial dos feixes de actina que permitem o prolongamento dos axônios até seu alvo, atuando no maior desenvolvimento do sistema nervoso em larvas de rainhas L3.

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB40604, super-expressa no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L3 (Fold-change: 12,850), apresenta identidade com a proteína spz2 de *A. mellifera*. Essa proteína é ortóloga da Neurotrophin-1 de *D. melanogaster*.

No desenvolvimento do cérebro em vertebrados, neurônios são produzidos em excesso, e estes neurônios em excesso são eliminados através de apoptose, ajustando inervação, direcionamento e conectividade para atingir o tamanho ideal (LEVI-MONTALCINI, 1987). As neurotrofinas (NTs) são a maior classe de moléculas que promovem sobrevivência neuronal em vertebrados. Elas também controlam proliferação celular e diferenciação neuronal, e são requeridas para elaborações axonais e dendríticas, plasticidade sináptica, excitabilidade e potenciação a longo prazo (LTP, a base da memória e aprendizado) (DAVIES, 2003; BLUM; KONNERTH, 2005; LU; PANG; WOO, 2005; ZWEIFEL, 2005). NTs fundamentam a maioria dos aspectos do desenvolvimento e função do sistema nervoso dos vertebrados, e a função anormal de NTs está ligada a distúrbios psiquiátricos (CHEN et al., 2006; ARANCIO; CHAO, 2007; MARTINOWICH; MANJI; LU,

2007). NTs são as moléculas chaves ligando estrutura e função do sistema nervoso em vertebrados (BLUM; KONNERTH, 2005; LU; PANG; WOO, 2005).

A ingestão em quantidades específicas de alguns alimentos, como ácidos graxos  $\omega$ -3, alteram os níveis de fatores neurotróficos, como as neurotrofinas e o BDNF, moléculas associadas a promoção da neurogênese e sobrevivência neuronal (LEE; SEROOGY; MATTSON, 2002; WU; YING; GOMEZ-PINILLA, 2004).

Estudos realizados por Zhu et al. (2008) mostraram que a Neurotrofina 1 de *D. melanogaster* (DNT1) é um membro da superfamília NT que promove a sobrevivência neuronal e direcionamento axonal. A perda da função de DNT1 resulta no aumento da apoptose neuronal, e interferindo com a função DNT1, afeta a orientação de axônios motores embrionários. No sistema nervoso central (SNC), a sobrevivência neuronal depende de DNT1 produzido em quantidades limitadas na linha média. *DNT1* é expresso no cérebro, nos centros de aprendizagem e de memória, o que sugere possíveis funções neuronais mais elevadas.

O gene *Spz2* é mais expresso em cérebros de rainhas L3 quando comparados ao cérebros de operárias L3. Os resultados apresentados aqui sugerem que o controle de sobrevivência e orientação da célula pela superfamília NT é um mecanismo antigo de desenvolvimento do sistema nervoso. Outras funções das DNTs também poderiam incluir a atividade sináptica e neuronal, aprendizado e memória. Assim, a maior expressão de *Spz2* no cérebro de rainhas explica o maior e mais rápido desenvolvimento deste órgão em resposta à alimentação diferencial em larvas desta casta.

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB50875, super-expressa no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L3 (Fold-change: 13,334), apresenta identidade com a proteína apolipoprotein D-like, transcript variant 2 de *A. mellifera*. Essa proteína apresenta o domínio conservado *Lipocalin, cytosolic fatty-acid binding protein family*.

A apolipoproteína D (apoD) é uma glicoproteína de 29 kDa expressa em níveis elevados no SNC (PROVOST et al., 1991; RASSART et al., 2000). O principal papel de apoD ainda é incerto, mas por analogia com outras lipocalinas pode servir como um transportador de pequenas moléculas hidrofóbicas entre a circulação e o tecido (FLOWER; NORTH; SANSOM, 2000). Muitos estudos têm demonstrado que lipídios se ligam a apoD, inclusive colesterol, ácido araquidônico e uma variedade de esteróides, tais como pregnenolona, dihidrotestosterona, testosterona, desidroepiandrosterona e estradiol (MORAIS CABRAL et al., 1995; RASSART et al., 2000). No entanto, não há provas conclusivas de que apoD desempenha um papel crucial no transporte desses lipídios no cérebro. É claro que *apoD* é hiperexpresso durante a regeneração do nervo periférico (BOYLES; NOTTERPEK;

ANDERSON, 1990) e em resposta à lesão induzida por ácido caínico no hipocampo de ratos (ONG et al., 1997) e que também pode estar relacionado com redistribuição de lipídios durante reparo ou em resposta a outros fatores, como inflamação e estresse oxidativo (DO CARMO; LEVROS; RASSART, 2007).

Durante o desenvolvimento do cérebro, há uma demanda substancial por deposição de lipídios não só durante a mielinização, mas também em relação à manutenção da plasticidade sináptica (QUAN et al., 2003; DIETSCHY; TURLEY, 2004; HERZ; CHEN, 2006). Um trabalho feito por Ong et al. (1999) revelou um padrão temporal da expressão de *apoD* no cérebro de ratos em desenvolvimento, com um elevado nível de expressão coincidente com o período de mielinização ativa no cérebro dos roedores. Além disso, o cerebelo de rato mostra a expressão de precursor de *apoD* em células oligodendrogliais no período neonatal precoce e por oligodendrócitos maduros em animais adultos, bem como a expressão em neurônios de Purkinje a partir da segunda semana pós-natal. Estas observações sugerem que apoD pode desempenhar um papel funcional na mielinização, bem como na sinaptogênese, no cerebelo.

Estudos realizados por Navarro et al., 2013 mostrou que apoD pode regular neuritogênese e sinaptogênese. Co-culturas de adipócitos com neurônios periféricos mostraram reforçada neurite e formação de sinapses. Também já foi relatado que apolipoproteínas D e E3 exercem efeitos neurotróficos e sinaptogênicos no gânglio de raiz dorsal em culturas de células (KOSACKA et al., 2009). Além disso, este gene em humanos parece estar envolvido em distúrbios neurológicos e danos na medula espinhal (MUFFAT; WALKER; BENZER, 2008).

Sabendo que o gene *apoD* é mais expressos em cérebros de larvas de rainhas L3 em comparação com cérebro de operárias da mesma idade, e que este gene está envolvido com o processo de sinaptogênese, *apoD* é um candidato a promoção do maior desenvolvimento do cérebro de rainhas no período larval.

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB45938, super-expressa no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L3 (Fold-change: 14,190), apresenta identidade com a proteína AADC de *A. mellifera*. Dopa Decarboxilase-PC é sua proteína ortóloga em *D. melanogaster*.

Aminas biogênicas medeiam padrões de comportamento em animais vertebrados e invertebrados (LIBERSAT; PFLUEGER DE, 2004; HUBER, 2005; NICHOLS, 2006). Monoaminas clássicas, tais como dopamina e serotonina, estão envolvidos numa variedade de processos fisiológicos, agindo como importantes neurotransmissores, neuromoduladores e neurohormônios nos sistemas nervosos periférico (SNP) e central (SNC) (ROEDER, 2005;

SUMMERS; WINBERG, 2006; OVERLI et al., 2007; CHEN; HUNG; YANG, 2008; LANGE, 2009). Estimulação adequada de dopamina, serotonina e receptores adrenérgicos em fases específicas do desenvolvimento do cérebro, é importante para o desenvolvimento motor e cognitivo normal (VERNEY; LEBRAND; GASPAR, 2002; GASPAR; CASES; MAROTEAUX, 2003).

O gene *Ddc* em *D. melanogaster* codifica a dopa descarboxilase (DDC), uma enzima que catalisa a descarboxilação de dopa em dopamina e de 5-hidroxitriptofano em serotonina (DEWHURST et al., 1972; WRIGHT; BEWLEY; SHERALD, 1976; LIVINGSTON; TEMPEL, 1983).

Shih et al. (2013) demonstraram que a inibição de *Ddc* em embriões de zebrafish (*Danio rerio*) provoca diminuição no número total de neurônios e no tamanho do cérebro quando analisaram a substância branca. Houve também um aumento no número de apoptose cerebral. Outros estudos realizados com zebrafish, e também com ratos mostraram que a dopamina e a serotonina também desempenham um papel importante no crescimento do cérebro durante a fase inicial de desenvolvimento (CRANDALL et al., 2007; ARAKI; SIMS; BHIDE, 2007; RUSSEK-BLUM et al., 2008; FLINN et al., 2009; AIRHART et al., 2012).

Um gene homólogo ao *Ddc* em humanos, o *AADC*, está funcionalmente associado a várias perturbações neurológicas, incluindo a doença de Parkinson (NEFF; HADJICONSTANTINO, 1995; KING et al., 2011). Pacientes com outras doenças neurológicas como transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, que revelam a função dopaminérgica insuficiente, mostraram cérebro com tamanho menor (SWANSON et al., 2007). Na deficiência de *AADC*, 24% e 6% das crianças têm cérebro anormal mostrado por ressonância magnética (MRI) e tomografia computadorizada (TC), respectivamente (MANEGOLD et al., 2009; BRUN et al., 2010).

Com base nos achados científicos supracitados, e considerando o processo de neurogênese de *A. mellifera*, *Ddc* supostamente atuaria na catalisação da conversão de substratos em dopamina e serotonina que têm papel no desenvolvimento do cérebro. O fato da sequência que codifica *Ddc* ser mais transcrita em rainhas do que em operárias, ambas no terceiro estágio larval, sugere o favorecimento do maior crescimento cerebral nas primeiras, uma vez que já foi constatado que o cérebro da casta reprodutora é mais desenvolvido na fase larval (MODA et al., 2013).

*Genes relacionados à atividade de serino protease: SP25 e SP33 e SPH41.* A sequência de aminoácidos predita referente ao GB49946, super-expressa no cérebro de

rainhas em relação ao de operárias em L3 (Fold-change: 8,923), apresenta identidade com a proteína SPH41 de *A. mellifera*. Sua proteína ortóloga em *D. melanogaster* é a mas-PB.

As serina-proteases são um grupo diverso de enzimas que são caracterizadas pela presença de três aminoácidos críticos - histidina, aspartato e serina - no sítio catalítico (DI CERA, 2009). Muitas serina proteases são expressas no cérebro e desempenham um papel no desenvolvimento, manutenção e patologia do sistema nervoso (GINGRICH; TRAYNELIS, 2000; LUO; WANG; REISER, 2007; WANG; LUO; REISER, 2008). As ações de serina proteases são reguladas por outra classe de proteínas, os inibidores de protease de serina ou Serpins (MIRANDA; LOMAS, 2006). Os efeitos da interação entre as serina-proteases e seus inibidores parecem desempenhar papel na fisiologia e fisiopatologia do cérebro (TOMIMATSU et al., 2002; MIRANDA; LOMAS, 2006; WANG; LUO; REISER, 2008). O papel de serinas proteases em mediar repulsão por contato levando a uma inibição do crescimento foi demonstrado em cones de crescimento do SNC (BAIRD; RAPER, 1995). Orientação do cone de crescimento envolve uma variedade de mecanismos moleculares diferentes, incluindo a adesão celular e quimiotropismo (BAIER; BONHOEFFER, 1994; GARRITY; ZIPURSKY, 1995). Proteases servem como pistas repulsivas ou inibitórias que desestabilizam as interações cone de crescimento/matriz, conduzindo assim a uma diminuição na taxa de crescimento de neurites em cultura (SCHWAB et al., 1993). Isto implica que a dinâmica de crescimento axonal é regulada por um equilíbrio de proteases associados e gradientes difusíveis de inibidores na proximidade do cone de crescimento (PITTMAN; BUETTNER, 1989).

O gene *masquerade* (*mas*) em *D. melanogaster* codifica uma proteína secretada de 1047 aa, que é processada e gera dois polipeptídeos diferentes. O polipeptídeo carboxi-terminal apresenta uma grande semelhança com as serinas proteases, mas não é provável que possua atividade catalítica uma vez que a serina associada com a tríade catalítica de resíduos, foi substituída por uma glicina (MURUGASU-OEI et al., 1995). Um estudo realizado por Murugasu-Oei et al. em 1996 mostrou em *D. melanogaster* alelos nulos de *mas* mostram estagnação dos cones de crescimento dos neurônios, mostrando que *mas* é susceptível de desempenhar um papel na estimulação da orientação axonal.

Como o gene *SPH41*, ortólogo do gene *mas* de *D. melanogaster*, é mais expresso em cérebros de larvas de rainhas L3 quando comparado com as amostras de operárias, esse gene poderia contribuir para o maior desenvolvimento do cérebro de rainhas.

As sequência des aminoácidos preditas referentes aos GB50650 e GB50648, super-expressas no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L3 (Fold-change: 9,301 e

12,413, respectivamente), apresenta identidade com as proteínas SP33 e SP25 de *A. mellifera*. Essas proteínas apresentam o domínio conservado *Trypsin*.

As serina proteases, incluindo a trombina, a tripsina, as proteases tripsina-like, e muitas outras, são ubiquamente distribuídas por todo o corpo humano e desempenham um papel fundamental em muitos processos fisiológicos e patológicos importantes, tais como a digestão dos alimentos, homeostase, reprodução, resposta imune, assim como sinais de transdução. No SNC, a importância de várias serina-proteases extracelulares bem conhecidas, tais como trombina e plasmina, tem recebido grande atenção. Estas proteases são expressas no cérebro, e têm um papel funcional na regulação das consequências de acidente vascular cerebral isquêmico, plasticidade sináptica, neurodegeneração e neuroregeneração (XI; REISER; KEEP, 2003; SHEEHAN; TSIRKA, 2005).

Tripsina, outra serina-protease importante, foi inicialmente isolada a partir do suco pancreático de animais, mas foi mais tarde identificada em muitos tecidos diferentes (COTTRELL et al., 2004). Tripsina desempenha um papel central na digestão de alimentos, assim como na transdução de sinal celular mediada através da ativação proteolítica dos receptores ativados por protease (PARs). No cérebro, tripsina e tripsina-like extrapancreáticas, como neuropsina, neurotripsina, neurosina, mesotripsina/ tripsina IV, P22, foram detectadas e estão envolvidas no desenvolvimento neuronal, plasticidade, neurodegeneração e neuroregeneração no cérebro (GSCHWEND et al., 1997; SAWADA et al., 2000).

Neuropsina é capaz de hidrolisar os componentes da matriz extracelular por seu sítio ativo de serina (SHIMIZU et al., 1998). Em seus estudos, Nakamura et al. (2006) mostraram que neuropsina e L1 regulam mudanças estruturais da sinapse do hipocampo, que são importantes para a plasticidade neural, incluindo aprendizagem e memória. Durante o desenvolvimento, a expressão do mRNA de neurotripsina é detectável no embrião de 9 dias, e um nível moderado de expressão é mantida no SNC no embrião de 13 - 20 dias (IJIMA et al., 1999). O gene *neurotripsina* mutante contribui para o retardo mental em crianças (MOLINARI et al., 2002). Neurosina parece estar envolvida na patogênese de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, mal de Parkinson e esclerose múltipla em humanos (BLABER et al., 2004; TERAYAMA et al., 2005). A expressão anormal de *neurosina* no cérebro também tem sido observada em modelos animais de outras doenças neurodegenerativas (TERAYAMA et al., 2004; UCHIDA et al., 2004; OKA et al., 2005). Embora mesotripsina/ tripsina IV também estão implicadas em neurodegeneração, o seu significado funcional ainda permanece em grande parte desconhecido. Particularmente,

mesotripsina/ tripsina IV e P22 exercem suas funções fisiológicas e patológicas através da ativação de certos PARs (SAWADA et al., 2000; WANG et al., 2006).

Como demonstrado tripsina e tripsina-like extrapancreáticas presentes no cérebro participam do desenvolvimento neuronal, plasticidade, neurodegeneração e neuroregeneração do cérebro. SP33 e SP25 são serinas proteases com domínio de tripsina-like mais expressas no cérebro de larvas L3 de rainhas quando comparadas com cérebros da mesma fase larval de operárias. Essas proteínas poderiam contribuir para um maior desenvolvimento do cérebro em rainha durante os primeiros estágios de desenvolvimento.

*Genes com funções não relacionadas de forma clara à neurogêneses: Cht-3, circadian clock-controlled protein-like, GB48978, Cyp4av1.* A sequência de aminoácidos predita referente ao GB43173, super-expressa no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L3 (Fold-change: 8,179), apresenta identidade com a proteína Cht-3 de *A. mellifera*, que possui os domínios conservados Superfamília *Chitin binding Peritrophin-A domain* e *Glycosyl hydrolases family 18A*.

A quitina é um polissacarídeo composto de  $\beta$ -4,1-ligada N-acetil-D-glucosamina. Tem um papel fundamental na manutenção da morfologia e proteção dos organismos contra ataques externos agindo como um elemento de suporte em estruturas extracelulares, tais como o exoesqueleto de artrópodes (KRAMER; KOGA, 1986), a casca de ovo de nematóides (BRYDON et al., 1987) e a parede celular de cistos de parasitas amebóides (ARROYO-BEGOVICH et al., 1980). Em insetos, a quitina é um componente vital das cutículas da epiderme e traqueia, bem como a matriz peritrófica (PM) e no lúmen do intestino médio (LEHANE, 1997; KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 2005). Em todas estas estruturas, a quitina é associada a uma variedade de proteínas que influenciam as propriedades físicas, químicas e biológicas da estrutura extracelular. Embora a natureza química exata da associação da matriz de quitina com proteínas não seja bem compreendida, o progresso está sendo feito em catalogar as proteínas encontradas na cutícula e PM. Duas classes principais de motivos de ligação a quitina foram identificadas em proteínas de insetos. Um deles contém uma sequência composta por seis cisteínas o que provavelmente formam três pontes dissulfeto. Este motivo de sequência é referido como *Chitin binding Peritrophin-A domain* e é encontrado em numerosas proteínas extraídas de PMs de insetos.

Durante o processo de muda, a quitina velha da cutícula e PM é degradada e substituída por quitina sintetizada (NATION, 2008). A síntese de quitina é catalisada por sintetases de quitina, que estão catalogadas em duas classes: CHS1 e CHS2. Em contraste, a

degradação da quitina é hidrolisada por quitinases, que catalisam a hidrólise aleatória de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina  $\beta$ -1,4-glicosídicas em quitina e quitodextrina. Quitinases de insetos pertencem à família 18 das glicosil hidrolases, com base na conservação de sequências de aminoácidos e muitos motivos conservados, como o *Glycosyl hydrolases family 18A* (HENRISSAT; BAIROACH, 1993).

As quitinases de insetos são enzimas cruciais para a degradação da quitina na cutícula e presumivelmente na PM durante a muda (ZHU et al., 2008). Sabe-se que há grupos bastante grandes e diversos de genes *quitinase* identificados em várias espécies de insetos. Por exemplo, o organismo modelo genético, *D. melanogaster*, tem 22 genes *quitinase* e *quitinase-like*. *Anopheles gambiae* tem 17 genes que codificam quitinases e *Tribolium castaneum*, um membro da ordem Coleoptera, tem 16 genes da família quitinase (ZHU et al., 2008).

Vários genes da família quitinase podem ter várias funções durante o crescimento e desenvolvimento de insetos. Com base na tecnologia RNA de interferência (RNAi), para determinar a função de diferentes quitinases durante o desenvolvimento de *T. castaneum* (ZHU et al., 2008) e *Spodoptera exigua* (ZHANG et al., 2012), sugeriram que uma parte das quitinases são essenciais para a rotatividade de cutícula, regulando contração abdominal e expansão da asa. Além disso, as quitinases podem estar envolvidas em outros processos fisiológicos, tais como a defesa imune (YAN et al., 2002) e controle de doenças (LANGER et al., 2002).

Foi relatado que a expressão de *quitinase* específica do intestino pode ser regulada por inanição em muitos insetos. Especificamente, os insetos que se alimentam de sangue, tais como o *A. gambiae* (SHEN; JACOBS-LORENA, 1997) e *Lutzomyia longipalpis* (RAMALHO-ORTIGAO; TRAUB-CSEKO, 2003), a expressão de genes *quitinases* aumenta substancialmente em resposta à alimentação. Em *Ostrinia nubilalis*, o nível de transcrição de *OnCht* aumentou significativamente através da alimentação e foi reduzido através da fome (KHAJURIA et al., 2010). Estes resultados sugeriram que as quitinases estavam envolvidas na alteração do conteúdo de quitina do intestino durante a alimentação.

Quitotriosidase (chit) é um membro da família de quitinases de mamíferos e é secretada por macrófagos e neutrófilos ativados. A quitina é hidrolisada por chit, no entanto, como a quitina está ausente em humanos, o significado de atividade da chit humana é desconhecido. O nível de atividade de Chit plasmática está correlacionado positivamente com a doença de Alzheimer e a esclerose múltipla. Polímeros de glucosamina quitina-like são descritos no interior das placas  $\beta$ -amilóides de cérebros com Alzheimer (CASTELLANI et al., 2005). Assim, a atividade Chit encontrado no plasma de Alzheimer (SOTGIU et al., 2007)



tem sido postulada como sendo a consequência da ativação da micróglia e macrófagos na tentativa de limpar cérebro com Alzheimer a partir de depósitos de quitina-like potencialmente patogênicos. A glucosamina é formada a partir de glicose e tende a formar polímeros de quitina. O metabolismo da glicose marcadamente aumentada que ocorre durante a inflamação no cérebro de pacientes com esclerose múltipla pode induzir um aumento da formação de substâncias de quitina-like. Castellani; Perry; Smith (2007) sugerem que os polissacarídeos quitina-like no cérebro de pacientes com Alzheimer poderia fornecer um andaime para deposição de  $\beta$ -amiloide e que a glucosamina pode, por conseguinte, facilitar o processo de amiloidose.

A expressão de grandes quantidades de quitinase no cérebro de rainhas, em resposta a eventuais altos níveis de síntese deste composto em razão à ingestão de carboidratos (que é maior em rainhas; LEIMAR et al., 2012), pode representar uma estratégia de defesa fisiológica aos potenciais efeitos nocivos da acumulação de quitina. Neste sentido, este sistema biológico pode ser usado como modelo não mamífero para o estudo dos mecanismos de regulação da atividade da quitinase envolvida em processos patológicos clássicos do envelhecimento humano.

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB42796, super-expressa no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L3 (Fold-change: 12,850), apresenta identidade com a proteína circadian clock-controlled protein-like de *A. mellifera*. Essa proteína apresenta o domínio conservado JHBP.

Os ritmos circadianos são a manifestação externa de um sistema de temporização interna gerada por um relógio circadiano, que é sincronizado pelo ciclo dia-noite (REPPERT; WEAVER, 2002). O relógio circadiano proficientemente coordena os processos homeostáticos de organismos vivos para combinar ciclos impostos de 24 h e as influências de quase todos os aspectos da fisiologia e comportamento (HASTINGS; REDDY; MAYWOOD, 2003). O relógio do sistema de mamífero é hierárquico, com um relógio principal para controlar os ritmos circadianos localizados no núcleo supraquiasmático (SCN) e vários osciladores escravos presentes em órgãos periféricos (GEYFMAN; ANDERSEN, 2009).

A maquinaria do relógio circadiano regula um grande conjunto de genes de controle de relógio (*CCGs*) e as transcrições de muitos destes genes apresentam ritmos circadianos (AKHTAR et al., 2002; BLASING et al., 2005; WIJNEN et al., 2006). Identificação de *CCGs* e elucidação de sua função é uma importante linha de pesquisa em cronobiologia (SATO et al., 2003; DOHERTY; KAY 2010).

Abelhas melíferas (*A. mellifera*) fornecem um excelente modelo em cronobiologia porque seu relógio circadiano está envolvido em comportamentos complexos como memória ligada ao tempo, orientação pelo sol e comunicação por dança (BLOCH, 2009; 2010). Além disso, as abelhas mostram plasticidade natural, marcante em ritmos circadianos que estão associados com a divisão do trabalho que organiza suas sociedades complexas. Operárias forrageiras exibem fortes ritmos circadianos, e são ativas durante o dia, e no sono durante a noite, como se encaixa a sua dependência em relação aos ritmos diários de néctar floral e disponibilidade de pólen. Abelhas operárias nutrizas que cuidam da ninhada não apresentam ritmos circadianos claros (BLOCH, 2009; 2010).

A organização anatômica do relógio circadiano não foi descrito em detalhes para as abelhas ou para qualquer outro inseto social. No entanto, é seguro assumir que o marca-passo central controlando o comportamento rítmico está localizado no cérebro, como em todos os outros insetos estudados até agora (SAUNDERS, 2002; HELFRICH-FÖRSTER, 2004).

A família JHBP consiste de diversas proteínas de ligação ao hormônio juvenil. O HJ regula embriogênese, mantém o *status quo* do desenvolvimento larval e estimula maturação reprodutiva no inseto adulto. HJ é transportado dos locais de sua síntese a tecidos alvos por um carregador da hemolinfa chamado JHBP. JHBP protege as moléculas de HJ de hidrólise por esterases não-específicas presentes na hemolinfa do inseto. A estrutura cristalina do JHBP de *Galleria mellonella* mostra uma dobra não usual consistindo de uma longa alfa-hélice enrolada numa curva muito antiparalela em folha-beta. O padrão de dobra para esta estrutura se assemelha a encontrada em algumas proteínas ligantes de lípidos *tandem-repeat* de mamíferos e proteínas de aumento da permeabilidade bactericida, com uma organização similar da grande cavidade e uma ligação dissulfeto ligando a longa hélice e folha-beta. Parece que JHBP forma duas cavidades, das quais apenas uma, aquela perto de N- e C-terminais, liga-se o hormônio; esta ligação induz uma mudança conformacional, de significado desconhecido [NCBI Conserved Domain (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009; 2011)].

Esta proteína, circadian clock-controlled protein-like, apresenta um domínio JHBP que permite a ligação de HJ que controla o desenvolvimento larval. As larvas de rainhas apresentam títulos de HJ bem mais elevados na fase L3 do que as larvas de operária na mesma fase. Esta proteína poderia atuar na regulação do desenvolvimento cerebral pela ligação ao HJ, favorecendo o desenvolvimento nas larvas de rainhas que apresentam cérebro maior que o de operárias na fase larval.

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB48978, super-expressa no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L3 (Fold-change: 14,911), apresenta o domínio conservado *Sugar (and other) transporte*.

Duas propriedades dos regimes alimentares têm um significado particular no modelo: um teor de açúcar reduzido da alimentação oferecida às larvas jovens destinado a operárias jovens, o que reduz sua taxa metabólica e título de HJ na hemolinfa e induz morte celular programada nos ovários, e uma quantidade reduzida de alimento para as larvas mais velhas destinadas a operárias, o que as torna menores. (LINKSVAYER et al. 2011; 2012).

Os títulos de HJ na hemolinfa de rainhas e operárias respondem às regimes alimentares impostas pelas nutrizes. Alimento dado à rainha é irrestrito e contém cerca de 12% de açúcar, enquanto operárias sofrem mudanças na alimentação durante o desenvolvimento. Durante os três primeiros estágios (L1- L3) a alimentação da operária é irrestrita. A alimentação passa a ser restrita no quarto e quinto estágios, quando o teor de açúcar é aumentado. Depois das nutrizes selarem as células de operárias, estas passam fome até a fase de pré-pupa, enquanto que as células de rainha são provisionadas em massa de vedação, de modo que as rainhas continuam sendo alimentadas até a fase de pré-pupa (REMBOLD, 1987; ASECOT; LENSKY, 1988; RACHINSKY et al., 1990; ANTONIALLI; DA CRUZ-LANDIM, 2009; LEIMAR et al., 2012).

Como mostrado acima às larvas de rainhas recebem uma maior quantidade de açúcar na sua alimentação, que é um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de caracteres específicos de rainha, como por exemplo, o cérebro maior na fase larval. Devido à grande quantidade de açúcar recebida durante a fase larval é necessário proteínas que transportem esse açúcar para dentro das células, o que leva as larvas desta casta ter maior expressão de um gene com domínio de transportador de açúcar.

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB44513, super-expressa no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L3 (Fold-change: 18,421), apresenta identidade com a proteína Cyp4av1 de *A. mellifera*. Cyp4s3 é sua proteína ortóloga em *D. melanogaster*. Esta proteína apresenta o domínio conservado *Cytochrome P450*.

Citocromo P450 forma uma diversificada e importante superfamília de genes presente virtualmente em todos os organismos. Projetos de sequenciamento do genoma identificaram um grande número de seqüências P450 em eucariotos (LE GOFF et al., 2003; LEWIS, 2004; STRODE et al., 2008). Originalmente identificado como monooxigenases, enzimas P450 são agora conhecidos por catalisar uma gama extremamente diversificada de reações químicas

importantes, tanto em processos de desenvolvimento e na desintoxicação de compostos estranhos (HANNEMANN et al., 2007; ISIN; GUENGERICH, 2007).

P450 que executam funções essenciais em mamíferos e plantas têm sido identificados. Por exemplo, em seres humanos, *cyp17a1* e *cyp19a1* catalisam passos na produção de androgênios e estrogênios (HAKKI; BERNHARDT, 2006). *Cyp26b1* metaboliza o ácido retinóico e está envolvido no destino das células germinais nos testículos de ratos (BOWLES et al., 2006). *Cyp4f2* está envolvido na eliminação de formas de pós-absortivo gama-tocoferol de vitamina E (SONTAG; PARKER, 2002). Mutações em P450 de humano também conduz a várias doenças (LI et al., 2004; NEBERT; RUSSELL, 2002). P450 de plantas são essenciais para catalisar os passos na síntese de diversos compostos, incluindo fenilpropanoides, lípidos, fito-hormonas, e carotenóides (SCHULER; WERCK-REICHHART, 2003; INOUE, 2004). Funções para P450 na desintoxicação de xenobióticos, por exemplo, metabolismo mediado por P450 de drogas em mamíferos (GUENGERICH, 2003), são também bem caracterizados

Em comparação com as plantas e mamíferos, muito menos se sabe sobre as funções dos diferentes enzimas P450 de insetos. Uma exceção é o envolvimento de P450 na biossíntese do principal hormônio de insetos 20-hidroxiecdisona (20H) de esteróis vegetais, onde em *Drosophila melanogaster* pelo menos seis P450 estão envolvidos (GILBERT, 2004). *Cyp302a1*, *Cyp306a1*, *Cyp315a1* e *Cyp307a2* são expressos nas glândulas protorácicas de embriões mais velhos e larvas e catalisam passos na via biossintética da ecdisona (CHAVEZ et al., 2000; WARREN et al., 2002; 2004; ONO et al., 2006), enquanto *Cyp314a1* (*shade*), responsável por catalisar a conversão de ecdisona à 20H, é expresso no intestino, túbulos de Malpighi, e corpo gorduroso (PETRYK et al., 2003). *Cyp307a1* (*spook*), também tem sido sugerido desempenhar um papel na síntese de ecdisona, mas que não é expressa em larvas (ONO et al., 2006). P450 envolvidos em outros processos endógenos importantes na *D. melanogaster*, também foram identificados, incluindo *Cyp303a1*, necessário para o desenvolvimento e estrutura de cerdas sensoriais (WILLINGHAM; KEIL, 2004). P450 também estão envolvidos em fenótipos comportamentais em *D. melanogaster*, com *Cyp6a20* associado ao comportamento agressivo em homens (DIERICK; GREENSPAN, 2006; WANG et al., 2008). Na barata *Diploptera punctata*, *Cyp15a1* está envolvido na biossíntese de hormônio juvenil III (HELVIG et al., 2004).

Sugeriu-se que é necessário um grande complemento de P450 em genomas de insetos (a maioria dos insetos possuem cerca de 100 diferentes P450) para proteger o inseto do diversificado leque de compostos nocivos em seu ambiente (CLAUDIANOS et al., 2006). P450 de insetos capazes de metabolizar aleloquímicos foram identificados (LI; SCHULER;

BERENBAUM, 2007). Por exemplo, *cyp6b1v1* e *cyp6b3v1* da borboleta *Papilio polyxenes* pode metabolizar os furanocoumarins que estão na sua dieta (CHEN; BERENBAUM; SCHULER, 2002; LI; SCHULER; BERENBAUM, 2004). Numerosos P450 individuais foram também implicados na resistência a inseticida em diferentes populações de insetos (DABORN et al., 2002; BOGWITZ et al., 2005; YANG et al., 2006). Considerando a grande variedade de eventos biológicos associados a este tipo de moléculas, em geral, relacionadas a processos fisiometabólicos e crescimento, seria de interesse avaliar os alcances de sua participação no desenvolvimento diferencial do cérebro larval entre castas. De maneira interessante, Evans e Wheeler (2001) analisando o corpo inteiro, encontraram um gene desta família mais expresso em larvas de operárias, o qual não faz mais do que adicionar razões para futuros estudos relacionados à biologia do gene correspondente a GB44513.

*Outros genes.* Alguns produtos dos genes mais expressos em cérebros de larvas de rainhas L3 apresentam algumas informações conhecidas, porém não apresentam função clara no desenvolvimento do cérebro. Estas proteínas estão citadas e discutidas abaixo.

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB49054, super-expressa no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L3 (Fold-change: 15,713), apresenta similaridade com a proteína trynity de *D. melanogaster*.

Um primeiro passo para a remodelação localizada de células epiteliais é a sua polarização ao longo do eixo apical-basal. De acordo com os modelos atuais (WODARZ; NATHKE, 2007), três processos principais interagem para modificar os mecanismos celulares básicos e levar a distribuição de várias moléculas polarizadas (MELLMAN; NELSON, 2008). Primeiro, o controle pós-traducional de proteína de triagem e de tráfico intracelular fornece sinais intrínsecos para a entrega localizada de componentes da membrana. Em segundo lugar, em conjunto com o citoesqueleto, os complexos de proteínas que atuam como determinantes de polaridade para fornecer sinais de orientação que especifica a polaridade celular global e a forma (WODARZ; NATHKE, 2007). Finalmente, são necessários sinais extracelulares para orientar os mecanismos intracelulares num espaço tridimensional topologicamente ordenados (SCHOCK; PERRIMON, 2002).

Proteínas do domínio da zona pelúcida (ZPD) apresentam um papel mecânico na remodelação local da forma da célula, tais como alongamento de células da asa de pupa em *Drosophila* (ROCH; ALONSO; AKAM 2003), constrição de células da hipoderme laterais em *C. elegans* (SAPIO et al., 2005) e indução da forma colunar em células estaminais embrionárias e de rim (TAKITO; AL-AWQATI, 2004). A zona pelúcida também influencia o

eixo embrionário-extra-embrionário de blastocistos de mamíferos através de restrições físicas (KUROTAKI et al., 2007), mostrando que as proteínas ZDP podem estar envolvidas em várias etapas na regulação mecânica da morfologia de células e tecidos.

Um estudo realizado com *Drosophila* por Fernandes et al., (2010) mostrou que as proteínas ZDP mais basais, Trynity e Zye, são necessárias para a correta manutenção de complexos juncionais e determinantes apicais em células do dentículo. Isto, por sua vez, sugere uma interação bidirecional entre proteínas ZPD e complexos de junção/polaridade para assegurar, por um lado, a correta localização de ZDP e, por outro lado, um reforço das junções e determinantes apicais em células do dentículo. Reorganização de junções celulares é crítico para várias alterações na forma da célula, tais como as envolvidas durante a extensão da banda germinal ou invaginação da mesoderme (LECUIT; LENNE, 2007), e pode estar envolvido no alongamento que ocorre ao longo do eixo dorsoventral de células do dentículo. Além disso, a deformação do compartimento apical, que é mediada por reorganização de ECM e de actina e requer provavelmente uma arquitetura robusta das estruturas laterais para ser traduzido para uma alteração coerente na forma da célula.

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB54144, super-expressa no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L3 (Fold-change: 24,313), apresenta o domínio conservado *Animal heme peroxidases and related proteins*.

Heme peroxidases são enzimas abundantes que podem ser classificadas em duas grandes famílias, as peroxidases animais e não-animais, que surgiram a partir de dois eventos evolutivos independentes (PASSARDI et al., 2007). As peroxidases não-animais incluem plantas, bactérias, fungos e protistas (PASSARDI et al., 2007). O ciclo de peroxidase clássica envolve uma sequência de reações da enzima nativa para composto I, então composto II e, finalmente, de volta à enzima nativa (DUNFORD, 1999). Uma via alternativa e altamente importante pela qual as heme peroxidases de mamíferos (MHPS) passam, dependendo da disponibilidade do substrato, é o ciclo de halogenação (FURTMULLER et al., 2006). Na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e um haleto (especialmente iodeto), mieloperoxidase (MPO) pode catalisar uma reação de halogenação, que desempenha um papel importante na atividade antibacteriana de leucócitos (CLARK, 2000). Peroxidases animais são um grupo medicamente importante de enzimas implicadas em diversas doenças, incluindo asma (SANZ et al., 1997), mal de Alzheimer (AD) (REYNOLDS et al., 2000), e doença vascular inflamatória (LAU; BALDUS, 2006). A partir de estudos bioquímicos, acredita-se que as heme peroxidases de mamíferos surgiu na sequência de uma série de eventos de duplicação gênica (SAKAMAKI et al., 2000; SAKAMAKI; UEDA; NAGATA, 2002; FURTMULLER et al., 2006).

MHPS foram classificadas em quatro famílias principais com base em sua função; mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO), lactoperoxidase (LPO) e peroxidase (TPO). MPO, EPO e LPO têm papel nas respostas imunes inatas e antimicrobianas (KLEBANOFF, 1970; 1999; WANG; SLUNGAARD, 2006), ao passo que, a TPO tem um papel chave na biossíntese do hormônio da tireóide (RUF; CARAYON, 2006). Um estudo das relações estrutura-função de heme peroxidases de humanos sugere que a evolução da TPO sucedeu a das MPO, EPO e LPO, mas que essas famílias compartilharam um ancestral comum (SAKAMAKI et al., 2000; SAKAMAKI; UEDA; NAGATA, 2002; FURTMULLER et al., 2006). MHPS estão presentes em vários tecidos e, como tal, a sua função de peroxidase varia dependendo do tecido de expressão. Há semelhanças estruturais e funcionais entre esta família multigênica de enzimas especialmente com respeito aos seus domínios catalíticos, isso reflete o seu parentesco evolutivo. Demonstrou-se que os resíduos do sítio ativo são conservados em todas as heme peroxidases (FURTMULLER et al., 2006; ZEDERBAUER et al., 2007).

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB54139, super-expressa no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L3 (Fold-change: 27,166), apresenta identidade com a proteína Mur89F de *A. mellifera*. Essa proteína é ortóloga a proteína de mesmo nome em *D. melanogaster*.

Epitélios que estão em contato com o ambiente externo muitas vezes produzem estruturas moleculares especiais para a proteção de superfície apical. Essas matrizes contêm conjuntos macromoleculares ricos em porções hidrato de carbono que protegem o epitélio de danos mecânicos, são barreiras contra microorganismos e moléculas tóxicas, e ajudam a manter a superfície epitelial hidratada e lubrificada. Um grupo de macromoléculas grandes glicosiladas, importante para a mucosa dos órgãos de mamíferos, é a família das mucinas. As mucinas são abundantes nos pulmões e no trato digestivo de vertebrados, e fornecem lubrificação da superfície luminal e proteção do epitélio subjacente contra danos físicos e agentes patogênicos (HOLLINGSWORTH; SWANSON, 2004). As mucinas são secretadas em forma de gel, ou ligadas à membrana por domínios transmembranares especiais cliváveis. A principal característica das proteínas de mucina são suas regiões extensas de sequências repetidas em tandem, que contêm prolinas juntamente com serinas e/ ou treoninas, nas quais as cadeias laterais grandes de açúcar anexam (PEREZ-VILAR; HILL, 1999). Estas repetições PTs (prolina, serina e treonina) geralmente ocupam entre 30 e 90% do comprimento da proteína e são vislumbrado como uma espinha dorsal do polipeptídeo estendida densamente coberta com porções de carboidratos muito parecido com uma escova para limpeza de tubos.

As restantes partes da proteína muitas vezes contêm domínios de proteínas conservadas que medeiam as interações proteína-proteína. Assim, as mucinas são capazes de formar redes enormes, a qual glicosiladas repetições PTs conferem elevada capacidade de ligação a água, uma função de barreira seletiva e a capacidade para reter os microrganismos.

Consistente com uma função de proteção as mucinas de superfícies epiteliais de órgãos em *Drosophila*, verificou-se que a maioria das *mucinas* identificados são expressas por epitélios livres de cutícula de larvas. Em insetos, a PM que contém fibras de quitina e proteínas glicosiladas protege o aparelho digestivo (LEHANE, 1997; SHI et al., 2004). Além do trato digestivo, um segundo tecido de *Drosophila* com expressão proeminente de *mucina* é a glândula salivar (SYED et al., 2008).

Um achado interessante feito pelo grupo de Syed (2008) foi a expressão abundante de *mucinas* no embrião em desenvolvimento. Os seus padrões de expressão se correlacionam com as matrizes apical e luminais podendo representar novos componentes de tais matrizes. As únicas matrizes apicais caracterizadas em embriões de *Drosophila* possuem quitina e incluem uma matriz luminal temporária que é necessária para moldar os tubos traqueais (TONNING et al., 2005). É uma possibilidade interessante que grandes proteínas glicosiladas, como mucinas, contribuir de forma semelhante para a formação de órgãos não produtores de quitina, proporcionando um andaime luminal durante o seu desenvolvimento.

*Família Osiris.* Os genes correspondentes a GB50566, GB50560, GB50562, GB50565, GB50577 encontram-se mais expresso no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L3. Estes genes pertencem a família de genes Osiris, respectivamente Osiris-8, Osiris-24, Osiris-3, Osiris-7 e Osiris-17.

A família de genes Osiris é uma grande família conservada descrito pela primeira vez em *Drosophila melanogaster* (DORER et al., 2003). Embora os genes ainda tenham função desconhecida, sabe-se que são a base molecular do locus Triplo letal em *D. melanogaster*, descrito pela primeira vez em 1972 (LINDSLEY et al., 1972). Membros da família de Osiris são caracterizados por cinco características: (1) uma região hidrofóbica no N-terminal que é provavelmente um peptídeo sinal de secreção, (2) uma região two- Cis, (3) um domínio de função desconhecida, DUF1676 (família Pfam: PF07898) (FINN et al 2010), (4) um domínio hidrofóbico transmembrana putativo, e (5) uma região incluindo um motivo AQXLAY e frequentemente resíduos de tirosina adicionais nas proximidades (SHAH et al., 2012). Vinte e três genes *Osiris* foram originalmente encontrados no genoma de *D. melanogaster*, com 20 deles localizado no cromossomo 3R (83E), num conjunto dentro de uma região de 168 kb, o



que é tanto triplo-letal quanto haplo-letal. Mais um gene da família foi encontrado, o *Osiris 24*, localizado entre *Osiris-1* e *-2* (SHAH et al., 2012). A família de genes Osiris também foi encontrada no mosquito *Anopheles gambiae*, mantendo a sintenia exceto por um rearranjo cromossômico que divide o *cluster* (DORER et al., 2003). O conjunto do genes *Osiris* é um gene específico de insetos, e uma família de genes bem conservada, notavelmente sintênica (SHAH et al., 2012). Claramente, a família de genes Osiris está em necessidade de mais estudos para saber qual sua função nas diversas espécies de insetos em que estão presentes.

*Genes não caracterizados.* Algumas das proteínas codificadas pelos GEDs encontrados não são ortólogas a nenhuma proteína conhecida de *D. melanogaster*, e não apresentam domínio conservado de acordo com a ferramenta Pfam (GB52105, GB46975, GB50561, GB41493). Outras não tem domínio conservado e possuem a proteína de *D. melanogaster*, porém estas ainda não foram estudadas (GB49795/ CG15239, GB50180/ CG8420). Dessa forma, estes genes não puderam ser estudados pelas abordagens usadas neste projeto, deve-se utilizar outros métodos para caracterizá-las.

## 5.2 SOBRE OS GENES MAIS EXPRESSOS NO CÉREBRO DE OPERÁRIAS L3

De acordo com as análises *in silico*, 18 dos 31 genes mais expressos no cérebro de operárias em relação ao de rainhas em L3 apresentam proteína já conhecida ou domínio conservado.

*Genes relacionados à atividade inibidora de serino protease: chymotrypsin inhibitor-like e chymotrypsin inhibitor, GB51989.* As sequências de aminoácidos preditas referente aos GB50121 e GB501216, super-expressas no cérebro de operárias em relação ao de rainhas em L3 (Fold-change: 26,525 e 6,922, respectivamente), apresenta identidade com as seguintes proteínas chymotrypsin inhibitor-like e chymotrypsin inhibitor (Amci) de *A. mellifera*, que possui o domínio conservado *Trypsin Inhibitor cysteine rich domain*. A proteína correspondente ao GB51989 também mais expresso em cérebros de operárias (Fold-change: 9,747) possui o domínio conservado *Pacifastin inhibitor (LCMII)* que também é um inibidor de serina protease.

Os três genes supracitados têm função relacionada à inibição de serino-proteases (CIERPICKI; BANIA; OTLEWSKI, 2000; SIMONET; CLAEYS; VANDEN BROECK, 2002), proteínas que tiveram maior expressão nos cérebros de rainhas L3 em comparação com os de operárias na mesma fase. Como discutido anteriormente as serino-proteases teriam papel no desenvolvimento do cérebro. Especificamente a inibição da tripsina, como apresentado pelo domínio de GB50116, GB50121 poderia prejudicar o desenvolvimento neuronal, plasticidade, neurodegeneração e neuroregeneração do cérebro. Assim, estes genes inibidores de serino-proteases mais expressos no cérebro de larvas L3 de operárias poderia contribuir para um menor desenvolvimento do cérebro em operárias durante os primeiros estágios de desenvolvimento.

*Genes importantes para o desenvolvimento de características desta casta: Hex 110, 70b e 70c, Cyp9q1, nesprin-1-like.* As sequências de aminoácidos preditas referente aos GB51697, GB51696 e GB44996, super-expressas no cérebro de operárias em relação ao de rainhas em L3 (Fold-change: 41,532, 25,244 e 12,385, respectivamente), apresenta identidade com as seguintes proteínas Hexamerin 70b precursor mRNA, Hexamerin 70c precursor e Hexamerina 110 de *A. mellifera*, que possuem os domínios conservados *Hemocyanin*, *all-alpha domain*, *Hemocyanin copper containing domain* e *Hemocyanin, ig-like domain*.

Proteínas de armazenamento representam uma reserva de aminoácido que, além de outros compostos orgânicos, são essenciais para a construção e diferenciação de tecidos adultos de insetos holometábolos durante metamorfose. A maioria das proteínas de armazenamento pertence à classe de hexamerinas, que são sintetizadas em grandes quantidades pelas células do corpo gorduroso durante a fase de crescimento das larvas, e são secretadas para a hemolinfa onde se acumulam (TELFER; KUNKEL, 1991). Elas são coletadas de volta no corpo gorduroso, pouco antes de metamorfose, sob a regulação de ecdisteroides, e utilizadas como fonte de aminoácidos durante a metamorfose (TELFER; KUNKEL 1991; BURMESTER; SCHELLER, 1995). Além disso, hexamerinas parecem desempenhar um papel importante na diferenciação de castas em insetos sociais, como as vespas *Polistes* (HUNT et al., 2007) e os cupins *Reticulitermes flavipes* em que a supressão simultânea de hexamerinas 1 e 2 promove a diferenciação para a casta de operárias guardas (ZHOU; OI; SCHARF, 2006).

*A. mellifera* possui quatro hexamerinas: *hexamerinas 70a, 70b, 70c, e 110*, das quais *Hex 70a* é expressa tanto em larvas e adultos, as outras três são expressas em altos níveis na fase larval e diminuem drasticamente depois (CUNHA et al., de 2005;. BITONDI et al., 2006).

A regulação da transcrição e pós-transcrição da produção de hexamerina por HJ foi estudada em diferentes espécies de insetos. Em alguns experimentos, HJ exógeno não produziu quaisquer efeitos notáveis (KUMARAN et al., 1987). No entanto, existem vários casos em que foi demonstrado que a biossíntese de hexamerina é regulada por HJ. Em geral, demonstrou-se que o hormônio reprime a biossíntese desta classe de proteínas (MEMMEL et al., 1994; JAMROZ et al., 1996; HWANG et al., 2001). A evidência a partir de experiências com manipulação hormonal (as quais foram realizadas principalmente em espécies de lepidópteros e dípteros) indica que a expressão de *hexamerina* é também regulada por ecdisteróides nos níveis de transcrição e biossíntese (KUMARAN et al., 1987; MEMMEL et al., 1994).

Um trabalho realizado por Martins e colaboradores (2010) mostrou que os quatro genes *hexamerina* foram altamente transcritos no corpo gorduroso larval de operárias, rainhas e zangões, e são, provavelmente, envolvidos na síntese de hexamerina para armazenamento de aminoácidos para apoiar metamorfose e desenvolvimento para a fase adulta. No entanto, esses genes foram diferencialmente co-expresso nos morfotipos de abelhas. A diferença mais evidente ocorreu durante a fase de alimentação do 5º instar larval (L5F), onde observou-se um maior nível de *hex 110*, *70a* e *70b* em operárias e zangões do que em rainhas. Esta é uma descoberta muito interessante se contrastado com a casta e título de HJ sexo-específicos nesta fase, que é maior em rainhas do que em operárias e zangões (REMBOLD, 1987; RACHINSKY et al., 1990). Sabe-se que HJ desempenha um papel central na diferenciação fenotípica de castas em *A. mellifera*: um alto título induz o desenvolvimento de uma rainha e um título baixo especifica o fenótipo de operária (WIRTZ; BEETSMA, 1972; REMBOLD; CZOPPELT; RAO, 1974) relação inversa entre os níveis de transcrições de *hex* e títulos de HJ sugere que, como foi proposto para os cupins *Reticulitermis flavipes* (ZHOU; OI; SCHARF, 2006; ZHOU et al., 2006; ZHOU; TARVER; SCHARF, 2007; SCHARF et al., 2007), as hexamerinas podem funcionar como proteínas que se ligam ao HJ. Pode supor que se o título de HJ ultrapassou a capacidade de ligação de hexamerinas, iria interagir com receptores alvo e, portanto, fazer com que a larva fêmea bipotente desenvolva-se como rainha. Se não, a larva se desenvolve como operária.

Como citado acima hexamerinas parecem guiar as larvas fêmeas de *A. mellifera* para o desenvolvimento de operárias. *Hex 110*, *70b* e *70c* foram mais expressos em cérebros de larvas de operárias L3 em comparação com amostras de cérebros de rainhas na mesma fase, o que pode já demonstrar a importância desses genes no desenvolvimento de caracteres específicos de operárias.

A sequência de aminoácidos predita referente aos GB43713, super-expressa no cérebro de operárias em relação ao de rainhas em L3 (Fold-change: 16,490), apresenta identidade com a proteína Cyp9q1 de *A. mellifera*. A proteína Cyp9f2-PA é sua órtologa em *D. melanogaster*. Possui o domínio conservado *Cytochrome P450*.

As atividades multifuncionais de monooxigenases do citocromo P450 contribuem para o metabolismo de toxinas naturais e sintéticas na maioria dos organismos aeróbios (GUENGERICH, 2005; GILLAM; HUNTER, 2007; SCHULER, 2011). Desintoxicação mediada por P450 é central para a tolerância e resistência desenvolvida a pesticidas em muitos insetos-praga (FEYEREISEN, 2005; LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007), incluindo a tolerância a inseticidas piretróides em abelhas (GILBERT; WILKINSON, 1975; PILLING et al., 1995; JOHNSON et al., 2006). Dos 46 genes *P450* encontrados no genoma de abelha, 28, pertencem ao clã CYP3, uma grande linhagem de *P450* incluindo muitos CYP6 e familiares CYP9 que são conhecidos por mediar funções detoxificante em outros insetos (FEYEREISEN, 2005). A expansão única de genes na subfamília CYP6AS (em relação a outros genomas himenópteros) sugere que estas proteínas desempenham um papel na desintoxicação de xenobióticos presentes na dieta distintiva da abelha melífera.

Um estudo realizado por Mao, Schuler e Berenbaum (2011) mostrou que os membros da subfamília CYP9Q são responsáveis pelo metabolismo de tau-fluvalinato. Além disso, a capacidade desses P450 para metabolizar coumafos em experiências *in vitro*, juntamente com os modelos moleculares que demonstram que ambos os acaricidas cabem na região catalítica (ainda que em diferentes locais), fornece evidência em apoio de inibição competitiva, como o mecanismo subjacente de sinergismo entre estes dois compostos (JOHNSON; POLLOCK; BERENBAUM, 2009). A inibição competitiva da CYP9 P450 pode ser responsável por outras interações sinérgicas entre os pesticidas em abelhas melíferas.

Outro trabalho realizado por Cornman, Lopez e Evans (2013) analisou a resposta de genes à infecção por *Paenibacillus larvae* e dentre eles estava o gene *cyp9q1*, mostrando que este gene parece participar da desintoxicação de compostos estranhos em *A. mellifera*. A expressão de proteínas da família P450 em larvas de operárias também já havia sido descrita por Evans e Wheeler (2001).

A maior expressão do gene *cyp9q1* em operárias ocorreu na fase L3, onde as larvas de operária sofrem uma mudança na dieta que resulta na introdução de grãos de pólen, enquanto que a geléia real contém apenas vestígios de pólen (HAYDAK, 1970). A introdução de pólen expõe larvas de operária a uma série de compostos estranhos. Um exemplo disto é a adição de quercetina, um composto flavinoide encontrado em mel e pólen (MAO et al., 2009).

A sequência de aminoácidos predita referente aos GB40007, super-expressa no cérebro de operárias em relação ao de rainhas em L3 (Fold-change: 54,706), apresenta identidade com a proteína nesprin-1-like de *A. mellifera*. Essa proteína é ortóloga da Msp-300-PD de *D. melanogaster*.

O posicionamento adequado de núcleos em células é crucial para muitos processos biológicos, incluindo a fertilização, a divisão celular, a migração de células e outras funções celulares. Migração nuclear e fixação têm sido extensivamente estudadas, e tanto os microtúbulos e os sistemas do citoesqueleto de actina mostraram desempenhar um papel importante nestes processos (MORRIS, 2003; STARR; HAN, 2003). Nos últimos anos, as análises genéticas em diversos modelos de organismos demonstraram que Klarsicht/ANC-1/Syne, homólogos a proteínas com o domínio KASH que estão associadas com o envelope nuclear, desempenham papéis importantes no posicionamento nuclear durante vários processos celulares e desenvolvimento (MOSLEY-BISHOP et al., 1999; STARR et al., 2001; STARR; HAN, 2002; MALONE et al., 2003; GRADY et al., 2005; YU et al., 2006).

O domínio KASH é um motivo conservado de proteína de aproximadamente 60 aminoácidos que está localizado na região C- terminal de proteínas da família KASH (STARR; FISCHER, 2005). Domínios KASH mostraram ligar-se à membrana nuclear e provavelmente são responsáveis pela associação do envelope nuclear com proteínas KASH (ZHANG et al., 2001; ZHEN et al., 2002; STARR; HAN, 2002; MALONE et al., 2003; FISCHER et al., 2004; GRADY et al., 2005; WILHELMSSEN et al., 2005; YU et al., 2006). Em *C. elegans*, as proteínas de domínio KASH UNC - 83, ANC- 1 e ZYG - 12 têm sido associadas com o envelope nuclear e desempenham papéis na migração nuclear, ancoragem nuclear de células sinciciais e associação de centrossomos com o envelope nuclear durante a divisão celular, respectivamente (STARR et al., 2001; HAN, 2002; MALONE et al., 2003; STARR). Em *Drosophila*, a proteína Klarsicht de domínio KASH mostrou ser importante para a migração nuclear durante o desenvolvimento do olho e para o movimento de gotículas lipídicas (MOSLEY-BISHOP et al., 1999). A proteína MSP-300 de *Drosophila*, um homólogo de ANC- 1 na estrutura geral (STARR; HAN, 2002; ZHANG et al., 2002), também foi mostrado estar associada com o envelope nuclear e possuir um papel crucial na ancoragem de núcleos de células nutrízes durante a ovogênese (YU et al., 2006).

Três proteínas contendo domínio KASH foram descobertas em mamíferos, nomeadamente Nesprin-1 (também conhecida como Syne-1), Nesprin-2 (também conhecida como Syne-2) e Nesprin - 3 (ZHANG et al., 2001; ZHEN et al., 2002; WILHELMSSEN et al., 2005). Syne-1 e Syne-2 são ortólogos de ANC-1 e MSP-300: todas as quatro proteínas são

muito grandes (> 6000 aminoácidos) e contêm os domínios de ligação à actina na região N-terminal, uma grande parte no meio e um domínio KASH na região C-terminal (STARR; FISCHER, 2005). As semelhanças estruturais de proteínas Syne e ANC-1 e MSP-300 sugerem que também podem estar envolvidas na ancoragem nuclear durante importantes processos celulares e de desenvolvimento.

Proteínas Syne têm sido implicadas em papéis importantes no posicionamento nuclear em células do músculo esquelético multinucleadas. Durante o desenvolvimento precoce do músculo esquelético, centenas de mioblastos se fundem para formar miotubos multinucleados, e submeter-se a migração de núcleos (ENGLANDER; RUBIN, 1987). Posteriormente, cada miotubo amadurece numa grande fibra muscular sincicial e os núcleos são estavelmente ancorados na periferia de cada célula individual (BRUUSGAARD et al., 2003). Visivelmente, com exceção de um grupo de 3-8 núcleos (núcleos sinápticos), sob a junção neuromuscular (JNM), os mionúcleos se distribuem uniformemente nas fibras musculares (SANES; LICHTMAN, 1999). O padrão de localização uniformemente espaçados de núcleos não-sinápticos parece resultar de repulsão entre os núcleos para minimizar a distância de transporte (BRUUSGAARD et al., 2003). Um envolvimento direto de proteínas Syne no posicionamento nuclear foi indicado no estudo de camundongos transgênicos expressando uma forma negativa dominante de Syne -1 (GRADY et al., 2005). Este estudo mostrou que a expressão ectópica da forma dominante negativa de *Syne - 1* interrompeu o posicionamento dos núcleos sinápticos, mas não teve nenhum efeito sobre o mesmo espaçamento dos núcleos não-sinápticos. Outro estudo realizado por Zhang et al. (2007) mostrou que Syne-1 é essencial para o posicionamento não apenas dos núcleos sinápticos, mas também dos núcleos não-sinápticos. Os núcleos sinápticos podem desempenhar papéis importantes na seleção ou manutenção dos locais de inervação através do reforço da comunicação entre nervos e músculos e nos contatos recém-formados de músculo e nervo. Além disso, cerca de 2% das células musculares de camundongos deficientes para *Syne-1* exibiram núcleos centralizados, em comparação com menos de 0,5% no grupo controle. A organização fortemente perturbada dos núcleos não-sinápticos pode prejudicar o transporte normal do núcleo para o citoplasma, bem como de outras interações, nas grandes células musculares sinciciais. Isto poderia causar enfraquecimento nas funções normais do músculo esquelético. Um estudo realizado com larvas de *Drosophila* (VOLK, 2013) mostrou que MSP-300 é uma proteína chave na promoção do posicionamento de todas as organelas musculares.

Posicionamento nuclear é um processo dinâmico, que está intimamente ligado a um determinado tipo de célula, o seu estado de diferenciação, morfologia e tamanho global. O

produto de *nesprin-1* mais expresso em cérebros de larvas de operárias L3 parece estar envolvido no processo de posicionamento nuclear de células musculares e na sua inervação, o que já poderia refletir uma maior necessidade de músculos em operárias adultas do que nas rainhas.

*Outros genes.* Alguns produtos dos genes mais expressos em cérebros de larvas de operárias L3 apresentam algumas informações conhecidas, porém não apresentam função clara no desenvolvimento do cérebro. Estas proteínas estão citadas e discutidas abaixo.

A sequência de aminoácidos predita referente aos GB52466, super-expressa no cérebro de operárias em relação ao de rainhas em L3 (Fold-change: 7,445), apresenta o domínio conservado *Vitellogenin\_N*.

A proteína codificada por este gene possui características estruturais, usualmente associadas a funções de estocagem (BERG et al., 2002.). De maneira semelhante ao que acontece com outras proteínas inicialmente definidas como estruturais que posteriormente se mostraram relacionadas a funções mais sutis, como em células germinativas (hexamerinas; MARTINS et al., 2010) e cérebro (major royal jelly proteins; KUCHARSKI et al., 1998; PEIXOTO et al., 2009; BUTTSTEDT; MORITZ; ERLER, 2013), esta proteína (codificada pelo GB52466) de tipo vitelogênico (vitellogenin-like) pode desempenhar papéis no desenvolvimento cerebral diferencial em abelhas.

As sequências de aminoácidos preditas referente aos GB48823 e GB46311, super-expressas no cérebro de operárias em relação ao de rainhas em L3 (Fold-change: 7,788 e 25,701, respectivamente), apresenta identidade com as seguintes proteínas CPR2 e CPR21 de *A. mellifera*, que possui o domínio conservado *Chitin bind 4*.

A cutícula de artrópodes é um composto de quitina e proteínas cuticulares. Enquanto quitina é um polímero uniforme de N- acetilglucosamina, o componente proteico é formado por uma multiplicidade de proteínas da cutícula (CP). A descoberta da divisão foi feita quando Rebers e Riddiford (1988) reconhecerem um motivo comum em algumas das poucas sequências proteicas cuticulares então disponíveis. O que é notável é que apenas seis sequências, das quais apenas cinco estavam completas, formaram a base do que é conhecido como o Rebers e Riddiford Consenso (R & R Consensus), também conhecido como *Chitin bind 4*, que está presente em 72% das 519 sequências de proteínas cuticulares disponíveis em dezembro de 2006 em cuticleDB (MAGKRIOTI et al., 2004) <http://bioinformatics2.biol.uoa.gr/cuticleDB/index.jsp>. O consenso foi encontrado em proteínas da cutícula de 24 espécies de insetos a partir de sete ordens e também a partir de

quatro crustáceos e dois Chelicerata. A família CPR, em homenagem a presença do Consenso de R & R, é de longe a maior família CP em todas as espécies de artrópodes examinadas e teve o maior número de representantes na era pré-genômica.

Em 1988 Rebers e Riddiford vislumbraram que o Consenso deve servir de alguma função fundamental. A sugestão de que o Consenso pode conferir propriedades de ligação de quitina a uma proteína foi mencionado pela primeira vez por Bouhin et al. (1992) e Charles et al. (1992), e foi repetida frequentemente. Então Rebers e Willis (2001) publicaram um artigo que estabelecia que uma proteína de *An. gambiae*, Agcp2b (agora conhecido como AgamCPR97) ligaria a *beads* de quitina. Mais importante ainda, 65 aminoácidos correspondentes à versão estendida do seu consenso era suficiente para converter a glutathione-S-transferase em uma proteína de ligação a quitina. Está se tornando comum o uso do termo R & R Consenso para esta versão expandida e que a prática é incentivada. Provocativamente, Togawa; Nakato; Izumi (2004), também obtiveram a atividade de ligação a quitina a partir de regiões mais curtas do Consenso estendido e outras regiões da proteína, mas usaram uma baixa concentração de sal no tampão de ligação e a sua ligação teve de glutathione-S-transferase sozinha.

Sabe-se que o consenso R & R das CPRs estão relacionadas à ligação de quitina. Em cérebros de larvas de rainhas L3 identificaram-se genes relacionados a degradação de quitina, as quitinases. Dessa forma, os genes encontrados em cérebros de operárias L3 poderiam atuar de forma contrária aos encontrados em rainhas.

A sequência de aminoácidos preditas referente aos GB54549, super-expressa no cérebro de operárias em relação ao de rainhas em L3 (Fold-change: 9,591) apresenta identidade com a proteína HBG - II de *A. mellifera*, que possui o domínio conservado *Alpha amylase catalytic domain family*.

Alfa-glucosidases pertencem à família hidrolase glicosyl (CE 3.2.1.20, HBGase) e catalisam a hidrólise de terminais não redutores de substratos, tais como açúcares como a sacarose e maltose e outros glicosídeos incluindo fenil  $\alpha$ -glicosídeo, para libertar  $\alpha$ -glicose (TAKEWAKI et al., 1980). Para além de catalisar a clivagem de substratos de resíduos  $\alpha$ -glucosil, HBGase pode também catalisar reações de transglicosilação para sintetizar vários compostos  $\alpha$ -glicosilados (PERUGINO et al., 2004). É ubíqua, e encontra-se em uma grande variedade de organismos, desde micro-organismos a mamíferos superiores. As propriedades enzimáticas de alfa-glicosidases são diferentes, particularmente na especificidade do substrato (CHIBA, 1998).



Com base na sua estrutura primária (sequência de aminoácidos), os membros da família 13 (GH13) têm quatro regiões que são importantes na sua ação catalítica (SVENSSON, 1994; CHIBA, 1997). Em contraste, as enzimas HBGase II não possuem estas quatro regiões e pertencem aos membros da família 31 (GH31) (HENRISSAT, 1991). De acordo com análises cristalográfica de raios-X, as estruturas terciárias de ambas as enzimas HBGase I e II das bactérias *Bacillus cereus* e *Sulfolobus sulphataricus*, respectivamente, têm um ( $\beta / \alpha$ )<sub>8</sub> estrutura de barril como o domínio catalítico mas diferem nas características dos locais ativos envolvidos nas reações catalíticas (WATANABE et al., 1997; ERNST et al., 2006).

Três isoformas de HBGase têm sido relatados em *A. mellifera* (AmHBGase I, II e III), que diferem na sua especificidade para o substrato, em massa, nucleótidos e sequências de aminoácidos predita e de padrões de expressão em diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento do inseto (KUBOTA et al., 2004). Além disso, estes três enzimas mostraram diferentes pHs e temperaturas ótimas para a atividade da enzima, bem como o pH e as estabilidades térmicas, e os substratos preferenciais de açúcar (KIMURA et al., 1990; TAKEWAKI et al., 1993; NISHIMOTO et al., 2001).

HBG - I está localizada no ventrículo. HBG - II está presente no ventrículo e na hemolinfa. HBG - III é secretada a partir da glândula hipofaríngea no néctar e está envolvida na formação do mel (KUBOTA et al., 2004). Apesar das diferenças nas propriedades enzimáticas, as HBGases das abelhas e apresentam considerável similaridade de sequência umas com as outras, HBG-III partilha 57% e 64% de aminoácidos idênticos com HBG-I e-II, respectivamente (OHASHI et al., 1996; NISHIMOTO et al., 2007).

Em um estudo realizado por Kaewmuangmoon et al. (2013) com abelhas *Apis cerana indica* encontrou que a HBG – II desta espécie é muito similar à de *A. mellifera*, sendo o comprimento total do gene *AciHBGase II* de 1740 pb, enquanto o ORF deste gene homólogo em *A. mellifera* de 1743 pb (NISHIMOTO et al., 2007). Este trabalho mostrou que a expressão de *AciHBGase II* foi observada em ovos e um nível de expressão mais elevado foi encontrado em larvas e pupas, mas não nas operárias forrageiras, então *AciHBGase II* não é susceptível de desempenhar um papel na síntese de mel, por meio da hidrólise de sacarose do néctar (KUBOTA et al., 2004). É mais provável que *AciHBGase II* esteja envolvida em outras funções e , possivelmente, com o desenvolvimento desta abelha. Hercovics (1999) relataram que HBGase –I e –II residentes do retículo endoplasmático ( ER ) tiveram uma ação sobre a remoção sequencial do ligação terminal  $\alpha$  - (1, 2) e duas ligações mais internas  $\alpha$  - (1, 3) de resíduos de glicose de glicoproteínas pós- modificadas no ER.

Com base nos achados científicos supracitados HBG – II atua na catalisação da conversão de substratos de açúcares, que é um alimento bastante consumido pelas larvas de abelhas.

A sequência de aminoácidos predita referente aos GB50363, super-expressa no cérebro de operárias em relação ao de rainhas em L3 (Fold-change: 15,063), apresenta identidade com a proteína que possui o domínio conservado *Topoisomerase II-associated protein PAT1*.

A topoisomerase II (*top2*) é um componente importante do arsenal celular que neutraliza ameaças à integridade estrutural dos cromossomos. Mutantes condicionais de levedura perdem a atividade da topoisomerase II em temperatura restritiva morrendo no curso de uma mitose abortiva em que os resultados de quebra cromossômica numa tentativa de segregação cromátides-irmãs que não foram desembaraçadas após a replicação do DNA (UEMURA et al., 1987; HOLM; STEARNS; BOTSTEIN, 1989) Mutantes sem um gene funcional *top2* também não conseguem prosseguir pela meiose, apesar de neste caso as células pararem na fase paquíteno da meiose I, sem perda de viabilidade (ROSE; HOLM, 1993). Além desta função essencial na divisão celular, a topoisomerase II é necessária tanto para a redução do esforço de torção que podem acumular-se durante a transcrição do DNA e a replicação, e para a manutenção da estrutura de loci cromossômicos compreendendo elementos de DNA repetitivos (WATT; HICKSON, 1994). Este último papel é particularmente realçado no caso do tandem repetido no locus do rDNA, que é altamente instável em mutantes *top2* (CHRISTMAN; DIETRICH; FINK, 1988). Esta "supressão" da repetição de DNA por instabilidade da topoisomerase II é, aparentemente, uma função compartilhada com a topoisomerase I, uma vez que a diminuição da função de ambas as classes de topoisomerases provoca um efeito sinérgico na recombinação no locus de rDNA, e leva à excisão de elementos de rDNA em a forma de anéis de DNA extracromossômicos (KIM; WANG, 1989).

Um estudo realizado por (WANG et al., 1996) encontrou a proteína Pat1 como um parceiro celular para a topoisomerase II, devido a sua capacidade de interagir com uma região rica em leucina da topoisomerase II. O grupo mostrou que as cepas que não possuem Pat1 funcional exibem fenótipo semelhante ao de mutantes de topoisomerase II condicional, sobretudo uma redução da viabilidade celular e uma diminuição na fidelidade de segregação dos cromossomos durante a mitose e meiose.

As sequências de aminoácidos preditas referente aos GB43689 e GB43690, super-expressas no cérebro de operárias em relação ao de rainhas em L3 (Fold-change: 121,228 e 22,233, respectivamente), apresentam o domínio conservado *Insect allergen related repeat*.

A família *Insect allergen related repeat* exemplifica um caso de evolução de gene. O caso em questão é o da corrida entre as plantas e os insetos herbívoros infecciosos na área do sistema de glucosinolatos-myrosinase. Brassicas desenvolveram o sistema de glucosinolatos-myrosinase como mecanismo de defesa química contra os insetos e, conseqüentemente, os insetos se adaptaram para produzir uma molécula, a proteína nitrílica especificador desintoxicante (NSP). NSP está presente na pequena borboleta branca *Pieris rapae*. NSP é estruturalmente diferente e não tem nenhuma homologia de aminoácidos de quaisquer enzimas desintoxicantes conhecidos. NSP desarma o sistema de defesa glucosinolatos - myrosinase ativado do Brassicales deslocando a hidrólise de glucosinolatos a nitrilas em vez dos isotiocianatos mais tóxicos (WITTSTOCK et al., 2004).

NSP parece ter surgido por um processo de duplicação de domínio e genes a partir de uma seqüência de função desconhecida que é comum em espécies de insetos. A origem da diversidade genética é conduzida principalmente por duplicação de genes, seja em conjunto ou através de grandes duplicações cromossômicas (FORCE; LYNCH; POSTLETHWAIT, 1999; LYNCH; CONERY, 2000). Embora haja uma elevada taxa de mortalidade de tais duplicatas, genes duplicados também podem sofrer subfuncionalização (especialização de funções existentes) e/ou neofuncionalização (dando origem a novas funções) (SPAETHE; BRISCOE, 2004; HE; ZHANG, 2005; BENDEROTH et al., 2006). Duplicações em tandem interna de exons ou domínios específicos estruturais também podem ocorrer (BJORKLUND; EKMAN; ELOFSSON, 2006). Duplicação de domínio e reorganização pode melhorar as funções existentes, promover a estabilidade da proteína, ou modificar as funções, por exemplo, alterando a especificidade do substrato (PONTING et al., 2001; PEARSON et al., 2004). Assim, esta família é encontrada como um único domínio ou como uma repetição do domínio múltiplo.

A seqüência de aminoácidos predita referente aos GB454419, super-expressa no cérebro de operárias em relação ao de rainhas em L3 (Fold-change: 38,867), apresenta identidade com a proteína short-chain dehydrogenase/reductase de *A. mellifera*. Esta proteína possui o domínio conservado *short chain dehydrogenase*. As sequências de aminoácidos preditas referente aos GB46367 e GB46366, super-expressas no cérebro de operárias em relação ao de rainhas em L3 (Fold-change: 25,178 e 76,270, respectivamente), apresenta identidade com a seguinte proteína 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD<sup>+</sup>]-like de

*A. mellifera*. Esta proteína pertence a família desidrogenases/ redutases de cadeia curta e é uma enzima chave responsável pela inativação biológica de prostaglandinas, bem como os eicosanóides relacionados (KAVANAGH et al., 2008).

Desidrogenases/redutases são enzimas encontradas através de uma vasta gama de organismos, onde eles executam um largo espectro de funções metabólicas. A classificação de curto (SDR), médio (MDR) e desidrogenase de cadeia longa / redutases (LDR) tem sido descrito com base no tamanho molecular, motivos de seqüência, as características mecânicas e análise estrutural (KAVANAGH et al., 2008; PERSSON et al., 2009). Comum a todos os três tipos de oxidoredutases é a ocorrência de um motivo cofactor dinucleótido Rossmann vezes composta por uma, torcido  $\beta$  folhas paralelas centrais que consiste em 6-7  $\beta$ -fios, os quais são flanqueados por 3-4  $\alpha$ -hélices de cada lado (KAVANAGH et al., 2008). As três famílias oxirredutases compartilham a capacidade de interconverter substratos contendo grupos hidroxilo / cetona, mas mostram mecanismos químicos distintos com base em motivos de seqüências distintas e bem definidas organizações de domínios.

A SDR constitui uma das famílias mais antigas e maiores de enzimas, com mais de 46.000 membros em bancos de dados de seqüência. Cerca de 25% de todas as desidrogenases conhecidos pertencem à família SDR. Esta família está presente em archaea, bactérias e Eucariotos, ressaltando sua versatilidade e importância fundamental para os processos metabólicos (KALLBERG; PERSSON, 2006; PERSSON et al., 2009). Enzimas SDRs possuem funções essenciais em lipídios, aminoácidos, carboidratos, hormônios e metabolismo de xenobióticos, bem como nos mecanismos de sensores redox (KAVANAGH et al., 2008). A arquitetura típica SDR apresenta arquitetura de um domínio com 250 aminoácidos e comprimento e sítio de ligação a substrato localizado em uma região carboxi-terminal altamente variável (KAVANAGH et al., 2008) vinculativo.

As SDRs de insetos melhor caracterizadas são as álcool desidrogenases de *Drosophila* (ASHBURNER, 1998; BENACH; ATRIAN; GONZALEZ-DUARTE, 1999). Dois grupos adicionais foram descritos: 1) um conjunto de seis SDRs de *Drosophila* envolvidas no metabolismo do ácido retinóico (BELYAEVA et al., 2009), e 2) *Jingwei*, um gene recentemente evoluído de uma SDR presente apenas em *Drosophila teissieri* e *Drosophila Yakuba*, que é capaz de oxidar etanol e álcoois de cadeia longa, bem como o farnesol e geraniol (ZHANG et al., 2004). Recentemente, Mayoral et al. (2009) descreveram uma SDR dependente de NADP<sup>+</sup> (AaSDR1) que oxida de forma eficiente farnesol em farnesal em corpora allatas do mosquito *Aedes aegypti*. Este achado é interessante já que, fazendo isso, esta enzima, que está envolvida na via de síntese do HJ, pode regular o desenvolvimento pós-

embrionário de abelhas. Mais ainda, variações nos níveis de HJ disponível no cérebro podem participar da regulação do desenvolvimento diferencial deste órgão entre castas.

*Genes não caracterizados.* Algumas das proteínas codificadas pelos GEDs encontrados não são ortólogas a nenhuma proteína conhecida de *D. melanogaster*, e não apresentam domínio conservado de acordo com a ferramenta Pfam (GB55030, GB42626, GB53925, GB41706, GB42900, GB40009, GB41110, GB56000, GB48148, GB43330, GB46366). Outras não têm domínio conservado e possuem a proteína de *D. melanogaster*, porém estas ainda não foram estudadas (GB50009/ CG8369, GB46587/ CG33998). Dessa forma, estes genes não puderam ser estudados pelas abordagens usadas neste projeto, deve-se utilizar outros métodos para caracterizá-los.

### 5.3 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE TRANSCRITOS POR miRNAs DAS GELEIAS

A identificação de mRNAs com sítios alvos para microRNAs é freqüentemente associada com a supressão pós-transcricional destes genes alvo, porém, um crescente corpo de evidências sugere que os microRNAs também pode induzir a regulação positiva de seus alvos (revisada em VASUDEVAN, 2012). Assim, a experimentação direta é necessária, não só para confirmar a capacidade de microRNAs para afetar genes alvos previstos, mas também para verificar os efeitos em condições fisiologicamente relevantes. A previsão deste trabalho identificou diversos mRNA-miRNA que podem participar na diferenciação no desenvolvimento do cérebro entre larvas de rainha e operárias L3.

Os genes da família Osiris não possuem função conhecida ainda em insetos, mas possivelmente são regulados pelos miRNAs presentes nas geléias uma vez que parecem ser alvos de quase todos os miRNAs estudados. Ademais, estes genes estão localizados em regiões bastante próximas no cromossomo 15, o qual sugere que tanto suas transcrições quanto suas traduções podem ser reguladas por fatores muito relacionados.

Dois genes merecem destaque pelas suas funções contrárias: GB50648 (sp25) e GB51989 (domínio conservado Pacifastin inhibitor). Como discutido anteriormente, as serino-proteases, no caso sp25, teriam papel no desenvolvimento do cérebro de rainhas, pois são mais expressos nesta casta. Já os inibidores, neste caso GB51989, poderiam contribuir

para um cérebro menor e menos desenvolvido nas operárias durante as fases iniciais de desenvolvimento, uma vez que são mais expressos em indivíduos desta casta. Assim, além de serem regulados a nível transcricional, os genes diferencialmente transcritos em cérebros L3 poderiam ainda ser regulados pós-transcionalmente e aumentar a diferença de produtos em ambas as castas levando ao desenvolvimento diferencial do cérebro entre elas.

Nos miRNAs das geléias real e de operária são candidatos promissores para futuros estudos, já que teriam a capacidade de regular diretamente o desenvolvimento inicial do cérebro entre as castas de *A. mellifera*, o *ame-miR-210*, o *ame-miR-190* e o *ame-miR-34*, pelo grande número de mRNA como possíveis alvos.

*ame-miR-34*. Um trabalho realizado por Liu et al. (2012) mostrou que o miR -34 é altamente conservado entre as espécies animais. miR-34a de mamíferos é conhecido por inibir a proliferação celular, induzir apoptose e aumentar a diferenciação celular (HERMEKING, 2010). A perda de expressão de miR-34 leva à ocorrência de uma variedade de tumores, incluindo meduloblastoma, cancro do cólon, carcinoma hepatocelular e cancro gástrico. No rato, o miR-34a está implicado na diferenciação de células estaminais neuronais, e a sua expressão ectópica promove a formação de neurônios pós-mitóticos (ARANHA et al., 2011). No peixe-zebra, o padrão espacial de miR-34 mostra sua expressão localizada na parte posterior do cérebro, ao passo que no cérebro de ratos em desenvolvimento e adulto sua expressão é elevada no cerebelo (KAPSIMALI et al., 2007; OLSEN et al., 2009). Assim, especula-se que miR-34 pode influenciar a regulação da tradução de genes durante a neurogênese no embrião. Dessa forma, *ame-miR-34*, presente nas duas geléias, poderia atuar na regulação de genes relacionados à neurogênese entre as castas.

*ame-miR-210*. Um estudo realizado por Grün et al. (2005) mostrou que o miR-210 tem como alvo vários genes ligados à oogênese de *Drosófila*, particularmente relacionados ao desenvolvimento e padronização do oócito e diferenciação das células do folículo somático que rodeiam a câmara de ovo em desenvolvimento. No entanto, muitos destes alvos potenciais não são restritos à oogênese, mas também funcionam em outros momentos e locais, incluindo o olho, sistema nervoso, e epitélios (GRÜ et al., 2005). Assim, este miRNA pode desempenhar papéis pleiotrópicos em redes mais complexas de desenvolvimento como o sistema nervoso.

*ame-miR-190*. Hung et al., (2014) mostraram que miR-190b tem como alvo direto a região 3' UTR da IGF-1 em humanos, resultando em problemas na via de sinalização da insulina e na gliconeogênese. Estes resultados sugerem um novo mecanismo para o desenvolvimento de resistência à insulina, em carcinoma hepatocelular, fornecendo a primeira

evidência de que o miR-190b medeia a repressão da expressão de IGF-1. A via insulina/IGF conecta o alimento recebido e a produção de hormônios responsáveis pelo desenvolvimento das abelhas. Uma regulação por miRNAs auxiliaria na produção de títulos diferenciais entre as castas que levaria ao desenvolvimento de características específicas de cada casta, entre estas o cérebro.

A composição de miRNAs das geléias é diferente uma da outra, havendo miRNAs em comum, porém em quantidades diferentes. Sendo assim, a regulação por miRNAs nas duas castas pode ocorrer de maneira diferente, havendo silenciamento de um determinado gene em uma casta e não na outra. Esse fato gera diversas possibilidades na quantidade final de produto de um determinado gene. Uma possibilidade é que apesar da expressão de um gene ser diferente entre as castas, com a regulação pós-transcricional por miRNA a quantidade de proteína traduzida pode se igualar e não causar efeitos diferentes entre as castas. Outra possibilidade é que um gene que já apresenta expressão diferencial, com a regulação pós-transcricional essa diferença aumenta e há efeitos diferentes entre as castas, e chegue até ao silenciamento de um gene em uma delas. Uma terceira possibilidade é que genes que apresentam expressão igual entre as castas, com a regulação pós-transcricional a quantidade de produto final passa a ser diferencial entre as castas, e o gene apresente efeitos diferentes entre as castas. Assim, nosso trabalho mostra que a regulação pós-transcricional mediante microRNAs pode representar um fator determinante no processo de desenvolvimento diferencial do cérebro entre castas, como demonstrado por Guo et al. (2013) para outras características fenotípicas.

Os seguintes passos irão no caminho de validar GDEs e realizar estudos funcionais que permitam determinar os alcances da participação dos poli-A<sup>+</sup> e dos miRNAs na morfogênese diferencial inicial do cérebro larval entre as castas de *A. mellifera*.

## 6 CONCLUSÃO

Os cérebros de rainhas e operárias são morfológica e molecularmente diferentes em L4 (MODA et al., 2013). Considerando os resultados de sequenciamento de poli-A+, com 60 genes diferencialmente transcritos, pudemos mostrar que o difenismo cerebral entre castas em *A. mellifera* já existe em L3 (o qual é compatível com o sugerido por LEIMAR et al., 2012 e os achados de CAMERON; DUNCAN; DEARDEN, 2013). Desses 60 GDEs, 12 estão concentrados numa região do cromossomo 15, o qual sugere co-regulação. 21 dos 60 GDEs possuem ortólogos em *Drosophila*, e os produtos de seis transcritos sobre-expressos em rainhas estão sabidamente associados com atividade neuronal: aromatic-L-amino-acid decarboxylase-like (AADC, GB45938), Spatzle - 2 (Spz - 2, GB40604), serina protease 25 (SP25, GB50648), serina protease 33 (SP33, GB50650), serina protease homólogo 41 (SPH41, GB49946), apolipoproteína D -like (APOD, GB50875). Entre os 60 DGEs, 31 foram encontrados sobre-expressos em cérebro de operárias L3, e sete deles estão envolvidos na inibição de proteínas que promovem desenvolvimento cerebral ou são importantes para o desenvolvimento de características importantes desta casta: chymotrypsin inhibitor-like (GB50116), chymotrypsin inhibitor (Amci, GB50121), GB51989 (que possui domínio conservado *pacifastin*), hexamerin 110 (hex-110, GB44996), hexamerin 70c precursor (hex-70c, GB51696), hexamerin 70b precursor (70b, GB51697) e citocromo P450 9Q1 (Cyp9q1, GB43713). Como os miRNAs presentes nas geléias real e de operária possuem alvos nos GDEs, o difenismo cerebral observado claramente a partir de L3 pode dever-se a um complexo sistema de regulação que inclua transcrição diferencial seguida de regulação traducional por microRNAs.



## REFERÊNCIAS

- AIRHART, M. J. et al. Adverse effects of serotonin depletion in developing zebrafish. **Neurotoxicol Teratol**, v. 34, p. 152-160, 2012.
- AKHMANOVA, A.; STEARNS, T. Cell architecture: putting the building blocks together. **Curr Opin Cell Biol**, v. 25, p. 3-5, 2013.
- AKHTAR, R. A. et al. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. **Curr Biol**, v. 12, p. 540–550, 2002.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, p. 350–355, 2004.
- ANDERSON, G. J.; CONNOR, W.E.; CORLISS, J.D. Docosahexaenoic acid is the preferred dietary n-3 fatty acid for the development of the brain and retina. **Pediatr Res**, v. 27, n. 1, p. 89-97, 1999.
- ANTONIALLI, W. F.; CRUZ-LANDIM, C. Effect of topic application of juvenile hormone on the ovarian development of worker larvae of *Apis mellifera Linnaeus* (Hymenoptera, Apidae). **Rev Bras Entomol**, v. 53, p. 115–120, 2009.
- ARAKI, K. Y.; SIMS, J. R.; BHIDE, P. G. Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre- and postnatal development. **Brain Res**, v. 1156, p. 31-45, 2007.
- ARANCIO, O.; CHAO, M. Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. **Curr Opin Neurobiol**, v. 17, p. 325–330, 2007.
- ARANHA, M. M. et al. miR-34a regulates mouse neural stem cell differentiation. **PLoS ONE**, v. 6, p. e21396, 2011.
- ARROYO-BEGOVICH, A.; CARABEZ-TREJO, A.; RUIZ-HERRERA, J. Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. **J Parasitol**, v. 66, p. 735-741, 1980.
- ASENCOT, M.; LENSKEY, Y. The effect of soluble sugars in stored royal jelly on the differentiation of female honeybee (*Apis mellifera L.*) larvae to queens. **Insect Biochem**, v. 18, p. 127-133, 1988.

ASHBURNER, M. Speculations on the subject of alcohol dehydrogenase and its properties in *Drosophila* and other flies. **BioEssays**, v. 20, p. 949–954, 1998.

ASHBURNER, M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nature genetics**, v. 25, p. 25-29, 2000.

BAIER, H.; BONHOEFFER, F. Attractive axon guidance molecules. **Science**, v.265, n. 5178, p. 1541-1542, 1994.

BAIRD, J. L.; RAPER, J. A. A serine proteinase involved in contact mediated repulsion of retinal growth cones by DRG neurites. **J Neurosci**, v. 15, n. 10, p. 6605-6618, 1995.

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

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, p. 281–297, 2004.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, p. 215–233, 2009.

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

BELTZ, B. S. et al. Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis. **Neurosci Lett**, v. 26, p. 154-158, 2007.

BELYAEVA, O. V. et al. Identification and Characterization of Retinoid-Active Short-Chain Dehydrogenases/Reductases in *Drosophila melanogaster*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, p. 1266–1273, 2009.

BENACH, J.; ATRIAN, S.; GONZALEZ-DUARTE, R. The catalytic reaction and inhibition mechanism of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: observation of an enzyme-bound NAD-ketone adduct at 1.4 resolution by X-ray crystallography. **J Mol Biol**, v. 289, p. 335–355, 1999.

BENDEROTH, M. et al. Positive selection driving diversification in plant secondary metabolism. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, p. 9118–9123, 2006.

BENITEZ, A. L. G. A. Dietas protéicas sobre a produção de Geleia. 140 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Júlio Mesquita, Jaboticabal, 2000.

BERG, J. M. et al. Biochemistry. 5<sup>a</sup> ed. Nova York: W. H. Freeman. 2002.

BERTRAND, P. C.; O'KUSKY, J. R.; INNIS, S. M. Maternal dietary (n-3) fatty acid deficiency alters neurogenesis in the embryonic rat brain. **J Nutr**, v. 136, p. 1570-1575, 2006.

BITONDI, M. M. et al. Characterization and expression of the Hex110 gene encoding a glutamine-rich hexamerin in the honey bee, *Apis mellifera*. **Arc Insect Biochem Physiol**, v. 63, p. 57-72, 2006.

BJORKLUND, A. K.; EKMAN, D.; ELOFSSON, A. Expansion of protein domain repeats. **PLoS Comput Biol**, v. 2, p. 959-970, 2006.

BLABER, S. I. et al. Targeting kallikrein 6 proteolysis attenuates CNS inflammatory disease. **FASEB J**, v. 18, p. 920-922, 2004.

BLASING, O. E. et al. Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 17, p. 3257-3281, 2005.

BLOCH, G. Plasticity in the circadian clock and the temporal organization of insect societies. In: Gadau, J.; Fewell, J.; Wilson, E.O., editors. Organization of insect societies: from genome to sociocomplexity. Cambridge, Mass: Harvard University Press; 2009.

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

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

BOGWITZ, M. R. et al. Cyp12a4 confers lufenuron resistance in a natural population of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, p. 12807-12812, 2005.

BOLELI, I. C.; SIMÕES, Z. L. P.; HARTFELDER, K. The stomotogastric nervous system of the honeybee (*Apis mellifera*) in a critical phase of caste development. **J Morphol**, v. 236, p. 139-149, 1998.

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

BONNET, E. et al. Retinoic Acid Restores Adult Hippocampal Neurogenesis and Reverses Spatial Memory Deficit in Vitamin A Deprived Rats. **PLoS ONE**, v. 3, p. e3487, 2008.

BOUHIN, H. et al. Developmental profiles of epidermal mRNAs during the pupal-adult molt of *Tenebrio molitor* and isolation of a cDNA clone encoding an adult cuticular protein: effects of a juvenile hormone analogue. **Dev Biol**, v. 149, p. 112e122, 1992.

BOWLES, J. et al. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. **Science**, v. 312, p. 596–600, 2006.

BOYLES, J. K.; NOTTERPEK, L. M.; ANDERSON, L. J. Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. **J. Biol. Chem**, v. 265, p. 17805–17815, 1990.

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

BREMNER, J.D., MCCAFFERY, P. The neurobiology of retinoic acid in affective disorders. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, p. 315–331, 2008.

BRUN, L. et al. Clinical and biochemical features of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. **Neurology**, v. 75, p. 64-71, 2010.

BRUUSGAARD, J. C. et al. Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied in vivo. **J Physiol**, v. 551, p. 467-478, 2003.

BRYDON, L. J. et al., 1987. Chitin in egg shells of *Onchocerca gibsoni* and *Onchocerca volvulus*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 25, n. 3, p. 267-72, 1987.

BURMESTER, T.; SCHELLER, K. Ecdysterone-mediated uptake of arylphorin by larval fat bodies of *Calliphora vicina*: involvement and developmental regulation of arylphorin binding proteins. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 25, p. 799-806, 1995.

BUTTSTEDT, A.; MORITZ, R. F. A.; ERLER, S. More than royal food - Major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee *Apis mellifera*. **Frontiers in Zoology**, v. 10, p. 72, 2013.

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

CASTELLANI, R. J. et al. Chitin-like polysaccharides in Alzheimer's disease brains. **Curr Alzheimer Res**, v. 2, p. 419–423, 2005.

CASTELLANI, R. J.; PERRY, G.; SMITH, M. A. 2007. The role of novel chitin-like polysaccharides in Alzheimer disease. **Neurotox Res**, v. 12, n. 4, p. 269–274, 2007.

CAYRE, M. et al. Understanding the regulation and function of adult neurogenesis: contribution from an insect model, the house cricket. **Chem Senses**, v. 32, p. 385–395, 2007.

CHAPOUTON, P.; JAGASIA, R.; BALLY-CUIF, L. Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. **Bioessays**, v. 29, p. 745–757, 2007.

CHARLES, J.P. et al. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of a major, glycine-rich cuticular protein from the coleopteran *Tenebrio molitor*. Temporal and spatial distribution of the transcript during metamorphosis. **Eur J Biochem**, v. 206, p. 813–819, 1992.

CHAVEZ, V. M. et al. The *Drosophila* disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. **Development**, v. 127, p. 4115–4126, 2000.

CHEN, J. S.; BERENBAUM, M. R.; SCHULER, M. A. Amino acids in SRS1 and SRS6 are critical for furanocoumarin metabolism by CYP6B1v1, a cytochrome P450 monooxygenase. **Insect Mol Biol**, v. 11, n. 2, p. 175–86, 2002.

CHEN, Y. L.; HUNG, Y. S.; YANG, E. C. Biogenic amine levels change in the brains of stressed honeybees. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 68, p. 241–250, 2008.

CHEN, Z-Y. et al. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. **Science**, v. 314, p. 140–143, 2006.

CHIBA, S. “Handbook of Amylases and Related Enzymes,” ed. The Amylase Research Society of Japan, Pergamon Press, Oxford, pp. 104–116, 1998.

CHIBA, S. Molecular mechanism in  $\alpha$  – glucosidase and glucoamylase. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 61, p. 1233–1239, 1997.

- CHITTKA, L.; NIVEN, J. Are bigger brains better? **Curr Biol**, v. 19, p. R995-R1008, 2009.
- CHRISTMAN, M. F.; DIETRICH, F. S.; FINK, G. R. Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerases I and II. **Cell**, v. 55, n. 3, p. 413-425, 1988.
- CIERPICKI, T.; BANIA, J.; OTLEWSKI, J. NMR solution structure of *Apis mellifera* chymo-trypsin/cathepsin G inhibitor-1 (AMCI-1): Structural similarity with *Ascaris* protease inhibitors. **Protein Sci.** v. 9, p. 976–984, 2000.
- CLARK, R. A. Peroxidases: A historical overview of Milestones in Research on Myeloperoxidase. In The peroxidase multigene family of enzymes: biochemical basis and clinical applications Edited by: Petrides, P.E., Nauseef WM. Heidelberg, Springer-Verlag; p. 1-10, 2000.
- CLAUDIANOS, C. et al. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Mol Biol**, v. 15, p. 615–636, 2006.
- CORNMAN, R. S.; LOPEZ, D.; EVANS, J. D. Transcriptional response of honey bee larvae infected with the bacterial pathogen *Paenibacillus* larvae. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e65424, 2013.
- COTTRELL, G. S. et al. Trypsin IV: A novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. **J Biol Chem**, v. 279, p. 13532–13539, 2004.
- CRANDALL, J. E. et al. Dopamine receptor activation modulates GABA neuron migration from the basal forebrain to the cerebral cortex. **J Neurosci Off J Soc Neurosci**, v. 27, p. 3813-3822, 2007.
- CUNHA, A. D. et al. Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera*. **J Insect Physiol**, v. 51, p. 1135-1147, 2005.
- DABORN, P. J. et al. A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. **Science**, v. 297, p. 2253–2256, 2002.
- DAVIES, A. M. Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. **EMBO J**, v. 22, p. 2537–2545, 2003.

DAVIS, R.L. Mushroom bodies, Ca<sup>2+</sup> oscillations, and the memory gene *amnesiac*. **Neuron**, v. 30, p. 653-656, 2001.

DEWHURST, S. A., et al. Metabolism of biogenic amines in *Drosophila* nervous tissue. **Comp Biochem Physiol**, v. 43B, p. 975–981, 1972.

DI CERA, E. Serine proteases. **IUBMB Life**, v. 61, p. 510–5, 2009.

DIERICK, H. A.; GREENSPAN, R. J. Molecular analysis of flies selected for aggressive behavior. **Nat Genet**, v. 38, p. 1023–1031, 2006.

DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S. D. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. **J Lipid Res**, v. 45, p. 1375–1397, 2004.

DO CARMO, S.; LEVROS, L. C. JR.; RASSART, E. Modulation of apolipoprotein D expression and translocation under specific stress conditions. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, p. 954-969, 2007.

DOBBING, J.; HOPEWELL, J. W. Permanent deficit of neurones in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition. **Arch Dis Child**, v. 46, p. 736-737, 1971.

DOHERTY, C. J.; KAY, S. A. Circadian control of global gene expression patterns. **Annu Rev Genet**, v. 44, p. 419–444, 2010.

DOLINOY, D.C.; WEIDMAN, J.R.; JIRTLE, R.L. Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. **Reprod Toxicol.**, v. 23, p. 297-307, 2007.

DORER, D. R. et al. A family of genes clustered at the Triplo-lethal locus of *Drosophila melanogaster* has an unusual evolutionary history and significant synteny with *Anopheles gambiae*. **Genetics**, v. 165, n. 2, p. 613-21, 2003.

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

DUNFORD, H. B. Heme Peroxidases. New York , John Wiley and Sons Inc; 1999.

DURST, C.; EICHMULLER, S.; MENZEL, R. Development and experience lead to increased volume of subcompartments of the honeybee mushroom body. **Behav Neural Biol**, v. 62, p. 259-263, 1994.

ENGLANDER, L. L.; RUBIN, L. L. Acetylcholine receptor clustering and nuclear movement in muscle fibers in culture. **J Cell Biol**, v. 104, p. 87-95, 1987.

ERIKSSON, P.S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat Med**, v. 4, p. 1313-1317, 1998.

ERNST, H. A. et al. Structure of the *Sulfolobus solfataricus*  $\alpha$  – glucosidase: implications for domain conservation and substrate recognition in GH31. **J Mol Biol**, v. 358, p. 1106–1124, 2006.

EVANS, J. E.; WHEELER, D. E. Expression profiles during honeybee caste determination. **Genome Biol**, v. 2, p. 1, 2001.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res**, v. 8, p. 175-85, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**, v. 8(3), p. 186-194, 1998.

FAHRBACH, S. E. et al. Experience-expectant plasticity in the mushroom bodies of the honey bee. **Learn Mem**, v. 5, p. 115-123, 1998.

FAHRBACH, S. E.; STRANDE, J. L.; ROBINSON, G. E. Neurogenesis is absent in the brains of adult honey bees and does not explain behavioural neuroplasticity. **Neurosci Lett**, v. 197, p. 145-148, 1995.

FANG, Y.; FENG, M.; LI, J.K. Royal jelly proteome comparison between *A. mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*. **J Proteome Res**, v. 9, p. 2207–2215, 2010.

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

FARRIS, S. M.; ROBINSON, G. E.; FAHRBACH, S.E. Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. **J Neurosci**, v. 21, p. 6395-6404, 2001.



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

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

FERNANDES, I. et al. Zona pellucida domain proteins remodel the apical compartment for localized cell shape changes. **Developmental Cell**, v. 18, p. 64–76, 2010.

FEYEREISEN, R. Insect Cytochrome. *Comprehensive Molecular Insect Science*, eds Gilbert LI, Latrou K, Gill SS (Elsevier, Oxford), Vol 4, p 450, 2005.

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

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res**, v. 38, p. D211–D222, 2010.

FISCHER, J. A. et al. *Drosophila* klarsicht has distinct subcellular localization domains for nuclear envelope and microtubule localization in the eye. **Genetics**, v. 168, p. 1385-1393, 2004.

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

FLOWER, D. R.; NORTH, A. C.; SANSOM, C. E. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. **Biochim Biophys Acta**, v. 1482, p. 9-24, 2000.

FORCE, A.; LYNCH, M.; POSTLETHWAIT, J. Preservation of duplicate genes by subfunctionalization. **Genetics**, v. 151, p. 1531–1545, 1999.

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

FUJII, S.; TOYAMA, A.; AMREIN, H. A male-specific fatty acid {omega}-hydroxylase, *SXE1*, is necessary for efficient male mating in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 180, p. 179–190, 2008.

FUKUDA, M. T. H.; FRANÇOLIN-SILVA, A. L.; ALMEIDA, S. S. Early postnatal protein mal nutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. **Behav Brain Res**, v. 133, p. 271-277, 2002.

FURTMULLER, P. G. et al. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. **Arch biochem biophys**, v. 445, n. 2, p. 199-213, 2006.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, p. 1433-1438, 2000.

GANESHINA, O.; SCHÄFER, 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.

GARRITY, P. A.; ZIPURSKY, S. L. Neuronal target recognition. **Cell**, v. 83, n. 2, p. 177-185, 1995.

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

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

GETCHELL, T. V. et al. Temporal profiling of gene expression during neurogenesis and remodeling in the olfactory epithelium at short intervals after target ablation. **J Neurosci Res**, v. 80, p. 309-329, 2005.

GEYFMAN, M.; ANDERSEN, B. How the skin can tell time. **J Invest Dermatol**, v. 129, p. 1063-1066, 2009.

GILBERT, L. I. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. **Mol Cell Endocrinol**, v. 215, p. 1-10, 2004.

GILBERT, M. D.; WILKINSON, C. F. An inhibitor of microsomal oxidation from gut tissues of the honey bee (*Apis mellifera*). **Comp Biochem Physiol B**, v. 50, p. 613-619, 1975.

GILLAM, E. M. J.; HUNTER, D. J. B. Chemical defense and exploitation. Biotransformation of xenobiotics by cytochrome P450 enzymes. in *Metal Ions in Life Sciences*, Vol. 3: The Ubiquitous Roles of Cytochrome P450 Proteins, Sigel A, Sigel H, Sigel RKO eds (John Wiley & Sons Ltd., England), pp 477-560, 2007.

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

GLOVER, C. N. et al. Methylmercury Speciation Influences Brain Gene Expression and Behavior in Gestationally-Exposed Mice Pups. **Toxicol Sci**, v. 110, p. 389-400, 2009.

GOODMAN, A. B. Retinoid receptors, transporters, and metabolizers as therapeutic targets in late onset Alzheimer disease. **J Cell Physiol**, v. 209, p. 598–603, 2006.

GRADY, R. M. et al. Syne proteins anchor muscle nuclei at the neuromuscular junction. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, p. 4359-4364, 2005.

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.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes. **Nucleic Acids Res**, v. 33, p. D121–D124, 2005.

GRÜN, D. et al. microRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets. **PLoS Comp Biol**, v. 1, n. 1, p. e13, 2005.

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.

GUENGERICH, F. P. Cytochromes P450, drugs, and diseases. **Mol Interv**, v. 3, p. 194–204, 2003.

GUENGERICH, F. P. Human cytochrome P450 enzymes. in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3rd ed. Ortiz de Montellano PR ed (Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York), pp 377–530, 2005.

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

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

HAKKI, T.; BERNHARDT, R. CYP17- and CYP11B-dependent steroid hydroxylases as drug development targets. **Pharmacol Ther**, v. 111, p. 27–52, 2006.

HANNEMANN, F. et al. Cytochrome P450 systems–biological variations of electron transport chains. **Biochim Biophys Acta**, v. 1770, p. 330–344, 2007.

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honey bee. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 40, p. 45-77, 1998.

HASHIMOTO, M. et al. Oral administration of royal jelly facilitates mRNA expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurofilament H in the hippocampus of the adult mouse brain. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 69, p. 800-805, 2005.

HASTINGS, M. H.; REDDY, A. B.; MAYWOOD, E. S. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, p. 649–661, 2003.

HATTORI, N., et al. Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells *in vitro*. **Biomed. Res.**, v. 28, p. 261-266, 2007.

HAYDAK, M. H. Honey bee nutrition. **Annu Rev Entomol**, v. 15, p. 143–156, 1970.

HAYTON, S.M., MULLER, D.P. Vitamin E in neural and visual function. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1031, p. 263-270, 2004.

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

HE, X. L.; ZHANG, J. Z. Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. **Genetics**, v. 169, p. 1157–1164, 2005.

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

HELVIG, C. et al. CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach corpora allata. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, p. 4024–4029, 2004.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **Biochem J**, v.280, p. 309–316, 1991.

HENRISSAT, B.; BAIROACH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochem J**, v. 316, p. 695–696, 1993.

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

HERSCOVICS, A. Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1473, p. 96–107, 1999.

HERZ, J.; CHEN, Y. Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, p. 850–859, 2006.

HOLLINGSWORTH, M. A.; SWANSON, B. J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 45–60, 2004.

HOLM, C.; STEARNS, T.; BOTSTEIN, D. DNA topoisomerase II must act at mitosis to prevent nondisjunction and chromosome breakage. **Mol Cell Biol**, v. 9, n. 1, p. 159–68, 1989.

HONEY BEE GENOME CONSORTIUM. Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera*. **Nature**, v. 443, p. 931–949, 2006.

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

HUBER, R. Amines and motivated behaviors: a simpler systems approach to complex behavioral phenomena. **J Comp Physiol A**, v. 91, p. 231–239, 2005.

HUNG, T. et al. Up-regulation of microRNA-190b plays a role for decreased igf-1 that induces insulin resistance in human hepatocellular carcinoma. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89446, 2014.

HUNT, J. H. et al. A diapause pathway underlies the gyne phenotype in *Polistes* wasps, revealing an evolutionary route to caste-containing insect societies. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 14020–14025, 2007.

HWANG, S. J. et al. cDNA sequence and gene expression of storage protein 2 – a juvenile hormone-suppressible hexamerin from the fall webworm, *Hyphantria cunea* Drury. **Comp Biochem Physiol B**, v. 129, p. 97–107, 2001.

HYLAND, S. et al. Cortical Gene Expression in the Vitamin E-Deficient Rat: Possible Mechanisms for the Electrophysiological Abnormalities of Visual and Neural Function. **Ann Nutr Metab**, v. 50, p. 433-441, 2006.

IJIMA, N. et al. Expression of a serine protease (motopsin PRSS12) mRNA in the mouse brain: In situ hybridization histochemical study. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 66, p. 141–149, 1999.

INNIS, S.M. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. **J Nutr**, v. 137, p. 855-859, 2007.

INNIS, S.M. Perinatal biochemistry and physiology of long chain polyunsaturated fatty acids. **J Pediatr**, v. 143, p. 1–8, 2003.

INOUE, K. Carotenoid hydroxylation–P450 finally! **Trends Plants Sci**, v. 9, p. 515–517, 2004.

ISIN, E. M.; GUENGERICH, F. P. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1770, p. 314–329, 2007.

JAMROZ, R.C. et al. Aromatic hexamerin subunit from adult female cockroaches (*Blaberus discoidalis*): molecular cloning, suppression by juvenile hormone, and evolutionary perspectives. **J Insect Physiol**, v. 42, p. 115–124, 1996.

JOHNSON, R. M. et al. Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. **J Econ Entomol**, v. 99, p. 1046–1050, 2006.

JOHNSON, R. M.; POLLOCK, H. S.; BERENBAUM, M. R. Synergistic interactions between hive miticides in *Apis mellifera*. **J Econ Entomol**, v. 102, p. 474–479, 2009.

KAEWUANGMOON, J. et al. Expression of a secretory  $\alpha$ -glucosidase II from *Apis cerana indica* in *Pichia pastoris* and its characterization. **BMC Biotechnology**, v. 13, p. 16, 2013.

KALLBERG, Y.; PERSSON, B. Prediction of coenzyme specificity in dehydrogenases/reductases: a hidden Markov model-based method and its application on complete genomes. **FEBS J**, v. 273, p. 1177–1184, 2006.

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

KANDEL, E.R. **In search of memory**. Nova York: W.W. Norton & Co., 2006, 216p.

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

KAVANAGH, K. L. et al. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, p. 3895–3906, 2008.

KEMPERMANN, G. et al. Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103 p. 780-785, 2006.

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

KHAJURIA, C. et al. A gut-specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 40, p. 621–629, 2010.

KIM, R. A.; WANG, J. C. Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Mol Biol**, v. 208, n. 2, p. 257-67, 1989.

KIMURA, A. et al. Allosteric properties, substrate specificity, and subsite affinities of honeybee  $\alpha$  - glucosidase I. **J Biochem**, v. 107, p. 762–768, 1990.

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

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase. **Proc Assoc of Am Physicians**, v. 111, n. 5, p. 383-389, 1999.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. **Science**, v. 169, n. 950, New York, NY, p. 1095-1097, 1970.

KOSACKA, J. et al. Apolipoproteins D and E3 exert neurotrophic and synaptogenic effects in dorsal root ganglion cell cultures. **Neuroscience**, v. 162, p. 282-291, 2009.

KOZOROVITSKIY, Y.; GOULD, E. Dominance hierarchy influences adult neurogenesis in the dentate gyrus. **J Neurosci**, v. 24, p. 6755-6759, 2004.

KRAMER, K. J.; KOGA, D. Insect chitin: physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. **Insect Biochem**, v. 16, p. 851–877, 1986.

KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Chitin metabolism in insects. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 4. Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier Press, Oxford, UK, pp. 111–144 (Chapter 3), 2005.

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

KUBOTA, M. et al. Localization of  $\alpha$  – glucosidase I, II and III in organs of European honeybees, *Apis mellifera L.*, and the origin of  $\alpha$ -glucosidase in honey. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 68, p. 2346–2352, 2004.

KUCHARSKI, R. et al. A royal jelly protein is expressed in a subset of kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee brain. *Naturwissenschaften*, v. 85, n. 7, p. 343-346, 1998.

KUMARAN, A. K. et al. Effects of juvenile hormone, ecdysteroids and nutrition on larval hemolymph protein gene expression in *Galleria mellonella*. **Insect Biochem**, v. 17, p. 1053–1058, 1987.

KUROTAKI, Y. et al Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. **Science**, v. 316, p. 719–723, 2007.

LANARI, A., et al. Neurotransmitter deficits in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease. **Mech Ageing Dev**, v. 127, p. 158–165, 2006.

LANGE, A. B. Tyramine: from octopamine precursor to neuroactive chemical in insects. **Gen Comp Endocrinol**, v. 162, p. 18–26, 2009.



LANGER, R.C. et al. Monoclonal antibody against the Plasmodium falciparum chitinase, PfCHT1, recognizes a malaria transmission-blocking epitope in *Plasmodium gallinaceum* ookinetes unrelated to the chitinase PgCHT1. **Infect Immun**, v. 70, p. 1581–1590, 2002.

LANGMEAD, B., SALZBERG, S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, p. 357-359, 2012.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacol & ther**, v. 111, n. 1, p. 16-26, 2006.

LE GOFF, G. et al. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex dependence of P450 and GST gene induction. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 36, n. 8, p. 674–682, 2006.

LECUIT, T.; LENNE, P. F. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, p. 633–644, 2007.

LEE, A. K. et al. Effect of high-fat feeding on expression of genes controlling availability of dopamine in mouse hypothalamus. **Nutrition**, v. 26, p. 411-422, 2010.

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

LEE, R. C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, p. 843–854, 1993.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Ann Rev Entomol**, v. 42, p. 525–550, 1997.

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

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

LEWIS D. F. 57 varieties: the human cytochromes P450. **Pharmacogenomics** 5:305–318, 2004.

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

LI, A. et al. Bietti crystalline corneoretinal dystrophy is caused by mutations in the novel gene CYP4V2. **Am J Hum Genet**, v. 74, p. 817–826, 2004.

LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annu Rev Entomol**, v. 52, p. 231–253, 2007.

LIBERSAT, F.; PFLUEGER, H. J. Monoamines and the orchestration of behavior. **Bioscience**, v. 54, p. 17–25, 2004.

LIEBERWIRTH, C.; WANG, Z. The social environment and neurogenesis in the adult Mammalian brain. **Front Hum Neurosci**, v. 6, p. 1–19, 2012.

LINDSLEY, D. L. et al. Segmental aneuploidy and the genetic gross structure of the *Drosophila* genome. **Genetics**, v. 71, p. 157–184, 1972.

LINKSVAYER, T. A., J. H. et al. Developmental evolution in social insects: regulatory networks from genes to societies. **J Exp Zool B Mol Dev Evol**, v. 318, p. 159–169, 2012.

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

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

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

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

LOUA, S.J. et al. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. **Brain Res**, v. 1210, p. 48–55, 2008.

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

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.

LYNCH, M.; CONERY, J. S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. **Science**, v. 290, p. 1151–1155, 2000.

MAESTRO, J. L.; COBO, J.; BELLÉS, X. Target of rapamycin (TOR) mediates the transduction of nutritional signals into juvenile hormone production. **J Biol Chem**, v.284, n. 9, p. 5506-5513, 2009.

MAGKRIOTI, C. K. et al. cuticleDB: a relational database of Arthropod cuticular proteins. **BMC Bioinformatics**, v. 5, p. 138–143, 2004.

MALONE, C. J. et al. The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. **Cell**, v. 115, p. 825-836, 2003.

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

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

MANEGOLD, C. et al. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, drug therapy and follow-up. **J Inherit Metab Dis**, v. 32, p. 371-380, 2009.

MAO, W. et al. Quercetin-metabolizing CYP6AS enzymes of the pollinator *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol**, v. 154, n. 4, p. 427–434, 2009.

MAO, W.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). **PNAS**, v. 108, n. 31, p. 12657–12662, 2011.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Res**, v. 39, p. 225-234, 2011.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. **Nucleic Acids Res**, 37, p. 205-235, 2009.

MARCHLER-BAUER, A.; BRYANT, S. H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Res**, v. 32, p. 327-331, 2004.

MARTINEZ, M. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids in early human development. **J Pediatr**, v. 38, p. 120-129, 1992.

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

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

MATEOS, R. et al. Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein in Rodent Brain is Down-Regulated by High Fat Diet in vivo and by 27-Hydroxycholesterol in vitro. **Brain Pathol**, v. 19, p. 69-80, 2009.

MATOS, R. J. B. et. al. Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells. **Neuroscience**, v. 196, p. 16-24, 2011.

MATSUMURA, Y. et al. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I receptor mRNA levels in growing chickens. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 60, p. 979-982, 1996.

MAYORAL, J. G. et al. NADP<sup>+</sup>-dependent farnesol dehydrogenase, a corpora allata enzyme involved in juvenile hormone synthesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 106, p. 21091–21096, 2009.

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

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

MELLMAN, I.; NELSON, W. J. Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, p. 833–845, 2008.

MEMMEL, N. A. et al. Nucleotide sequence, structure and developmental regulation of LHP82, a juvenile hormonesuppressible hexamerin gene from the waxmoth, *Galleria mellonella*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 24, p. 133–144, 1994.

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

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

METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nat Rev Genet**, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

MOLINARI, F. et al. Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. **Science**, v. 298, p. 1779–1781, 2002.

MOLTENI, R.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. **Eur J Neurosci**, v. 16, p. 1107–1116, 2002.

MORAIS CABRAL, J. H. et al. Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function. **FEBS Lett**, v. 366, p. 53–56, 1995.

MORRIS, N. R. Nuclear positioning: the means is at the ends. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, p. 54-59, 2003.

MORTAZAVI, A. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, p. 621-628, 2008.

MOSLEY-BISHOP, K. L. et al. Molecular analysis of the klarsicht gene and its role in nuclear migration within differentiating cells of the *Drosophila* eye. **Curr Biol**, v. 9, p. 1211-1220, 1999.

MUFFAT, J.; WALKER, D.; BENZER, S. Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*. **PNAS**, v. 105.p. 7088–7093, 2008.

MUNOZ-TORRES, M. C. et al. Hymenoptera Genome Database: integrated community resources for insect species of the order Hymenoptera. **Nucleic Acids Res.**, p. D658-62, 2010.

MUOTRI, A.R. et al. Environmental Influence on L1 Retrotransposons in the Adult Hippocampus. **Hippocampus**, v. 19, p. 1002-1007, 2009.

MURUGASU-OEI, B. et al. Masquerade: a novel secreted serine protease-like molecule is required for somatic muscle attachment in the *Drosophila* embryo. **Genes Dev**, v. 9, n. 2, p. 139-154, 1995.

MURUGASU-OEI, B. et al. 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.

NAKAMURA, Y. et al. Role of neuropsin in formation and maturation of Schaffer-collateral L1cam-immunoreactive synaptic boutons. **J Cell Sci**, v. 119, p. 1341–1349, 2006.

NATION, J.L. *Insect Physiology and Biochemistry*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2008.

NAVARRO, A. et al. Lifelong Expression of Apolipoprotein D in the Human Brainstem: Correlation with Reduced Age-Related Neurodegeneration. **PloS ONE**, v. 8, p. e77852, 2013.

NEBERT, D. W.; RUSSELL, D. W. Clinical importance of the cytochromes P450. **Lancet**, v. 360, p. 1155–1162, 2002.

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

NICHOLS, C. D. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. **Pharmacol Ther**, v. 112, p. 677–700, 2006.

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

NILSSON, M. et al. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. **J Neurobiol**, v. 39, p. 569-578, 1999.

NISHIMOTO, M. et al. Molecular cloning of cDNAs and genes for three  $\alpha$ -glucosidase from European honeybee, *Apis mellifera L.*, and heterologous production of recombinant enzymes in *Pichia pastoris*. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 71, p. 1703–1716, 2007.

NISHIMOTO, M. et al. Purification and substrate specificity of honeybee, *Apis mellifera L.*,  $\alpha$ -glucosidase III. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 65, p. 1610–1616, 2001.

NIVEN, J. E.; GRAHAM, C.M.; BURROWS, M. Diversity and evolution of the insect ventral nerve cord. **Annu Rev Entomol**, v. 53, p. 253–271, 2008.

OHASHI, K. et al. Molecular cloning of cDNA and analysis of expression of the gene for alpha-glucosidase from the hypopharyngeal gland of the honeybee *Apis mellifera* L. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 221, n. 2, p. 380-385, 1996.

OKA, Y. et al. Expression of myelencephalon-specific protease after cryogenic lesioning of the rat parietal cortex. **J Neurotrauma**, v. 22, p. 501–510, 2005.

OLSEN, L., et al. MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats. **PLoS ONE**, v. 4, p. e7225, 2009.

ONG, W. Y. et al. Apolipoprotein D gene expression in the rat brain and light and electron microscopic immunocytochemistry of apolipoprotein D expression in the cerebellum of neonatal, immature and adult rats. **Neuroscience**, v. 90, p. 913–922, 1999.

ONG, W. Y. et al. Differential expression of apolipoprotein D and apolipoprotein E in the kainic acid-lesioned rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 79, p. 359–367, 1997.

ONO, H. et al. Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. **Dev Biol**, v. 298, p. 555–570, 2006.

OVERLI, O. et al. Evolutionary background for stress coping styles: relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 31, p. 396–412, 2007.

OZSOLAK, F., et al. Direct RNA sequencing. **Nature**, v. 461, p. 814-818, 2009.

PAGE, R. E. JR.; AMDAM, G. V. The making of a social insect: developmental architectures of social design. **Bioessays**, v. 29, p. 334–343, 2007.

PAGE, R. E.; PENG, C. Y. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Exp Gerontol**, v. 36, p. 695–711, 2001.

PALHA, J. A., GOODMAN, A. B. Thyroid hormones and retinoids: a possible link between genes and environment in schizophrenia. **Brain Res Rev**, v. 51, p. 61–71, 2006.

PARK, H. R. et al. A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. **Neurosci Lett**, v. 48, p. 235-239, 2010.



PASSARDI, F. et al. Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. **Genomics**, v. 89, n. 5, p. 567-579, 2007.

PATEL, A. et al. The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. **PLOS ONE**, v. 2, p. e509, 2007.

PATEL, N. G.; HAYDAK, M. H.; GOCHNAUER, T. A. Electrophoretic components of the proteins in honeybee larval food. **Nature**, 186, 633-634, 1960.

PEARSON, K. et al. Structure of human apolipoprotein A-IV: a distinct domain architecture among exchangeable apolipoproteins with potential functional implications. **Biochemistry (Mosc)**, v. 43, p. 10719–10729, 2004.

PEIXOTO, L. G. et al. Identification of major royal jelly proteins in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. *J Insect Physiol*, v. 55, n. 8, p. 671–677, 2009.

PEREZ-VILAR, J.; HILL, R. L. The structure and assembly of secreted mucins. **J Biol Chem**, v. 274, p. 31751–31754, 1999.

PERSSON P. et al. The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. **Chemico-Biological Interactions**, v. 178, p. 94–98, 2009.

PERUGINO, G. et al.: Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. **Trends Biotech**, v. 22, p. 31–37, 2004.

PETERSEN, N. S. et al. forked proteins are components of fiber bundles present in developing bristles of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 136, p. 173-182, 1994.

PETERSEN, N. S.; QIN, H. Forked is an actin binding protein involved in actin fiber formation in *Drosophila* bristles. **Mol Biol Cell**, v. 7, p. 514a, 1996.

PETRYK, A. et al. Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 13773–13778, 2003.

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

PILLING, E. D. et al. Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide  $\lambda$ -cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz, in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Pestic Biochem Physiol**, v. 51, p. 1–11, 1995.

PITTMAN, R. N.; BUETTNER, H. M. Degradation of extracellular matrix by neuronal proteases. **Dev Neurosci**, v.11, n. 4-5, p. 361-375, 1989.

PONTING, C. P. et al. Novel protein domains and repeats in *Drosophila melanogaster*: insights into structure, function, and evolution. **Genome Res**, v. 11, p. 1996–2008, 2001.

PROVOST, P. R. et al. Apolipoprotein D transcription occurs specifically in nonproliferating quiescent and senescent fibroblast cultures. **FEBS Lett**, v. 290, p. 139-141, 1991.

QIN, G. et al. Expression, cross-linking, and characterization of recombinant chitin binding resilin. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 3227e3234, 2009.

QUAN, G. et al. Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 146, p. 87–98, 2003.

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

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

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

RAMALHO-ORTIGAO, J. M.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Molecular characterization of Llchit1, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 33, p. 279–287, 2003.

RASSART, E. et al. Apolipoprotein D. **Biochim Biophys Acta**, v. 1482, p. 185-198, 2000.

RAVELLI, A. C. J. et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. **Lancet**, v. 351, p. 173–177, 1998.

RAVELLI, G. P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N Engl J Med**, v. 295, p. 349–353, 1976.

REBERS, J. E.; RIDDIFORD, L. M., Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. **J Mol Biol**, v. 203, p. 411e423, 1988.

REBERS, J. E.; WILLIS, J. H., A conserved domain in arthropod cuticular proteins binds chitin. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 31, p. 1083e1093, 2001.

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

REMBOLD, H. Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. **Insect Biochem**, v. 17, p. 1003-1006, 1987.

REMBOLD, H.; CZOPPELT, C.; RAO, P. J. Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in the honeybee, *Apis mellifera*. **J Insect Physiol**, v. 20, p. 1193-1203, 1974.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**, v. 418, p. 935–941, 2002.

REYNOLDS, W. F. et al. MPO and APOE epsilon4 polymorphisms interact to increase risk for AD in Finnish males. **Neurology**, v. 55, n. 9, p. 1284-1290, 2000.

ROAT, T. C.; LANDIM, C. C. Temporal and morphological differences in post-embryonic differentiation of the mushroom bodies in the brain of workers, queens, and drones of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Micron**, v. 39, p. 1171-1178, 2008.

ROBINSON, G. E.; GROZINGER, C. M.; WHIFIELD, C. W. Sociogenomics: social life in molecular terms. **Nat Rev Genet**, v. 6, p. 257–270, 2005.

ROCH, F.; ALONSO, C. R.; AKAM, M. *Drosophila* miniature and dusky encode ZP proteins required for cytoskeletal reorganisation during wing morphogenesis. **J Cell Sci**, v. 116, p. 1199–1207, 2003.

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

ROSE, D.; HOLM, C. Meiosis-specific arrest revealed in DNA topoisomerase II mutants. **Mol Cell Biol**, v. 13, n. 6, p. 3445-3455, 1993.

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

RUDY, J. W.; CASTRO, C. A. Undernutrition during the brain growth period of the rat significantly delays the development of processes mediating Pavlovian trace conditioning. **Behav Neural Biol**, v. 53, p. 307-320, 1990.

RUF, J.; CARAYON, P. Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. **Arch biochem biophys**, v. 445, n. 2, p. 269-277, 2006.

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

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

SAKAMAKI, K. et al. The eosinophil peroxidase gene forms a cluster with the genes for myeloperoxidase and lactoperoxidase on human chromosome 17. **Cytogenet cell genet**, v. 88, n. (3–4), p. 246-248, 2000.

SAKAMAKI, K.; UEDA, T.; NAGATA, S. The evolutionary conservation of the mammalian peroxidase genes. **Cytogenet genome res**, v. 98, n. 1, p. 93-95, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2<sup>a</sup> ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 88, 1989.

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

SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. **Annu Rev Neurosci**, v. 22, p. 389-442, 1999.

SANZ, M. L. et al. Serum eosinophil peroxidase (EPO) levels in asthmatic patients. **Allergy**, v. 52, n. 4, p. 417-422, 1997.

SAPIO, M. R. et al. The zona pellucida domain containing proteins, CUT-1, CUT-3 and CUT-5, play essential roles in the development of the larval alae in *Caenorhabditis elegans*. **Dev Biol**, v. 282, p. 231–245, 2005.

SATO, T. K. et al. DNA arrays: applications and implications for circadian biology. **J Biol Rhythms**, v. 18, p. 96–105, 2003.

SAUNDERS, D. S. *Insect Clocks*. Amsterdam, Elsevier, 2002.

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

SCHARF, M. E. et al. Regulation of polyphonic caste differentiation in the termite *Reticulitermes flavipes* by interaction of intrinsic and extrinsic factors. **J Exp Biol**, v. 210, p. 4390–4398, 2007.

SCHOCK, F.; PERRIMON, N. Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 18, p. 463–493, 2002.

SCHULER, M. A. P450s in plant-insect interactions. **Biochim Biophys Acta**, v. 1814, p. 36–45, 2011.

SCHULER, M. A.; WERCK-REICHHART, D. Functional genomics of P450s. **Annu Rev Plant Biol**, v. 54, p. 629–667, 2003.

SCHWAB, M. E.; KAPFHAMMER, J. P.; BANDTLOW, C. E. Inhibitors of neurite growth. **Annu Rev Neurosci**, v. 16, p. 565–595, 1993.

SEMON, M.; DURET, L. Evolutionary origin and maintenance of coexpressed gene clusters in mammals. **Mol Biol Evo l**, v.23, p. 1715–1723, 2006.

SHAH, N. et al. Evolution of a large, conserved, and syntenic gene family in insects. **G3 (Bethesda)**, v. 2, n. 2, p. 313–319, 2012.

SHAHBAKHTI, H. et al. Influence of eicosapentaenoic acid, an omega-3 fatty acid, on ultraviolet-B generation of prostaglandin-E2 and proinflammatory cytokines interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and interleukin-8 in human skin in vivo. **Photochem Photobiol**, v. 80, p. 231–235, 2004.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Res**, v. 13, p. 2498-2504, 2003.

SHEARMAN, L. P. et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. **Science**, v. 288, p. 1013–1019, 2000.

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

SHEN, Z.; JACOBS-LORENA, M. Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates. **J Mol Evol**, v. 48, p. 341–347, 1999.

SHI, X. et al. Modeling the structure of the type I peritrophic matrix: characterization of a *Mamestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 34, p. 1101–1115 2004.

SHI, Y. Y. et al. Epigenetic Modification of Gene Expression in Honey Bees by Heterospecific Gland Secretions. **PLoS ONE**, v. 7. p. e43727, 2012.

SHIH, D. F. et al. Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase (AADC) Is Crucial for Brain Development and Motor Functions. **PLoS ONE**, v. 8, p. e71741, 2013.

SHIMIZU, C. et al. Characterization of recombinant and brain neuropsin, a plasticity-related serine protease. **J Biol Chem**, v. 273, p. 11189–11196, 1998.

SIMONET, G.; CLAEYS, I.; VANDEN BROECK, J. Structural and functional properties of a novel serine protease inhibiting peptide family in arthropods. **Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol**, v. 132, p. 247–55, 2002.

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

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

SONTAG, T. J.; PARKER, R. S. Cytochrome P450 omega-hydroxylase pathway of tocopherol catabolism. Novel mechanism of regulation of vitamin E status. **J Biol Chem**, v. 277, p. 25290–25296, 2002.

SOTGIU, S. et al. Different content of chitin-like polysaccharides in multiple sclerosis and Alzheimer's disease brains. **J Neuroimmunol**, v. 197, p. 70–73, 2008.

SPAETHE, J.; BRISCOE, A. D. Early duplication and functional diversification of the opsin gene family in insects. **Mol Biol Evol**, v. 21, p. 1583–1594, 2004.

SPANNHOFF, A. et al. Histone deacetylase inhibitor activity in royal jelly might facilitate caste switching in bees. **EMBO Rep**, v. 12, p. 238-243, 2011.

STARR, D. A. et al. unc-83 encodes a novel component of the nuclear envelope and is essential for proper nuclear migration. **Development**, v. 128, p. 5039-5050, 2001.

STARR, D. A.; FISCHER, J. A. KASH 'n Karry: the KASH domain family of cargo-specific cytoskeletal adaptor proteins. **BioEssays**, v. 27, p. 1136-1146, 2005.

STARR, D. A.; HAN, M. ANChors away: an actin based mechanism of nuclear positioning. **J Cell Sci**, v. 116, p. 211-216, 2003.

STARR, D. A.; HAN, M. Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. **Science** 298, 406-409, 2002.

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

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

STRODE, C. et al. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 38, p. 113–123, 2008.

SUMMERS, C. H.; WINBERG, S. Interactions between the neural regulation of stress and aggression. **J Exp Biol**, v. 209, p. 4581–4589, 2006.

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

SVENSSON, B. Protein engineering in the  $\alpha$  – amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity and stability. **Plant Mol Biol**, v. 25, p. 141–157, 1994.

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

SYED, Z. A. et al. A potential role for *Drosophila* mucins in development and physiology. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, p. e3041, 2008.

TAKAHASHI, J. S. Finding new clock components: past and future. **J Biol Rhythms**, v. 19, p. 339–347, 2004.

TAKEWAKI, S. et al. Purification and properties of  $\alpha$  –glucosidases of the honeybee *Apis mellifera* L. **Agric Biol Chem**, v. 44, p. 731–740, 1980.

TAKEWAKI, S. et al. Substrate specificity and subsite affinities of honeybee  $\alpha$  – glucosidase II. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 57, p. 1508–1513, 1993.

TAKITO, J.; AL-AWQATI, Q. Conversion of ES cells to columnar epithelia by hesin and to squamous epithelia by laminin. **J Cell Biol**, v. 166, p. 1093–1102, 2004.

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

TERAYAMA, R. et al. Differential expression of neuropsin and protease M/neurosin in oligodendrocytes after injury to the spinal cord. **Glia**, v. 48, p. 91–101, 2004.

TERAYAMA, R. et al. Differential expression of protease M/ neurosin in oligodendrocytes and their progenitors in an animal model of multiple sclerosis. **Neurosci Lett**, v. 382, p. 82 – 87, 2005.

TOGAWA, T. et al. CPF and CPFL, two related gene families encoding cuticular proteins of *Anopheles gambiae* and other insects. **Insect Biochem Mol. Biol**, v. 37, p. 675e688, 2007.

TOGAWA, T.; NAKATO, H.; IZUMI, S. Analysis of the chitin recognition mechanism of cuticle proteins from the soft cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochem. Mol. Biol**, v. 34, p. 1059e1067, 2004.

TOMIMATSU, Y. et al. Proteases involved in long-term potentiation. **Life Sci**, v. 72, p. 355–61, 2002.



TONNING A. et al. A transient luminal chitinous matrix is required to model epithelial tube diameter in the *Drosophila* trachea. **Dev Cell**, v. 9, p. 423–430, 2005.

TRAPNELL, C et al. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 46-53, 2013.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics** doi:10.1093/bioinformatics/btp120, 2009.

UCHIDA, A. et al. Expression of myelencephalon-specific protease in transient middle cerebral artery occlusion model of rat brain. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 126, p. 129–136, 2004.

UEMURA, T. et al. Cloning and sequencing of *Schizosaccharomyces pombe* DNA topoisomerase I gene, and effect of gene disruption. **Nucleic Acids Res**, v. 15, n. 23, p. 9727-9739, 1987.

VAN PRAAG, H., KEMPERMANN, G., GAGE, F.H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nat Rev Neurosci**, v. 1, p. 191–198, 2000.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature Neuroscience**, v. 2, p. 266-270, 1999.

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

VIUDA-MARTOS, M. et al. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Institute of Food Technologists**, v. 73, p. R117–124, 2008.

VOLK, T. Positioning nuclei within the cytoplasm of striated muscle fiber: Cooperation between microtubules and KASH proteins. **Nucleus**, v. 4, n.1, p. 18–22, 2013.

WANG, J.; SLUNGAARD, A. Role of eosinophil peroxidase in host defense and disease pathology. **Arch biochem biophys**, v. 445, n. 2, p. 256-260, 2006.

WANG, L. et al. A common genetic target for environmental and heritable influences on aggressiveness in *Drosophila*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, p. 5657–5663, 2008.

WANG, X. et al. Pat1: a topoisomerase II-associated protein required for faithful chromosome transmission in *Saccharomyces cerevisiae* **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 23, p. 4791–4797, 1996.

WANG, Y.; LUO, W.; REISER, G. Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, p. 237–52, 2008.

WARREN, J. T. et al. Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, p. 11043–11048, 2002.

WARREN, J. T. et al. phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 34, p. 991–1010, 2004.

WATANABE, K et al. The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. **J Mol Biol**, v. 269, p. 142–153, 1997.

WATT, P. M.; HICKSON, I. D. Structure and function of type II DNA topoisomerases. **Biochem J**, v. 303 (Pt 3), p. 681–695, 1994.

WELTE, M. A. et al. Developmental regulation of vesicle transport in *Drosophila* embryos: forces and kinetics. **Cell**, v. 92, p. 547–557, 1998.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. **Annu Rev Ecol Syst**, v. 20, p. 249–278, 1989.

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

WHEELER, D. E.; BUCK, N.; EVANS, J. D. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honeybee, *Apis mellifera*. **Insect Mol Biol**, v. 15, p. 597–602, 2006.

WIJNEN, H. et al. Control of daily transcript oscillations in *Drosophila* by light and the circadian clock. **PLoS Genet**, v, 2, p. e39, 2006.

WILHELMSSEN, K. et al. Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. **J Cell Biol**, v. 171, p. 799-810, 2005.

WILLINGHAM, A. T.; KEIL, T. A tissue specific cytochrome P450 required for the structure and function of *Drosophila* sensory organs. **Mech Dev**, v. 121, p. 1289–1297, 2004.

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

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

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

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.

WITHERS, G. S.; FAHRBACH, S. E.; ROBINSON, G. E. Effects of experience and juvenile hormone on the organization of the mushroom bodies of honey bees. **J Neurobiol**, v. 26, p. 130–144, 1995.

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

WITTSTOCK, U. et al. Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, p. 4859–4864, 2004.

WODARZ, A.; NATHKE, I. Cell polarity in development and cancer. **Nat Cell Biol**, v. 9, p. 1016–1024, 2007.

WRIGHT, T. R. F.; BEWLEY, G. C.; SHERALD, A. F. The genetics of dopa decarboxylase in *Drosophila melanogaster* II. **Genetics**, v. 84, p. 287–310, 1976.

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

WU, L.; BELASCO, J. G. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. **Mol Cell**, v. 29, p. 1–7, 2008.

WU, P. et al. Systematic gene expression profile of hypothalamus in calorie-restricted mice implicates the involvement of mTOR signaling in neuroprotective activity. **Mech Ageing Dev**, v. 130, p. 602–610, 2009.

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

YAN, J. et al. Cloning and functional expression of a fat body-specific chitinase cDNA from the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 32, p. 979–989, 2002.

YANG, Y. et al. Constitutive overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera*. **J Econ Entomol**, v. 99, p. 1784–1789, 2006.

YAO, J. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial of everolimus in patients with advanced pancreatic neuroendocrine tumors (PNET) (RADIANT-3). **Ann Oncol**, v. 21, p. 4-5, 2010.

YEHUDA, S.; RABINOVITZ, S.; MOSTOFISKY, D. I. Modulation of learning and neuronal membrane composition in the rat by essential fatty acid preparation: time-course analysis. **Neurochem Res**, v. 23, p. 627–634, 1998.

YU, I. T. et al. Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of proneural factors in association with H4 acetylation. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 473-480, 2009.

YU, J. et al. The KASH domain protein MSP-300 plays an essential role in nuclear anchoring during *Drosophila* oogenesis. **Dev Biol**, v. 289, p. 336-345, 2006.

ZEDERBAUER, M. et al. Heme to protein linkages in mammalian peroxidases: impact on spectroscopic, redox and catalytic properties. **Nat prod rep**, v. 24, n. 3, p. 571-584, 2007.

ZENG, Z. J. et al. Comparative studies of DNA and RNA from the royal jelly of *Apis mellifera* and *Apis cerana*. **Indian Bee J**, v. 68, p. 18–21, 2006.

ZHANG, D.W. et al. Functional analysis of two chitinase genes during the pupation and eclosion stages of the beet armyworm *Spodoptera exigua* by RNA interference. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 79, p. 220–234, 2012.

ZHANG, J. et al. Evolving protein functional diversity in new genes of *Drosophila*. **PNAS**, v. 101, p. 16246–16250, 2004.

ZHANG, Q. et al. The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300. **Genomics**, v. 80, p. 473-481, 2002.

ZHANG, Q. et al. Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. **J Cell Sci**, v. 114, p. 4485-4498, 2001.

ZHANG, X. et al. Syne-1 and Syne-2 play crucial roles in myonuclear anchorage and motor neuron innervations. **Development**, v. 134, p. 901-908, 2007.

ZHAO, C. et al. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. **J Neurosci**, v. 26, p. 3–11, 2006.

ZHEN, Y. Y. et al. NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. **J Cell Sci**, v. 115, p. 3207-3222, 2002.

ZHOU, X. et al. Two hexamerin genes from the termite *Reticulitermes flavipes*, sequence, expression, and proposed functions in caste regulation. **Gene**, v. 376, p. 47-58, 2006.

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

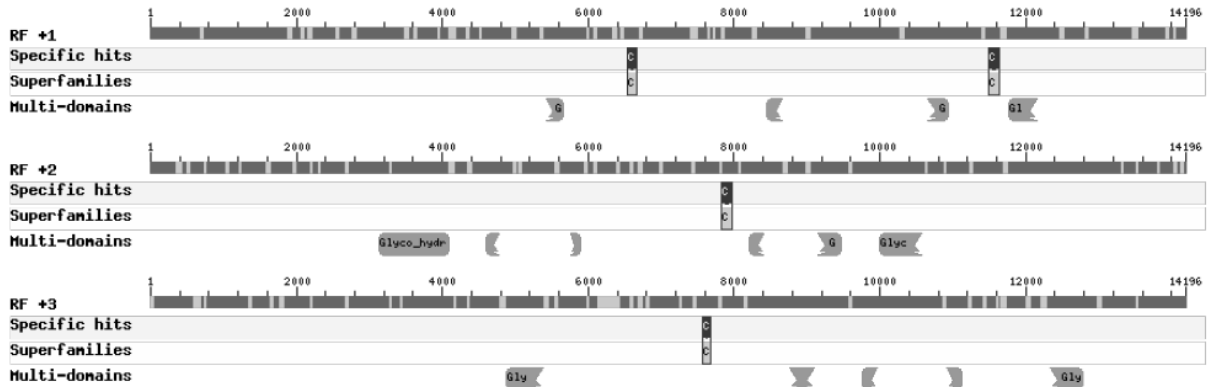
ZHOU, X.; TARVER, M. R.; SCHARF, M. E. Hexamerin-based regulation of juvenile hormone-dependent gene expression underlies phenotypic plasticity in a social insect. **Development**, v. 134, p. 601-610, 2007.

ZHU, B. et al. *Drosophila* Neurotrophins Reveal a Common Mechanism for Nervous System Formation. **PLoS Biol**, v. 6, p. e284, 2008.

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

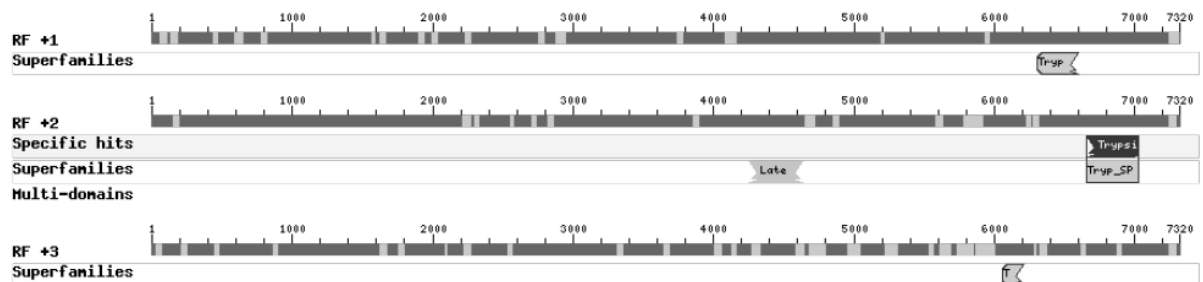
ZWEIFEL, L. Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, p. 615–625, 2005.

ANEXO A – Imagens dos domínios conservados dos genes mais expressos em cérebros de rainhas L3



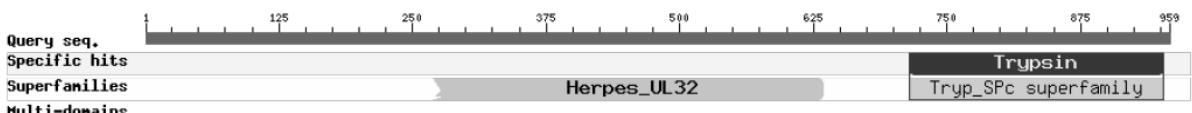
**Figura S1** - Organização da proteína correspondente ao GB43173 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.



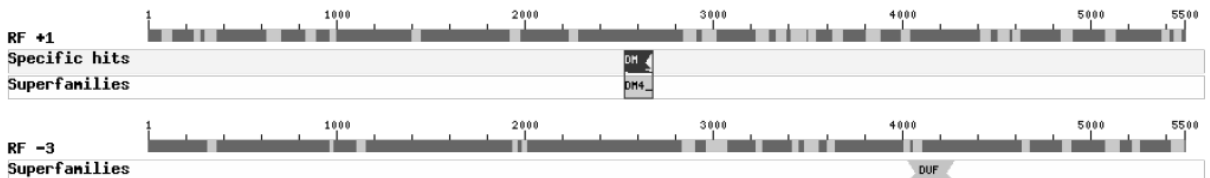
**Figura S2** - Organização da proteína correspondente ao GB50650 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.



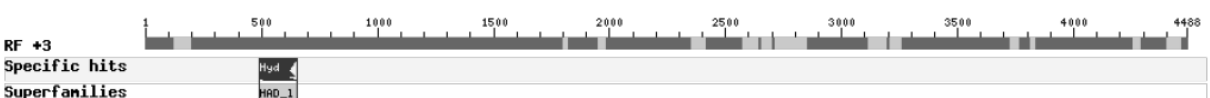
**Figura S3** - Organização da proteína correspondente ao GB50648 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.



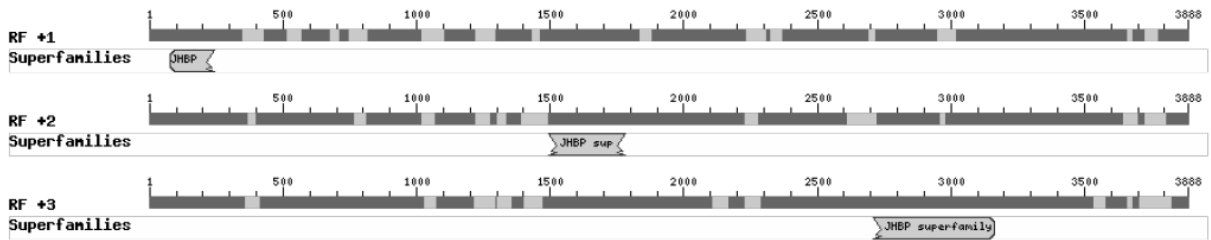
**Figura S4** - Organização da proteína correspondente ao GB45633 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.



**Figura S5** - Organização da proteína correspondente ao GB42549 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.



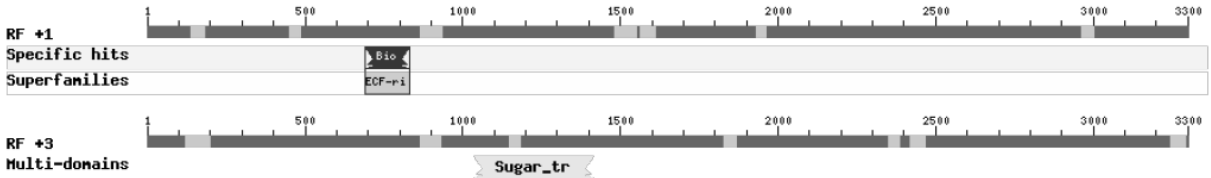
**Figura S6** - Organização da proteína correspondente ao GB42796 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.



**Figura S7** - Organização da proteína correspondente ao GB50875 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.



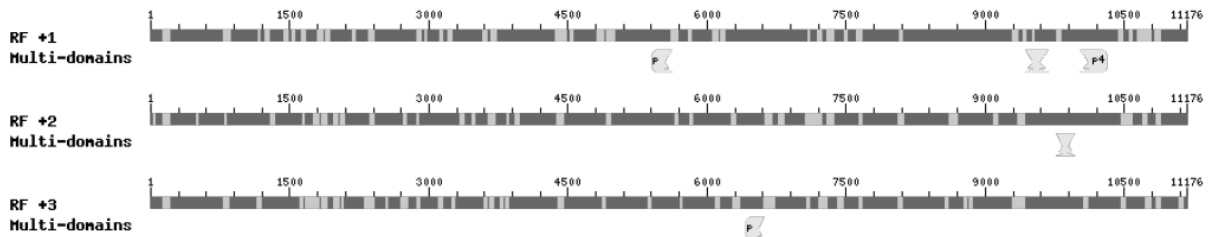
**Figura S8** - Organização da proteína correspondente ao GB48978 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.



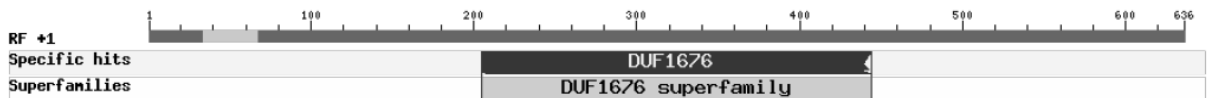
**Figura S9** - Organização da proteína correspondente ao GB43181 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.



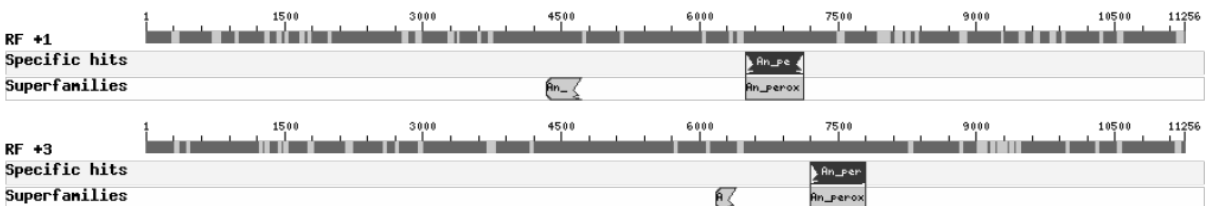
**Figura S10** - Organização da proteína correspondente ao GB44513 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.



**Figura S11** - Organização da proteína correspondente ao GB43769 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.

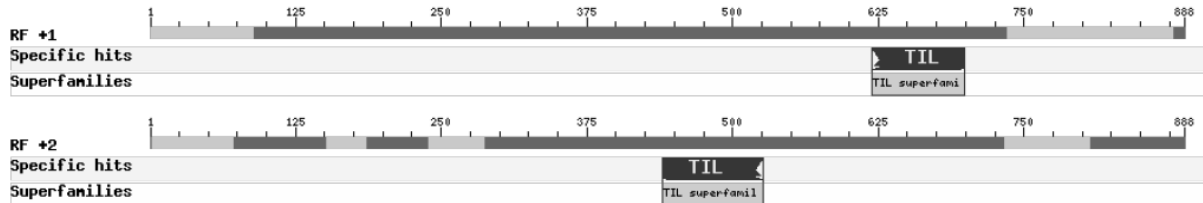


**Figura S12** - Organização da proteína correspondente ao GB54144 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.

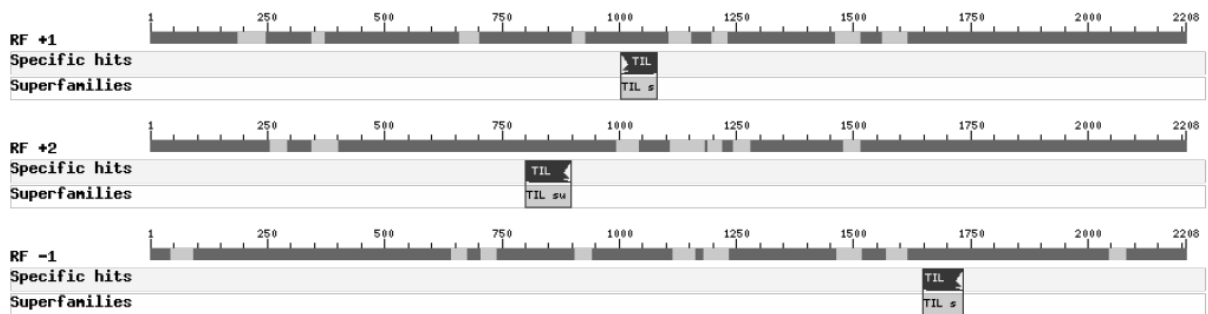


ANEXO B – Imagens dos domínios conservados dos genes mais expressos em cérebros de operárias L3



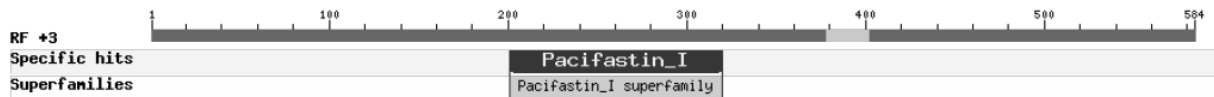
**Figura S13** - Organização da proteína correspondente ao GB50116 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.



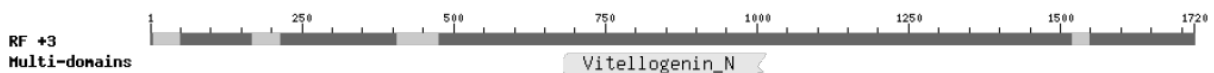
**Figura S14** - Organização da proteína correspondente ao GB50121 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.



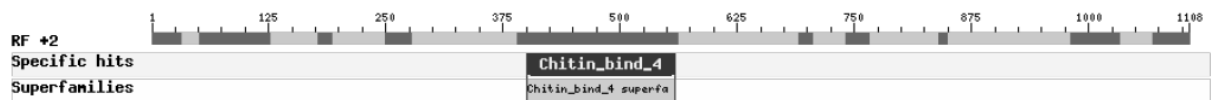
**Figura S15** - Organização da proteína correspondente ao GB51989 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.



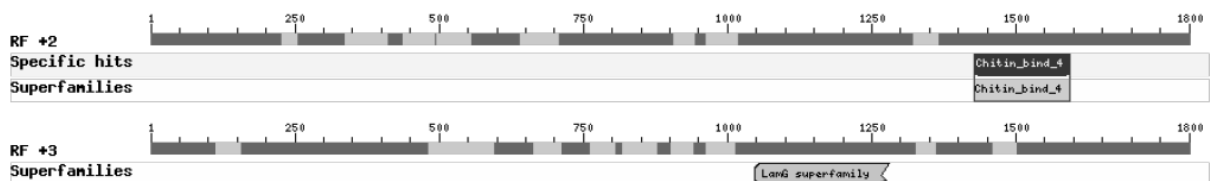
**Figura S14** - Organização da proteína correspondente ao GB52466 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.



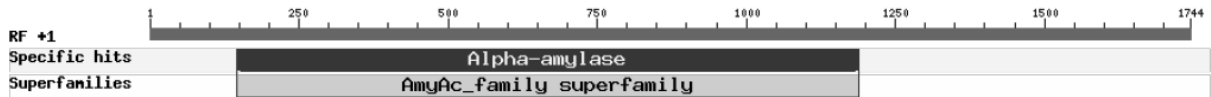
**Figura S15** - Organização da proteína correspondente ao GB48823 mostrando o domínio conservado.

Fonte: Pfam.

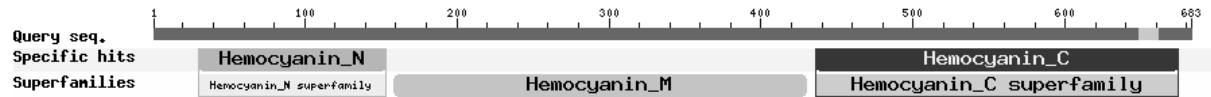


**Figura S16** - Organização da proteína correspondente ao GB46311 mostrando o domínio conservado.

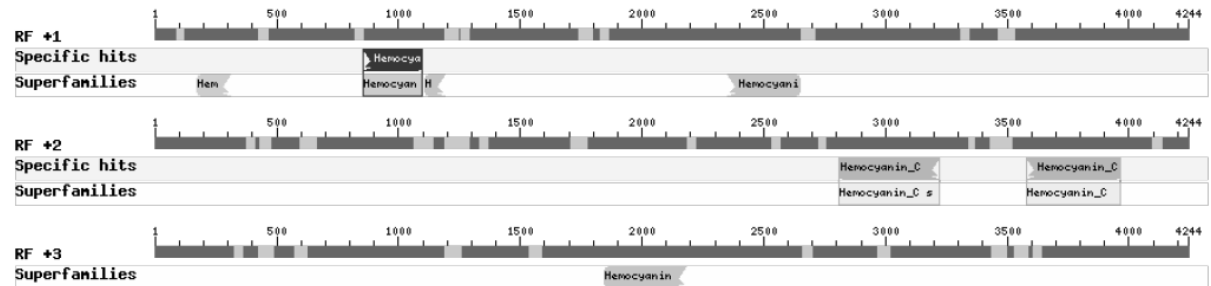
Fonte: Pfam.



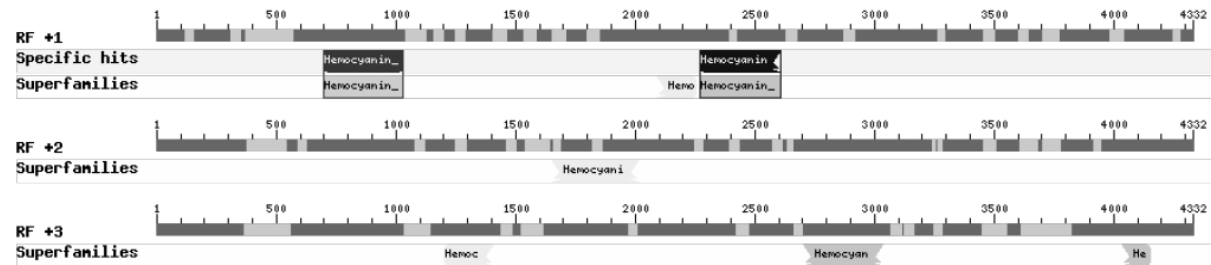
**Figura S17** - Organização da proteína correspondente ao GB54549 mostrando o domínio conservado.  
 Fonte: Pfam.



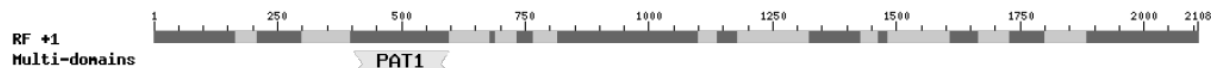
**Figura S18** - Organização das proteínas correspondente aos GB51697 mostrando o domínio conservado.  
 Fonte: Pfam.



**Figura S19** - Organização das proteínas correspondente aos GB51696 mostrando o domínio conservado.  
 Fonte: Pfam.



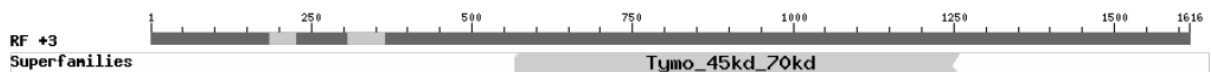
**Figura S20** - Organização das proteínas correspondente aos GB44996 mostrando o domínio conservado.  
 Fonte: Pfam.



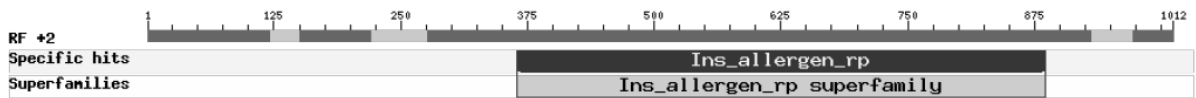
**Figura S21** - Organização da proteína correspondente ao GB50363 mostrando o domínio conservado.  
 Fonte: Pfam.



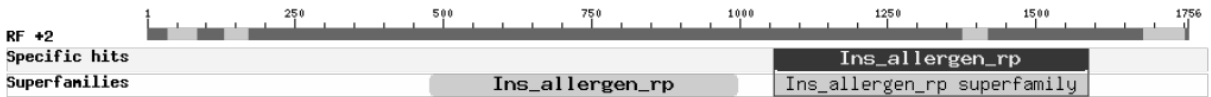
**Figura S22** - Organização da proteína correspondente ao GB43713 mostrando o domínio conservado.  
 Fonte: Pfam.



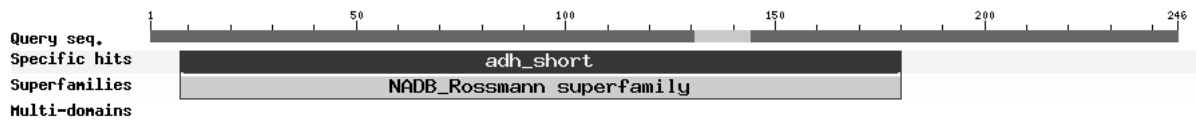
**Figura S23** - Organização da proteína correspondente ao GB48391 mostrando o domínio conservado.  
 Fonte: Pfam.



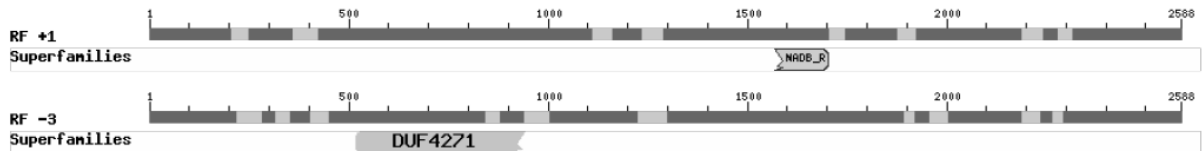
**Figura S24** - Organização da proteína correspondente ao GB43689 mostrando o domínio conservado.  
 Fonte: Pfam.



**Figura S25.** Organização da proteína correspondente ao GB43690 mostrando o domínio conservado.  
 Fonte: Pfam.



**Figura S26** - Organização da proteína correspondente ao GB54419 mostrando o domínio conservado.  
 Fonte: Pfam.



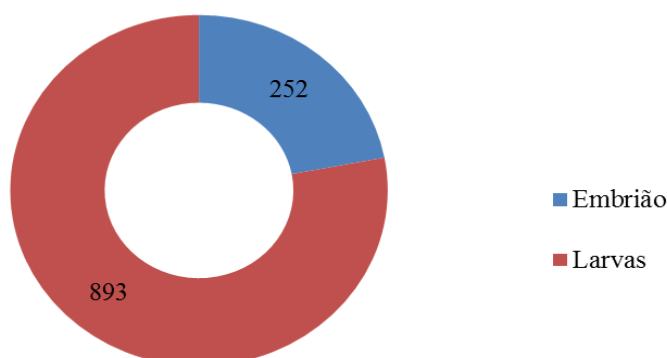
**Figura S27** - Organização da proteína correspondente ao GB46367 mostrando o domínio conservado.  
 Fonte: Pfam.

## ANEXO C - COMPARAÇÃO DOS TRANSCRIPTOMAS DE CÉREBROS DE LARVAS L3 DE RAINHAS E OPERÁRIAS E DE EMBRIÃO DIPLÓIDE (72H)

Para caracterizar os genes envolvidos na morfogênese inicial do cérebro larval tomamos o embrião como referência, e identificamos os genes que continuam a se expressar em cada casta e, também, quais reduzem, cessam ou aumentam sua expressão até pouco antes do início da diferenciação morfológica do cérebro entre as castas (larvas L3; MODA et al., 2013).

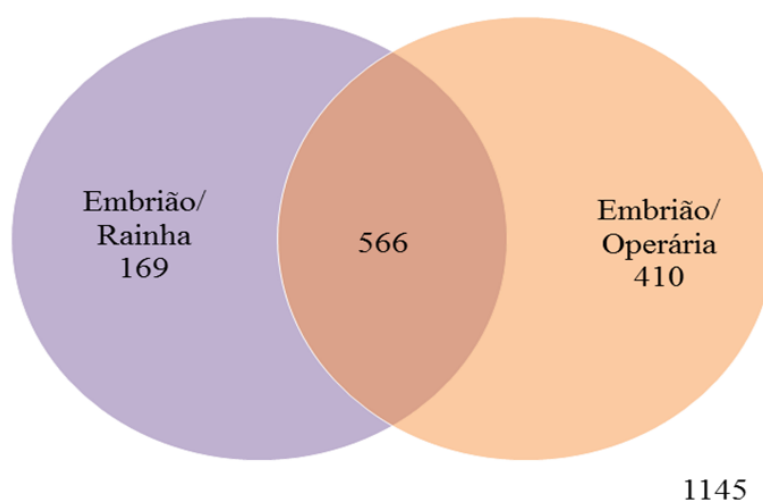
Para encontrar os GDEs entre cérebros de larvas L3 (rainha e operária) e embrião diplóide (72h), utilizamos as duas bibliotecas obtidas neste estudo e uma biblioteca de mRNA de embriões obtida previamente por Flávia Freitas (aluna de Doutorado do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão – Universidade de São Paulo). As análises foram feitas da mesma forma da comparação entre os transcriptomas de cérebros de larvas L3 de rainhas e operárias.

Usando como critério estatístico  $p$ -value e  $q$ -value menores que 0,05 foi possível identificar 1.145 genes diferencialmente expressos entre cérebros de rainhas e operárias em 3º estágio larval e embrião diplóide (72h). Destes, 893 foram mais expressos em larvas L3 e 252 em embrião (Figura S28). Dos 1.145 GDEs, 410 genes foram diferencialmente expressos apenas entre larvas L3 de operárias e embrião; 169, entre larvas L3 de rainhas e embrião. Houve 566 GDEs em comum entre as castas de L3 e embrião (Figura S29).



**Figura S28** - Gráfico representando a distribuição dos genes diferencialmente expressos entre os cérebros das larvas de *A. mellifera* de 3º estágio e embrião diplóide (72h).

Fonte: Da autora.

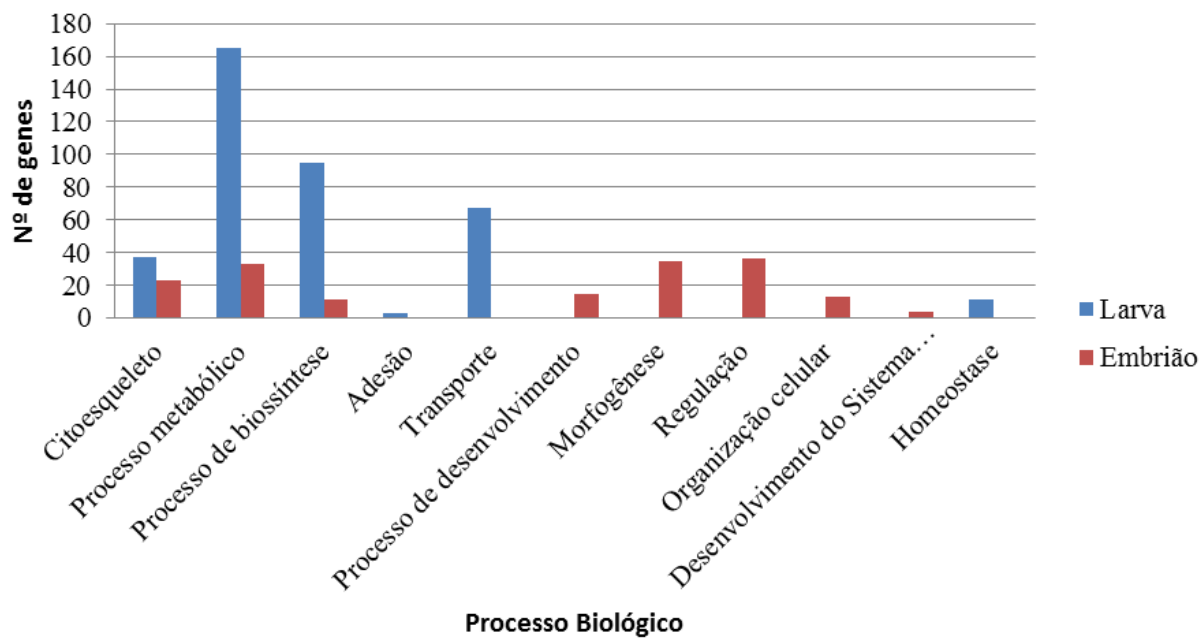


**Figura S29-** Gráfico representando a distribuição dos genes diferencialmente expressos entre os cérebros das larvas de *A. mellifera* de 3º estágio e embrião diplóide (72h), mostrando a distribuição dos genes entre as castas das larvas L3.

Fonte: Da autora.

Para explorar esta grande lista de GDEs utilizamos uma ferramenta de bioinformática (DAVID) que permite classificar esses genes segundo critérios do *Gene Ontology* (GO) (ASHBURNER et al., 2000), o qual fornece um vocabulário de classificação baseado em funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares. As análises do GO para processos biológicos mostraram que os GDEs se enquadram em classificações bem diferentes (Figura S30).

De maneira geral os produtos dos genes mais expressos em embrião foram relacionados a metabolismo energético, desenvolvimento e regulação, e morfogênese, sugerindo alta demanda de energia metabólica durante a embriogênese e a diferenciação celular. Enquanto os produtos dos genes mais expressos em larvas L3 foram relacionados a citoesqueleto, biossíntese, transporte de moléculas e metabolismo, sugerindo papéis na garantia de crescimento rápido das larvas.



**Figura S30-** Gráfico representando o número de genes diferencialmente expressos entre embrião diplóide (72h) e larvas L3 por processo biológico.  
 Fonte: Da autora.