

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

DELICIO EUSTAQUIO DE PAULA JUNIOR

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DO DESENVOLVIMENTO
CEREBRAL CASTA-ESPECÍFICO EM *Apis mellifera***

Alfenas / MG

2019

DELICIO EUSTAQUIO DE PAULA JUNIOR

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DO DESENVOLVIMENTO
CEREBRAL CASTA-ESPECÍFICO EM *Apis mellifera***

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG.
Orientador: Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk.

Alfenas / MG

2019

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

Paula Junior, Delcio Eustaquio de.
P324a Aspectos morfológicos e moleculares do desenvolvimento cerebral
casta-específico em *Apis mellifera* -- Alfenas/MG, 2019.
132 f. : il. --

Orientador: Angel Roberto Barchuk.
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de
Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Cérebro. 2. Morfogênese. 3. Abelhas africanizadas. 4. Nutrição. 5.
Expressão gênica. I. Barchuk, Angel Roberto. II. Título.

CDD-571.8

DELICIO EUSTAQUIO DE PAULA JUNIOR

"ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DO DESENVOLVIMENTO CEREBRAL
CASTA-ESPECÍFICO EM *Apis mellifera*".

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisiologia pelo programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas.

Aprovado em: 30/10/2019

Profa. Dra. Roseli Soncini
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura: Roseli Soncini

Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões
Instituição: Universidade de São Paulo
- USP

Assinatura: Zilá Luz Paulino Simões

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

Assinatura: Anete Pedro Lourenço

Profa. Dra. Bruna Kalil
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura: Bruna Kalil

Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes
Instituição: Universidade Federal de São Carlos
-UFSCAR

Assinatura: Francis de Moraes Franco Nunes

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, tenho plena convicção de que nestes anos, diante das adversidades, contei com a força e misericórdia de um Deus que me ama e me fez forte para que eu conseguisse chegar ao fim.

Agradeço aos meus pais; esta conquista também é de vocês. Mãe, obrigado por me mostrar que o conhecimento é o bem maior que alguém pode ter. Papai, obrigado por estar sempre ao meu lado e por ter abdicado de sonhos próprios para que eu pudesse realizar os meus.

Agradeço as minhas avós, Maria e Nalzira, tenho certeza que suas orações fervorosas e interseções fizeram derramar bênçãos sobre a minha vida.

Agradeço aos meus demais familiares, cada um em sua particularidade me ofereceu suporte e carinho necessário para que eu não me sentisse sozinho neste mundo e tivesse força para seguir no caminho.

Agradeço aos meus amigos, não me atreverei a citar nomes temendo falha da memória, mas saibam que sem vocês eu nunca chegaria onde estou, por diversos momentos vocês foram meu porto seguro.

Agradeço de forma especial o meu orientador. Chefe, você para mim é um exemplo de pesquisador e de ser humano, terei-te sempre como um espelho. A admiração e gratidão que tenho por você são incapazes de serem expressadas em palavras.

Agradeço aos professores Dr. Klaus Hartfelder, Dra. Zilá Simões e Dra. Márcia Bitondi por terem contribuído oferecendo a estrutura de seus laboratórios para que fosse possível a conclusão deste trabalho.

Agradeço a professora Dra. Lívia Moda que desde o início de meu doutorado não mediu esforços para que este trabalho fosse concluído com êxito.

Agradeço a professora Dra. Flávia Freitas e a técnica Dra. Juliana Martins que ofereceram apoio e contribuíram com seus conhecimentos científico, os quais foram indispensáveis nos momentos em que os experimentos pareciam não fluir.

Agradeço a secretária Adriana Pereira por ter sido tão eficiente e solícita todos esses anos. Obrigado por ser muito mais do que uma excelente secretária, seu jeito carinhoso e cuidadoso fez eu ver em você a figura da minha mãe em Alfenas.

Agradeço a Universidade Federal de Alfenas, em especial, ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e ao Departamento de Biologia Celular e do

Desenvolvimento da UNIFAL-MG por proporcionar estrutura necessária para condução deste trabalho.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa de estudos, sem a qual seria impossível a realização de meu doutorado.

“Meditai se só as nações fortes podem fazer
ciência ou se é a ciência que as torna fortes”

Walter Osvaldo Cruz

RESUMO

As abelhas *Apis mellifera* são insetos conhecidos por sua eussociabilidade. Os adultos da espécie; zangões, rainhas e operárias, exibem nítida divisão de trabalho e sobreposição de gerações. Rainhas e operárias são um clássico exemplo de difenismo, o qual é determinado pela alimentação diferencial, geleia real ou geleia de operária, recebida entre o terceiro e quinto ínstar larval. A alimentação influencia o desenvolvimento cerebral em muitas espécies, inclusive em *A. mellifera*, que apresenta morfogênese cerebral diferencial entre rainhas e operárias. Durante o período larval o cérebro de rainhas mostra-se maior, com maior número de neuroblastos e também com maior taxa de proliferação celular. Todavia, é sabido que o cérebro adulto de operárias é proporcionalmente maior do que o de rainhas, deste modo, hipotetiza-se que ocorra uma inversão do tamanho cerebral durante o desenvolvimento pupal e/ou adulto-farato por intermédio da ação de genes hormonalmente modulados. Foram identificados, por meio de microarranjos de oligonucleotídeos, um conjunto de genes diferencialmente expressos no cérebro rainhas e operárias Pp, dentre os quais podem estar genes primordiais para o desenvolvimento cerebral casta específico. Assim, objetivou-se determinar a dinâmica morfológica e as bases moleculares do desenvolvimento cerebral durante o período pupal e adulto-farato em rainhas e operárias. Os resultados mostraram que o cérebro de operárias se desenvolve mais do que o de rainhas no período pupal e meados do desenvolvimento adulto-farato. Os corpos cogumelares e pedunculares ocupam maior área no cérebro de operárias e há lateralização anatômica relacionada a essas estruturas no cérebro de ambas as castas. Em busca dos determinantes moleculares da morfogênese cerebral, analisamos a expressão de 17 transcritos, *tum*, *mnb*, *ATPsynβ*, *ant*, *InR-1*, *InR-2*, *ILP-1*, *ILP-2*, *Tor*, *hex 70a*, *hex70b*, *hex 110*, *lncov-1*, *LOC 726407*, *caspase-1*, *EcR-A* e *EcR-B*, e verificamos que apenas *hex 110* não é diferencialmente expressa entre as castas. Analisamos a resposta de 8 (*tum*, *mnb*, *ATPsynβ*, *ant*, *ILP-1*, *ILP-2*, *lncov-1* e *caspase-1*) deles aos hormônios HJ e 20E. Todos respondem a pelo menos um dos hormônios. Ademais, imunolocalizamos os produtos proteicos dos genes *ATPsynβ* e *hex 70a* e observamos que o primeiro apresenta localização citoplasmática e o segundo citoplasmática e nuclear. Em conjunto, nossos resultados permitem supor que o ambiente hormonal, mais especificamente os altos títulos de ecdisteroides, é interpretado de forma diferencial no cérebro de rainhas e operárias, gerando diferenças no padrão de expressão gênica que favorecem o desenvolvimento do cerebral em operárias. Ensaio de RNAi estão em andamento e verificarão os efeitos do silenciamento pós-transcricional de *mnb*, um gene que parece protagonizar o processo de morfogênese cerebral diferencial em *A. mellifera* durante o período pupal e adulto-farato.

Palavras-chave: Morfogênese cerebral. *Apis mellifera*. Nutrição diferencial. Expressão gênica.

ABSTRACT

Apis mellifera are insects known for their eusociality. The adults in the species; drones, queens and workers, display a clear division of labor and generation overlap. Queen and workers are a classic example of diphenism, which is determined by the differential feeding, royal jelly or worker jelly received between the third and fifth instar larvae. Feeding influences the brain development in many species, including in the *A. mellifera*, which shows differential brain morphogenesis between queens and workers. During the larval stage, the queens' brain are larger, with a higher number of neuroblasts and also with a higher rate of cell proliferation. However, it is known that the adult brain in workers is proportionally larger; therefore, the hypothesis is that an inversion of brain size happens during the pupal and/or pharate-adult development through the action of hormonally modulated genes. By means of oligonucleotide microarrays, a set of genes differentially expressed in queens and worker Pp brain were identified, among which may be primordial genes for caste specific brain development. Thus, the objective was to determine the morphological dynamics and molecular bases of brain development during the pupal and pharate-adult period in workers and queens. The results showed that workers' brains develop more than queens' brains in the pupal and pharate-adult period. The mushroom body and peduncular body occupy a larger area in the workers' brain and there is anatomical lateralization related to these structures in the brain of both castes. Searching for molecular determiners in the brain morphogenesis, it was analyzed the expression of 17 transcripts, *tum*, *mnb*, *ATPsyn β* , *ant*, *InR-1*, *InR-2*, *ILP-1*, *ILP-2*, *Tor*, *hex 70a*, *hex70b*, *hex 110*, *Incov-1*, *LOC 726407*, *caspase-1*, *EcR-A* and *EcR-B*, and it was verified that only *hex 110* is not differentially expressed among the castes. It was analyzed the answer from 8 of them (*tum*, *mnb*, *ATPsyn β* , *ant*, *ILP-1*, *ILP-2*, *Incov-1* e *caspase-1*) to the hormones HJ e 20E. They all answer to at least one of the hormones. Besides, it was immunolocalized the protein products from the genes *ATPsyn β* and *hex 70a* and observed that the first one presents a cytoplasmic localization and the second one a cytoplasmic and nuclear localization. Altogether, the results make us believe that the hormonal environment, more specifically, the high tittles of ecdysteroids, is differently interpreted at the queens' and workers' brain, which creates differences in the gene expression patterns that favors the brain development in worker bees. RNAi assays are underway and will look at the effects of post-transcriptional silencing of *mnb*, a gene that appears to play a key role in the differential brain morphogenesis process in *A. mellifera* during the pupal and pharate-adult periods.

Key words: Brain morphogenesis. *Apis mellifera*. Differential nutrition. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo proposto por Barchuk e colaboradores (2007) para explicar as vias de sinalização determinantes da diferenciação de castas em <i>A. mellifera</i>	20
Figura 2 - Representação anatômica do cérebro de <i>A. mellifera</i>	23
Figura 3 - Corte histológico do cérebro de abelha <i>A. mellifera</i> demonstrando as estruturas cerebrais alvos de análises morfométricas.....	31
Figura 4 - Aparato utilizado durante as administrações hormonais.....	38
Figura 5 - Resumo do desenho experimental utilizado para o tratamento das abelhas com hormônio juvenil.....	39
Figura 6 - Resumo do desenho experimental utilizado para o tratamento das abelhas com 20-hidroxiecdisona.....	40
Figura 7- Análise morfométrica do cérebro de abelhas <i>A. mellifera</i> em fases do desenvolvimento pupa/adulto-farato mostrando comparação da área ocupada pelo cérebro, corpos cogumelares e corpos pedunculares entre rainhas e operárias.....	44
Figura 8 - Razão entre a área ocupada pelos corpos cogumelares direitos (CGD) e esquerdos (CGE); e pedunculares direitos (CPD) e esquerdos (CPE) em relação à área total do cérebro de abelhas <i>A. mellifera</i> em fases do desenvolvimento pupa/adulto-farato.....	46
Figura 9 - Razão entre a área ocupada pelos corpos cogumelares e pedunculares, direitos e esquerdos somados, em relação a área total do cérebro de abelhas <i>A. mellifera</i> em fases do desenvolvimento pupa/adulto-farato.....	47
Figura 10- Análise morfométrica do cérebro de abelhas <i>A. mellifera</i> em fases do desenvolvimento pupa/adulto-farato mostrando comparação entre a área ocupada pelas estruturas do hemisfério direito em relação ao esquerdo.....	48
Figura 11- Enriquecimento funcional dos 229 genes diferencialmente expressos em cérebros de rainhas e operárias Pp com ortólogos em <i>D. melanogaster</i>	50
Figura 12 - Perfil de transcrição dos genes <i>tum</i> e <i>mnb</i> em cérebros de rainhas e operárias de <i>A. mellifera</i> durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.....	53
Figura 13 - Perfil de transcrição dos genes <i>ATPsynβ</i> e <i>ant</i> em cérebros de rainhas e operárias de <i>A. mellifera</i> durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.....	54

Figura 14 - Perfil de transcrição dos genes <i>InR-1</i> , <i>InR-2</i> , <i>ILP-1</i> , <i>ILP-2</i> e <i>Tor</i> em cérebros de rainhas e operárias de <i>A. mellifera</i> durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.....	55
Figura 15 - Comparação dos níveis de transcrição entre as variantes 1 e 2 dos receptores (<i>InR-1</i> e <i>InR-2</i>) e peptídeos insulínicos (<i>ILP-1</i> e <i>ILP-2</i>) em cérebros de rainhas e operárias de <i>A. mellifera</i> durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.....	56
Figura 16 - Perfil de transcrição dos genes de Hexamerinas (<i>hex 70a</i> , <i>70b</i> e <i>110</i>) em cérebros de rainhas e operárias de <i>A. mellifera</i> durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.....	57
Figura 17- Perfil de transcrição de <i>lncov-1</i> e <i>LOC 726407</i> em cérebros de rainhas e operárias de <i>A. mellifera</i> durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.....	58
Figura 18 - Perfil de transcrição da caspase-1 em cérebros de rainhas e operárias de <i>A. mellifera</i> durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.....	59
Figura 19 - Perfil de transcrição das variantes A e B do receptor de ecdisteroides em cérebros de rainhas e operárias de <i>A. mellifera</i> durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.....	60
Figura 20 - Resposta transcricional dos genes <i>tum</i> , <i>mnb</i> , <i>ATPsynβ</i> e <i>ant</i> ao tratamento com hormônio juvenil 1, 6, e 12h pós- tratamento.....	62
Figura 21 - Resposta transcricional dos genes <i>ILP-1</i> , <i>ILP-2</i> , <i>lncov-1</i> e <i>caspase-1</i> ao tratamento com hormônio juvenil 1, 6, e 12h pós- tratamento.....	63
Figura 22 - Resposta transcricional dos genes <i>tum</i> , <i>mnb</i> , <i>ATPsyn-β</i> e <i>ant</i> ao tratamento com 20-hidroxiecdisona 1, 6, e 12h pós- tratamento.....	65
Figura 23 - Resposta transcricional dos genes <i>ILP-1</i> , <i>ILP-2</i> , <i>lncov-1</i> e <i>caspase-1</i> ao tratamento com 20-hidroxiecdisona 1, 6, e 12h pós- tratamento.....	66
Figura 24 - Imunolocalização da ATPsyn α em cérebros de rainhas e operárias Pbm.....	68
Figura 25 - Imunolocalização da hexamerina 70a no cérebro de operárias Pbm.....	70
Figura 26 - <i>Heatmap</i> resumando os dados de expressão gênica em cérebros de rainhas (Q) e operárias (W) de <i>A. mellifera</i> durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.....	78
Figura 27 - Estrutura da ATP sintase mitocondrial. Em destaque são mostradas as subunidades que compõem a porção F1.....	83

Figura 28 - <i>Heatmap</i> resumizando os resultados obtidos nos ensaios de administração hormonal.....	100
Figura 29 - Perfis hormonais durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato em castas de <i>A. mellifera</i>	102
Figura 30 - Esquema proposto para explicar o processo de morfogênese cerebral diferencial em castas de <i>A. mellifera</i>	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Características utilizadas para classificar o desenvolvimento pós-larval de operárias e rainhas de <i>A. mellifera</i> africanizadas.....	28
Quadro 2 -	Genes que foram alvos de estudo no presente trabalho.....	34
Quadro 3 -	Sequência nucleotídica dos primers utilizados durante as análises de RT-qPCR.....	35
Quadro 4 -	Referências bibliográficas de onde foram retiradas algumas das sequências de primers utilizadas no presente trabalho.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grau Celcius
µL	microlitros
µM	micromolar
20E	20-hidroxiecdisona
ADP	adenosina difosfato
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5methyl-isoxazolepropionic acid</i>
<i>ant</i>	gene <i>ADP/ATP translocase</i>
AT	área total do cérebro
ATP	adenosina trifosfato
<i>ATPsynβ</i>	gene <i>ATP sintase subunidade beta</i>
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CG	corpo cogumelar
CGD	corpo cogumelar direito
CGE	corpo cogumelar esquerdo
cm	centímetros
CP	corpo peduncular
CPD	corpo peduncular direito
CPE	corpo peduncular esquerdo
DAPI	4'6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRONC	<i>Death regulator Nedd2-like caspase</i>
DYRK	tirosina quinase de especificidade dual
EcR	receptor de ecdisteroides
<i>EcR-A</i>	gene <i>Ecdysone receptor</i> isoforma A
<i>EcR-B</i>	gene <i>Ecdysone receptor</i> isoforma B
EPM	erro padrão da média
<i>g</i>	aceleração da gravidade
g	gramas
<i>GlcAT-P</i>	gene <i>glucuronyltransferase-P</i>

GTP	guanosina trifosfato
GTPase	hidrolase de GTP
<i>hex 110</i>	gene <i>Hexamerin 110</i>
<i>hex 70a</i>	gene <i>Hexamerin 70a</i>
<i>hex 70b</i>	gene <i>Hexamerin 70b</i>
HJ	hormônio juvenil
ILP	peptídeo semelhante à insulina
<i>ILP-1</i>	gene <i>Insulin-like peptide 1</i>
<i>ILP-2</i>	gene <i>Insulin-like peptide 2</i>
ILR	receptor de ILP
<i>InR-1</i>	gene <i>Insulin receptor 1</i>
<i>InR-2</i>	gene <i>Insulin receptor 2</i>
IR	receptor de insulina
KDa	quilodalton
<i>lncov-1</i>	<i>long non-coding RNA from ovary-1</i>
lncRNA	RNA longo não codificador
<i>LOC 726407</i>	gene computacionalmente predito
LTD	depressão de longo prazo
LTP	potenciação de longo prazo
<i>mbm¹</i>	gene <i>mushroom body miniature¹</i>
min	minutos
miRNA	micro RNA
mL	mililitros
<i>mb</i>	gene <i>Minibrain</i>
MNDA	N-metil-D-aspartato
NE	adulto recém-emergido
nm	nanômetros
Pb	adulto-farato de olho marrom
Pbd	adulto-farato de olho marrom com pigmentação torácica forte
Pbl	adulto-farato de olho marrom com pigmentação torácica leve
Pbm	adulto-farato de olho marrom com pigmentação torácica intermediária
PBS	tampão fosfato-salino

PBST	PBS + 0,5% de Triton X-100
PBST ₂	PBST + 1% de albumina bovina sérica
PCR	reação em cadeia da polimerase
Pdp	adulto-farato de olho rosa escuro
pH	potencial hidrogeniônico
PK	proteína quinase
Pp	adulto-farato de olho rosa
Pw	pupa de olho branco
QTL	locus de características quantitativas
RNA	ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
<i>RpL32</i>	gene <i>Ribosomal protein L32</i>
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
<i>shot</i>	gene <i>short stop</i>
<i>Tor</i>	gene <i>Target of rapamycin</i>
TOR	serina/treonina quinase alvo da rapamicina
<i>tum</i>	gene <i>Tumbleweed</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Biologia da espécie <i>Apis mellifera</i>	18
1.2	Alimentação e morfogênese diferencial em <i>Apis mellifera</i>	19
1.3	Desenvolvimento do cérebro em <i>Apis mellifera</i>	22
2	OBJETIVO	26
2.1	Objetivos geral	26
2.2	Objetivos específicos.....	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Morfometria cerebral.....	29
3.1.1	<i>Dissecção e desidratação dos cérebros</i>	29
3.1.2	<i>Inclusão em Historesina</i>	29
3.1.3	<i>Cortes em micrótomo e coloração</i>	30
3.1.4	<i>Análise dos cortes</i>	30
3.2	Comprimento corporal.....	31
3.3	Análise de enriquecimento funcional	32
3.4	Análise do perfil transcricional	32
3.4.1	<i>Dissecção de cérebros</i>	32
3.4.2	<i>Extração de RNA total</i>	33
3.4.3	<i>Desenho, síntese e teste de primers para os ensaios de RT-qPCR</i>	34
3.4.4	<i>Ensaio de RT-qPCR em tempo real</i>	37
3.5	Análise do efeito hormonal sobre a expressão gênica.....	37
3.5.1	<i>Tratamento com hormônio juvenil</i>	38
3.5.2	<i>Tratamento com 20-hidroxiecdisona (20E)</i>	39
3.6	Imunofluorescência	40
3.7	Análises estatísticas	41
4	RESULTADOS	43
4.1	Morfometria cerebral	43
4.2	Análise de enriquecimento funcional	48
4.3	Análise de perfis transcricionais.....	52
4.3.1	<i>Tumbleweed e Minibrain</i>	52
4.3.2	<i>ATP sintase-β e ADP/ATP translocase</i>	53
4.3.3	<i>Via Insulina/TOR</i>	54
4.3.4	<i>Hexamerinas</i>	57
4.3.5	<i>Sistema Incov-1/LOC 726407</i>	58

4.3.6	<i>Caspase-1</i>	58
4.3.7	<i>Receptor de ecdisteroides</i>	59
4.4	Tratamentos hormonais	60
4.4.1	<i>Tratamento com hormônio juvenil</i>	61
4.4.2	<i>Tratamento com 20-hidroxiecdisona</i>	64
4.5	Imunofluorescência	67
4.5.1	<i>Imunolocalização da ATP sintase mitocondrial em cérebros de rainhas e operárias</i>	67
4.5.2	<i>Imunolocalização da Hexamerina 70a em cérebro de operárias</i>	69
5	DISCUSSÃO	71
5.1	Morfometria cerebral.....	71
5.2	Enriquecimento funcional	75
5.3	Análise do perfil transcricional e imunolocalização.....	77
5.3.1	<i>Tumbleweed e Minibrain</i>	79
5.3.2	<i>ATP sintase-β e ADP/ATP translocase</i>	82
5.3.3	<i>Via de sinalização Insulina/TOR</i>	86
5.3.4	<i>Hexamerinas</i>	88
5.3.5	<i>Sistema Incoy-1 e LOC 726407</i>	91
5.3.6	<i>Caspase-1</i>	93
5.3.7	<i>Receptor de ecdisteroides</i>	97
5.4	Tratamentos hormonais	100
6	CONCLUSÃO	105
	REFERÊNCIAS	106
	ANEXOS	125
	APÊNDICE	132

1 INTRODUÇÃO

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

1.1 Biologia da espécie *Apis mellifera*

As abelhas da espécie *Apis mellifera* são insetos pertencentes à ordem Hymenoptera e família Apidae, que apresentam metamorfose completa, sendo por isso, classificados como holometábolos. Após o período embrionário, que dura aproximadamente três dias, ocorre a eclosão das larvas. Estas passam por cinco estágios de desenvolvimento seguidos de respectivas mudas, após os quais ocorre uma muda metamórfica que marca a transição larva-pupa. O período larval é caracterizado por intensa alimentação e crescimento. Em contraste, durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato os indivíduos não mais se alimentam, mas fazem uso de reservas nutricionais previamente armazenadas para realizarem a substituição dos tecidos larvais por tecidos adultos. Os eventos observados durante estas fases sofrem são coordenados pelos ecdisteróides e hormônios juvenis, duas classes de hormônios importantes no desenvolvimento e reprodução de insetos (CRUZ-LANDIM, 2009; HARTFELDER; ENGELS, 1998).

A espécie *A. mellifera* é classicamente conhecida por sua organização altamente eussocial, ou seja; as colônias mostram sobreposição de gerações, há cuidado cooperativo da prole, divisão do trabalho reprodutivo e diferenças morfológicas entre as castas (WILSON, 1971; WILSON, 2008). Na organização social destas abelhas existem três tipos de indivíduos adultos: operárias, rainhas e zangões. Os zangões são os machos da colônia e tem a função de fecundar a rainha durante o voo nupcial. As rainhas são férteis, apresentam tamanho maior, vivem mais e desempenham funções reprodutivas. Por outro lado, as operárias são estéreis, menores em comprimento e executam tarefas de manutenção da colônia; dentre as quais podemos citar o cuidado com a prole, limpeza, nidificação, forrageamento e guarda (PAGE; PENG, 2001).

A diferenciação das castas, rainhas e operárias, na espécie depende do tipo de alimentação recebida durante o período larval, haja vista que todas as larvas são genomicamente capazes de se diferenciar em ambas as castas (BEETSMA, 1979). Após a eclosão dos ovos, até por volta do terceiro ínstar, todas as larvas fêmeas são bipotentes e alimentadas com geleia real. A partir de então a alimentação passa a ser casta-específica, de modo que qualquer larva destinada a se tornar uma rainha continua a ser alimentada com grandes quantidades de geleia real. Em contrapartida, as larvas selecionadas para se tornarem operárias passam a receber uma mistura de geleia real, mel e pólen, a qual é denominada geleia de operárias (MICHENER, 1969). A composição bioquímica desses dois tipos de alimento é bastante diferente. A geleia real apresenta composição de carboidratos cerca de três vezes maior do que a geleia de operárias e quantidade reduzida de ácidos ribonucleicos de cadeia curta (miRNAs), bem como diferenças na composição proteica. Há também diferenças na quantidade de alimento ofertado às larvas. As rainhas em desenvolvimento recebem quantidades muito maiores de alimento do que aquelas destinadas à casta operária (CORONA; ESTRADA; ZURITA, 1999; ZHU et al., 2017; KAMAKURA, 2011).

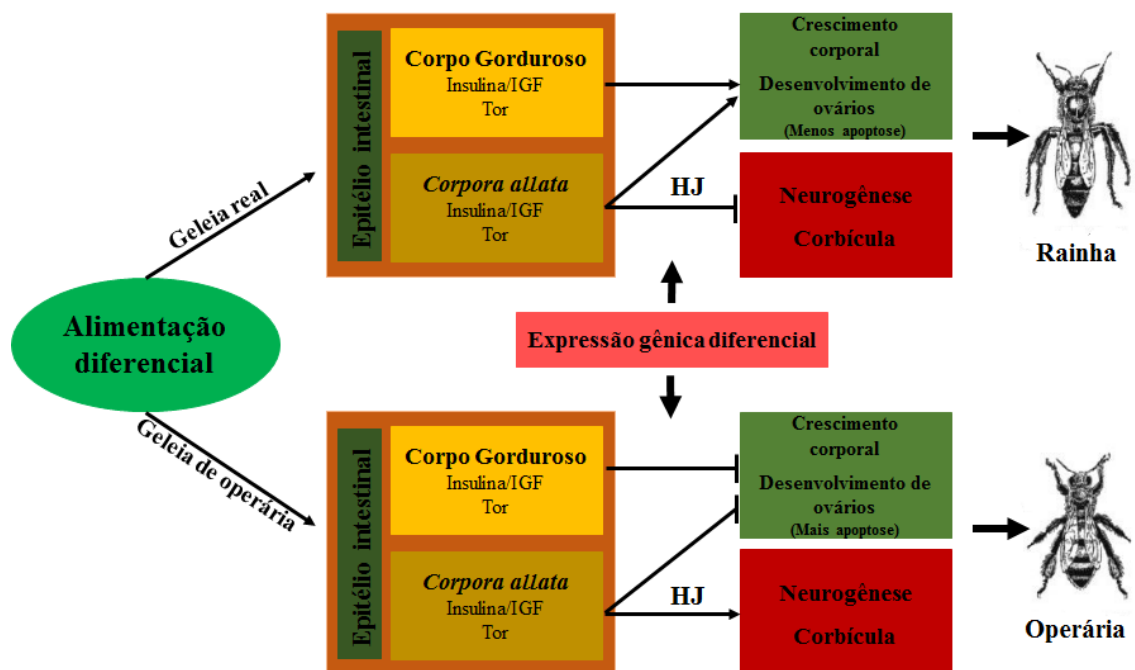
Em *A. mellifera* a alimentação diferencial desencadeia respostas neuroendócrinas marcadas por diferenças nos títulos de um hormônio produzido por um par de glândulas localizadas no complexo retrocerebral (*corpora allata*), o hormônio juvenil (NIJHOUT; WHEELER, 1982). É sabido que entre o terceiro e início do quinto estágio larval os títulos do hormônio juvenil (HJ) são bem mais elevados em rainhas quando comparados com operárias. O HJ é um dos mais clássicos e mais importantes fatores endógenos determinantes para o desenvolvimento de castas em *A. mellifera* (RACHINSKY et al., 1990). No entanto, muitos aspectos do processo de determinação de castas nestas abelhas ainda permanecem pouco compreendidos, principalmente no que se refere aos determinantes genéticos da diferenciação de rainhas e operárias.

1.2 Alimentação e morfogênese diferencial EM *Apis mellifera*

Com o advento de técnicas avançadas de biologia molecular foi possível em 2006 sequenciar o genoma de *A. mellifera*, o que alavancou as pesquisas que objetivavam descobrir os determinantes moleculares por trás da diferenciação de castas na espécie. Foi neste contexto

que foram propostos os primeiros modelos para explicar tal diferenciação. Baseados em análise da expressão gênica diferencial entre rainhas e operárias entre o terceiro e quarto estágio larval, Barchuk e colaboradores (2007) sugeriram que a informação nutricional é reconhecida por receptores presentes nas células epiteliais do intestino que, por meio do sistema nervoso estomatogástrico, é transmitida ao cérebro e ao sistema endócrino retrocerebral, o que resulta na regulação da atividade dos *corpora allata*. Outro órgão de detecção de informações nutricionais é o corpo gorduroso, que recebe a informação diretamente da hemolinfa. Em síntese, a informação nutricional provinda da geleia real leva à ativação da via insulina/IGF e do sistema Tor (*target of rapamycin*), que, em conjunto, são capazes de promover o aumento da síntese de HJ levando ao desenvolvimento de rainhas (FIGURA 1).

Figura 1. Modelo proposto por Barchuk e colaboradores (2007) para explicar as vias de sinalização determinantes da diferenciação de castas em *A. mellifera*.



Fonte: Modificado de BARCHUK et al., 2007.

Com o aumento dos níveis de HJ, há alterações na expressão de vários genes, dentre os quais estão alguns de caráter fisiometabólico que, em conjunto com nutrientes presentes na geleia real, são capazes de determinar o padrão de crescimento corporal. O hormônio juvenil parece atuar determinando dois tipos de alterações no padrão de desenvolvimento. Primeiro,

alterações de aquisição, as quais determinam um maior crescimento corporal da larva e de campos específicos como ovários; e segundo, alterações de perda de estruturas específicas, como órgão coletor de pólen e glândulas de cera. Adicionalmente, o HJ demonstra ser controlador do desenvolvimento neural nas larvas, promovendo desenvolvimento cerebral mais expressivo em rainhas quando compradas com operárias. Isso confere ao padrão de alimentação das larvas papel primordial na gênese do sistema nervoso (BARCHUK et al., 2007; MODA et al., 2013).

Apesar de o alimento ser tido como um clássico fornecedor de energia e matéria-prima para a construção de biomoléculas essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência dos seres vivos, dados recentes têm demonstrado papéis mais pontuais da alimentação, exemplo disso é a sua capacidade de influenciar diretamente a neurogênese. Pesquisas utilizando roedores demonstraram que a redução na ingestão de calorias aumenta a neurogênese hipocampal, bem como altera a expressão gênica na região. Tal alteração é responsável pelo aumento da produção de fatores neurotróficos responsáveis pela proliferação e diferenciação neural no hipocampo (LEE; SEROOGY; MATTSON, 2002). Seguindo a mesma linha de raciocínio, Park e co-autores (2010) relataram que dietas ricas em gorduras prejudicam a proliferação de células progenitoras neurais em decorrência do aumento da peroxidação lipídica e diminuição do fator neurotrófico derivado do cérebro no hipocampo de ratos, o que leva a disfunções cognitivas, de aprendizagem e memória. As vitaminas, outros importantes componentes da dieta, mostram-se essenciais para a neurogênese. Animais tratados com dieta pobre em vitamina E apresentam alterações na atividade de alguns genes, dentre eles genes responsáveis pela produção de mielina, lipídeo indispensável para a neurotransmissão (HYLAND et al., 2006). Ademais, a deficiência de vitamina A em roedores se mostrou capaz de desregular a neurogênese hipocampal (BONNETTI et al., 2008).

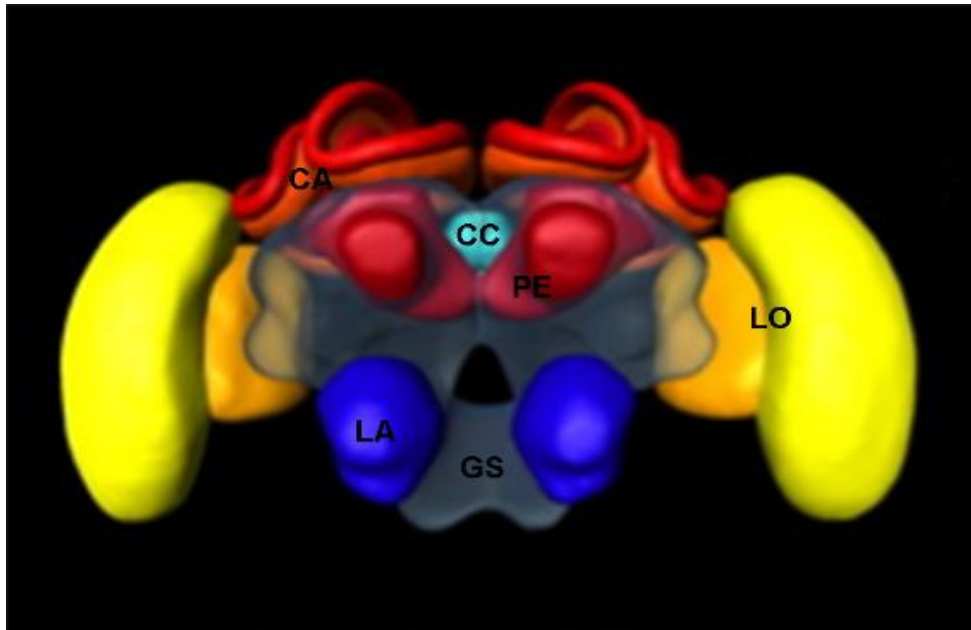
Nas abelhas *A. mellifera*, a alimentação também parece ter papel chave na morfogênese do sistema nervoso. O padrão alimentar diferencial da espécie, nos primeiros estágios do desenvolvimento, configura-se como um experimento natural capaz de fornecer informações relevantes para a identificação das cascatas gênicas nutricionalmente influenciadas e envolvidas no processo de desenvolvimento do sistema nervoso (MODA et al., 2013).

1.3 Desenvolvimento do cérebro em *Apis mellifera*

Em *A. mellifera* o cérebro diferencia-se a partir da ectoderme da cabeça embrionária e os glânglios corporais são derivados do cume da neuro-ectoderme (SNODGRASS, 1984). Localizado acima do gânglio subesofágico, o cérebro, juntamente com um longo cordão ventral, três gânglios no tórax e oito no abdômen formam o sistema nervoso das abelhas (NIVEN; GRAHAM; BURROWS, 2008).

O cérebro de *A. mellifera* e dos demais insetos pode ser dividido em duas porções, uma supraesofágica, onde se localizam o protocérebro, o deutocérebro e o tritocérebro, e um porção subesofágica (HOWSE, 1975). O protocérebro é composto pelos os lóbulos ópticos, o complexo central e um par de corpos cogumelares. Os lóbulos ópticos recebem e processam informação sensorial proveniente dos olhos compostos. O complexo central conecta e coordena informações de ambos os hemisférios cerebrais e está supostamente envolvido no controle motor (BRANDT et al., 2005; STRAUSS, 2002). Os corpos cogumelares são estruturas situadas simetricamente em cada um dos lados do protocérebro e são o centro de processamento neural e armazenamento de informações sensoriais (FARRIS; DYKE, 2015). O deutocérebro constitui-se dos lóbulos dorsais e os antenais, os quais contêm aproximadamente 160 glomérulos que recebem informações sensoriais advindas dos receptores olfativos antenais. O tritocérebro possui tamanho reduzido e é composto por dois lóbulos bilaterais, localizados na base do cérebro. Estes lóbulos são conhecidos por terem conexões sensoriais e motoras com o aparelho bucal e o trato digestivo (MOBBS, 1982) (FIGURA 2).

Figura 2. Representação anatômica do cérebro de *A. mellifera*.



Fonte: Modificado de BRANT et al., 2005.

Nota: (CA) cálices, (CC) complexo central, (PE) pedúnculo, (LO) lóbulo óptico, (LA) lóbulo antenal, (GS) gânglio subesofágico.

Apesar de terem arquitetura semelhante, o cérebro das castas de *A. mellifera* apresenta um desenvolvimento heterocrônico. Roat e Cruz-Landim (2008) mostraram que o cérebro de rainhas possui maior área de neuroblastos em relação ao cérebro de operárias durante o último estágio larval. As taxas de proliferação celular no cérebro também favorecem à casta reprodutora, que entre o quarto e o quinto ínstar larval demonstram ter maior número de células em processo de divisão celular (MODA et al., 2013). O maior número de neuroblastos e as maiores taxas proliferativas favorecem o desenvolvimento do cérebro de rainhas e estabelecem a assincronia em relação à neurogênese em operárias.

Nosso grupo de pesquisa, utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) em Tempo Real, hibridação *in situ*, ensaios de proliferação celular e técnicas imunohistoquímicas, estudou a neurogênese larval nas castas de *A. mellifera*. Neste trabalho, Moda e colaboradores (2013) demonstraram que a expressão do gene *short stop* (*shot*) é decisiva para a neurogênese diferencial em larvas favorecendo às futuras rainhas. Este gene é importante para o aumento da extensão de axônios, sendo ele mais expresso em rainhas no quarto ínstar larval, o que pode explicar a existência de uma área maior ocupada por neuroblastos em rainhas nos últimos estágios do desenvolvimento larval. Outro gene investigado no estudo foi o *GlcAT-P* (glucoroniltransferase-P), mais expresso em cérebros de rainhas ao longo de todo o período

larval. Já foi demonstrado que esse gene é essencial para o desenvolvimento de nervos periféricos em *Drosophila melanogaster* e desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico em roedores. Deste modo, acredita-se que *shot* e o *GlcAT-P*, em conjunto, executem função fundamental no desenvolvimento do cérebro de rainhas na fase larval. Com este trabalho, ficou evidente que a expressão diferencial de determinados genes gera uma dinâmica de desenvolvimento cerebral diferente entre rainhas e operárias, de modo que durante o período larval o cérebro de rainha se desenvolve mais e mais rapidamente. Estruturas cerebrais como cálices e pedúnculos surgem antes em larvas de rainhas do que em larvas de operárias (MODA et al., 2013).

Durante o período pupal e adulto-farato, pouco se sabe em relação à dinâmica de desenvolvimento do cérebro das castas de *A. mellifera*, entretanto é amplamente conhecido que o cérebro de operárias adultas é proporcionalmente maior do que o de rainhas (MICHENER, 1974). Ao redor da metade do período pupal/adulto-farato observa-se o fim da proliferação de neuroblastos e o início de eventos apoptóticos que são coincidentes com o aumento dos títulos de ecdisteroides (HARTFELDER; ENGELS, 1998; GANESHINA et al., 2000). Ambos eventos parecem, assim, obedecer ao mesmo sinal hormonal, e foi sugerido que com a participação dos mesmos fatores da progressão do ciclo celular, as proteínas retinoblastoma e p53 (GANESHINA et al., 2000). Além do mais, foi demonstrado que a exposição prematura de pupas, de maneira exógena, ao hormônio 20-hidroxiecdisona provoca uma redução na atividade mitótica dentro dos centros de proliferação dos corpos cogumelares das abelhas. Ademais, foi observada, por meio de marcadores celulares, a antecipação da morte celular no cérebro das pupas com o pico de hormônios ecdisteróides (GANESHINA et al., 2000; MALUN; MOSELEIT; GRUNEWALD, 2003). Em conjunto, estes resultados, sugerem a existência de uma cascata de reações promovida pelo ambiente hormonal característico do período de desenvolvimento pupal/adulto-farato, que levaria à morfogênese diferencial do cérebro adulto entre rainhas e operárias mediante a geração de padrões casta-específicos de expressão gênica.

Neste marco, resultados recentes de hibridação de lâminas de *microarray* de oligonucleotídeos com amostras de ácido ribonucleico (RNA) de cérebro de pupas de operárias e rainhas mostraram que essa morfogênese diferencial encontra-se relacionada à expressão diferencial de um conjunto de genes positivamente regulados em cérebros de operárias, os quais podem estar diretamente relacionados à morfogênese cerebral diferencial na espécie (OLIVEIRA, 2014). Sendo assim, esse conjunto de dados configura-se como um excelente

ponto de partida para a identificação dos determinantes genéticos da morfogênese diferencial em castas *A. mellifera*.

Diante disso, o presente trabalho objetivou estudar as dinâmicas de desenvolvimento cerebral em castas de *A. mellifera* durante o período pupal e adulto-farato, bem como e identificar os mediadores genéticos deste processo. Nossa hipótese inicial é que durante o período pupal e/ou adulto-farato, ocorre uma alteração no padrão de desenvolvimento cerebral em favor das operárias, em resposta a ação de genes hormonalmente modulados. Para testar esta hipótese, lançamos mão de abordagens morfológicas e moleculares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a dinâmica de desenvolvimento e identificar os determinantes genéticos da morfogênese diferencial do cérebro em castas de abelhas *Apis mellifera*.

2.2 Objetivos específicos

Abaixo são listados os objetivos específicos do presente trabalho.

- a) Analisar por meio de morfometria cerebral a dinâmica morfológica do desenvolvimento do cérebro de rainhas e operárias durante o período pupal e adulto-farato;
- b) Realizar análise de enriquecimento funcional de genes diferencialmente expressos no cérebro de rainhas e operárias, obtidos mediante hibridação de lâminas de *microarray* de oligonucleotídeos;
- c) Verificar, por reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (RT-qPCR), o perfil de transcrição dos genes *tum*, *mnb*, *ATPsyn β* , *ant*, *InR-1*, *InR-2*, *ILP-1*, *ILP-2*, *hex 70a*, *hex 70b* e *hex 110*, *caspase-1*, *LOC 726407*, das isoformas A (*EcR-A*) e B (*EcR-B*) do receptor de ecdisteroides e do RNA longo não codificador *lncov-1*; em cérebros de pupas e adultos-farato de ambas as castas;
- d) Verificar a influência da administração tópica de hormônio juvenil sobre a transcrição de *tum*, *mnb*, *ATPsyn β* , *ant*, *ILP-1*, *ILP-2*, *caspase-1* e *lncov-1* em cérebros de adultos-farato de olho rosa;

- e) Verificar a influência da injeção de 20-hidroxiecdisona (20E) sobre a transcrição de *tum*, *mnb*, *ATPsyn β* , *ant*, *ILP-1*, *ILP-2*, *caspase-1* e *Incov-1* em cérebros de adultos-farato de olho rosa;
- f) Imunolocalizar, em cérebros de adultos-farato Pbm, os produtos proteicos dos genes *ATPsyn β* e *hex 70a*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas abelhas *A. mellifera* africanizadas provenientes do Apiário Experimental do Grupo de Pesquisa Biologia da Socialidade da Universidade Federal de Alfenas e Apiário Experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. As amostras de rainhas foram obtidas de duas maneiras: (I) após postura controlada ou (II) mediante transferência de larvas recém-eclodidas provenientes de ovos naturalmente ovipositados. Para postura controlada, a rainha da caixa foi aprisionada em gaiola por um período de 6h para que ovipusesse em uma região delimitada do quadro. Nas duas situações, as larvas recém-eclodidas foram transferidas para realeiras artificiais contendo uma gota de geleia real comercial diluída em água destilada (1:1). A obtenção das amostras nos estágios de interesse para este trabalho obedeceu ao descrito no quadro 1.

Quadro 1. Características utilizadas para classificar o desenvolvimento pós-larval de operárias e rainhas de *A. mellifera* africanizadas.

Fase	Caracterização
Pw	Pupa de olho Branco (<i>White</i>)
Pp	Adulto-farato de olho rosa (<i>Pink</i>)
Pdp	Adulto-farato de olho rosa-escuro
Pb	Adulto-farato de olho marrom (<i>brown</i>)
Pbl	Adulto-farato de olho marrom, com pigmentação torácica leve
Pbm	Adulto-farato de olho marrom, com pigmentação torácica intermediária
Pbd	Adulto-farato de olho marrom, com pigmentação torácica forte
NE	Adulto recém-emergido

Fonte: Modificado de MICHELETTE; SOARES (1993).

3.1 Morfometria cerebral

3.1.1 *Dissecção e desidratação dos cérebros*

As análises morfométricas dos cérebros foram feitas mediante inclusão do material em historesina e coloração com Fucsina, Azul de metileno e Tetraborato de sódio. Para tanto, os cérebros foram dissecados em paraformaldeído 4% e posteriormente mantidos por 4 h na mesma solução, a uma temperatura de 4°C, para que fossem fixados. Após o período de fixação, os cérebros foram lavados com solução tampão fosfato-salino 1x (PBS; 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄), colocados em etanol 75% e mantidos a 4°C. Decorridas 24h, os cérebros foram desidratados por meio de imersão em uma bateria de etanol de concentrações 75%, 90% e 95%, permanecendo imersos em cada uma das soluções alcoólicas por um período de 30 minutos.

3.1.2 *Inclusão em Historesina*

Após a desidratação, os cérebros foram infiltrados e incluídos em solução de metacrilato glicol (Historesina *Leica*, Lote: 010274). O preparo da solução de infiltração seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante (50 mL de resina líquida + 0,5 g do ativador). Na intenção de garantir uma perfeita infiltração da resina nos tecidos, procedeu-se uma etapa de pré-infiltração, a qual consistiu em incubar os cérebros em solução de infiltração/etanol 95% (1:1) *overnigh*. Após a pré-infiltração, os cérebros foram infiltrados com solução de infiltração por 24 h. Findado este período, os órgãos foram transferidos para formas trapezoidais contendo historesina + polimerizador (15:1) e assim deixados a temperatura ambiente por 24 h. Em seguida, foram colocados em estufa a 40°C por 3 h para a total polimerização do material de inclusão.

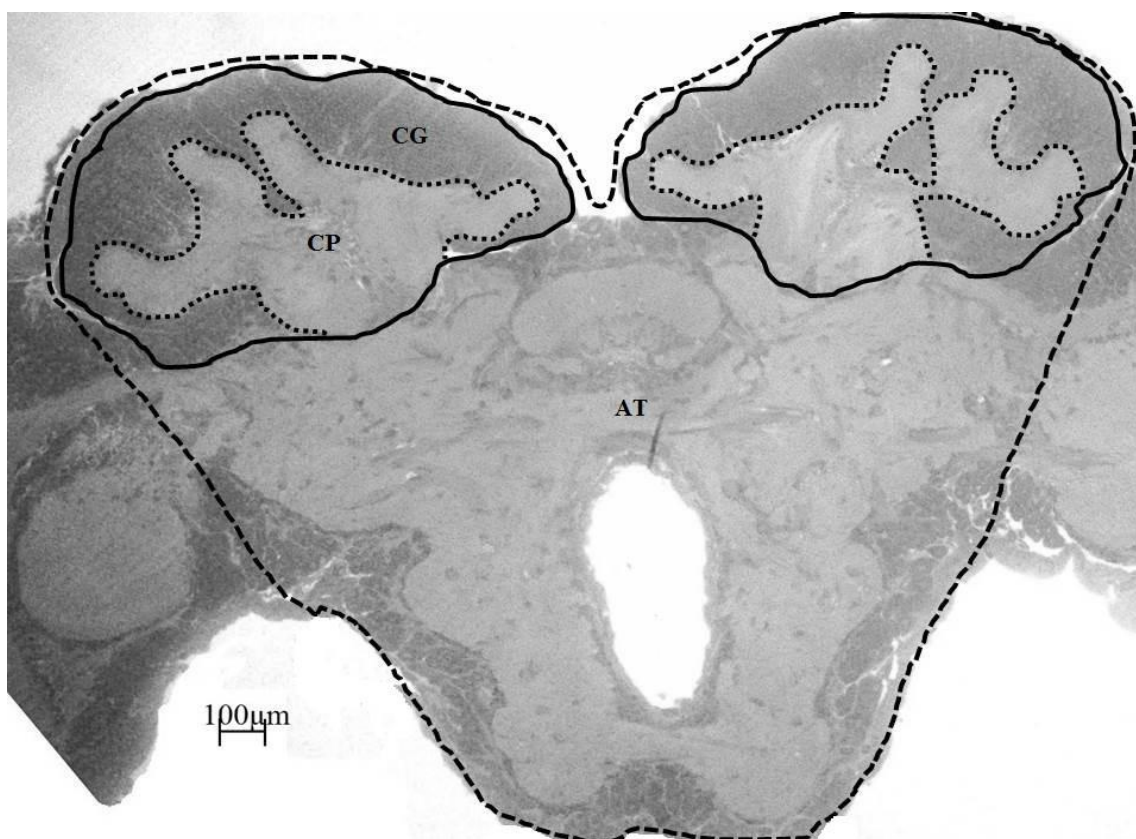
3.1.3 Cortes em micrótomo e coloração

Os blocos de resina contendo os cérebros foram fixados em suporte de madeira (2,5 x 2,5 x 1,5cm) e cortados em série com auxílio de navalhas de vidro. Utilizando micrótomo Leica (RM 2135) foram feitos cortes a uma espessura de 3 μm . Seguidamente, os cortes foram colocados em água destilada para serem esticados e posteriormente acomodados em lâminas de vidro, as quais foram antecipadamente lavadas com detergente e etanol 75%. As lâminas contendo os cortes foram acondicionadas em estufa à temperatura de 50°C por 2 horas, para permitir maior adesão dos cortes na superfície das lâminas. Em seguida, os espécimes histológicos foram corados com Fucsina, Azul de metileno e Tetraborato de sódio e as lâminas foram montadas em meio de montagem para microscopia de luz (Entellan®, Lote:107960).

3.1.4 Análise dos cortes

Concluída a etapa de confecção e coloração das lâminas, os cortes foram fotografados com o auxílio do microscópio Zeiss Axio, acoplado ao software *Zeiss Axio Vision*. Em seguida, com a utilização do software ImageJ, foram realizadas as análises morfométricas mediante mensuração da área total do cérebro, dos corpos cogumelares e corpos pedunculares (lobos α , β e cálices) de rainhas e operárias nas fases de desenvolvimento Pw, Pdp, Pbm, Pbd e NE (Quadro 1). As estruturas cerebrais que tiveram suas áreas mensuradas estão delimitadas na figura 3.

Figura 3. Corte histológico do cérebro de abelha *A. mellifera* demonstrando as estruturas cerebrais alvos de análises morfométricas.



Fonte: Do autor.

Nota: Área total do cérebro (AT) delimitada pela linha pontilhada maior. Corpo cogumelar (CG) delimitado pela linha contínua. Corpo peduncular (CP), delimitado pela linha pontilhada menor.

3.2 Comprimento corporal

Com o intuito de obter a relação do tamanho do cérebro em função do tamanho do corpo, a área total do cérebro de abelhas NE, mensurada conforme descrição apresentada no item 3.2, foi dividida pelo comprimento corporal em centímetros. Para a obtenção das medidas de comprimento corporal, rainhas e operárias NE foram previamente anestesiadas por frio e colocadas em posição estendida sobre uma superfície plana. As aferições foram feitas com auxílio de paquímetro analógico.

3.3 Análise de enriquecimento funcional

Nossas análises de expressão gênica partiram inicialmente de dados previamente obtidos em nosso laboratório, mediante hibridação de lâminas de *microarray* de oligonucleotídeos de DNA com amostras de RNA de cérebros de rainhas e operárias Pp (OLIVEIRA, 2014). Essa abordagem permitiu identificar um total de 382 genes com expressão diferencial entre as castas. Diante da lista dos genes diferencialmente expressos (DGEs), realizamos a atualização da anotação gênica utilizando a ferramenta BLAST do National Center for Biotechnology Information (NCBI) para verificar se ainda havia correspondência entre a sonda utilizada na hidridização e o gene inicialmente anotado. Posteriormente, a lista de DGEs foi utilizada para busca de ortólogos em *D. melanogaster*, utilizando o software online g:Profiler (REIMAND et al., 2016). Os ortólogos encontrados serviram de base para as análises de enriquecimento funcional realizadas por meio do software DAVID (HUANG, SHERMAN, LEMPICKI, 2009). Foram consideradas funções enriquecidas aquelas com $P < 0,05$ e número de genes > 2 (LIU et al, 2019).

3.4 Análise do perfil transcricional

3.4.1 Dissecção de cérebros

Para proceder à análise dos níveis de transcrição, os cérebros foram obtidos por meio de dissecção em solução salina (NaCl 0,9%) preparada em água DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma, Lote: BCBH1317V) estéril. Com auxílio de alfinetes, as abelhas foram fixadas em uma placa de Petri contendo parafina sólida de cor preta, a qual foi posicionada em lupa Nikon SMZ800. Utilizando pinças cirúrgicas de ponta afiada, foi retirada a cutícula da região cefálica, o cérebro foi localizado, limpo e separado dos lobos ópticos e dos ocelos. A massa encefálica foi transferida para um microtubo de 2 mL contendo 500 μ L de reagente TRI Reagent® (Sigma, Lote: BCBT8883). Os tubos contendo as amostras foram armazenados em freezer a uma temperatura de -80°C até o momento da extração do RNA.

Para as análises dos níveis de transcrição gênica, foram coletadas três amostras biológicas de quatro diferentes fases de desenvolvimento (Pw, Pp, Pb e Pbm). Cada uma das amostras biológicas consistiu-se de um pool de 15 cérebros.

3.4.2 Extração de RNA total

No momento da extração de RNA total, os microtubos contendo os cérebros foram descongelados e adicionaram-se a eles 500 μ L de TRI Reagent® (Sigma, Lote: BCBT8883). Em seguida, os cérebros foram macerados em TRIzol® até formarem uma solução homogênea e permaneceram em repouso em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio (Synth, Lote: 124741), os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex por 15 segundos e mantidos a temperatura ambiente por 3 min. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos sob rotação de 12000 x g a 4°C (Sorvall Legend X1R Centrifuge, Thermo Scientific). Decorrido o tempo de centrifugação os sobrenadantes foram coletados e transferidos para microtubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 500 μ L de isopropanol (Vetec, Lote: 1201735). O conteúdo foi homogeneizado por inversão e armazenado a -20°C *overnight* para precipitação do RNA. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas por 1 hora (12000 x g a 4°C). Após a centrifugação, foi possível observar a precipitação do RNA no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi lavado duas vezes com 1mL de etanol (Synth, Lote:104434) 75% gelado, acrescido de 0,1% de DEPC. A lavagem foi feita por meio de inversão manual do tubo, seguida de centrifugação por 5 minutos (7500 x g a 4°C). Após as lavagens e o descarte do sobrenadante, o RNA foi seco em termobloco (Cienlab Dry-Block, N480D) a 55°C e ressuspendido em 20 μ L de água DEPC.

Para verificar a quantidade e a pureza do RNA extraído, as amostras foram submetidas a espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) nos comprimentos de onda 260 e 280 nanômetros (nm). Para a determinação da pureza da amostra foi calculada a razão entre as leituras de 260 e 280 nm, que foi considerada ótima quando compreendida entre 1,9 e 2,0; tendo em vista que os ácidos nucleicos absorvem mais luz no comprimento de onda 260 nm e proteínas 280 nm.

3.4.3 Desenho, síntese e teste de primers para os ensaios de RT-qPCR

Durante a condução deste trabalho foi estudado o padrão de expressão de 17 transcritos provenientes de 15 genes, os quais foram escolhidos a partir de informações relacionadas aos já conhecidos determinantes genéticos da determinação de castas em *A. mellifera* e dos resultados do *microarray* de Oliveira (2014). A lista dos genes e suas respectivas funções primordiais encontra-se resumida no quadro 2.

Quadro 2. Genes que foram alvos de estudo no presente trabalho.

Gene (símbolo)	Função	Referência
Tumbleweed (<i>tum</i>)	Neurogênese	Gao et al., 1999
Minibrain (<i>mnb</i>)	Neurogênese	Tejedor et al., 1995
ATP sintase subunidade beta (<i>Atsynβ</i>)	Síntese de ATP	Stock; Leslie; Walker, 1999
ADP/ATP translocase (<i>ant</i>)	Translocador mitocondrial ADP/ATP	Klingenberg, 2008
<i>caspase-1</i>	Morte celular	Wu et al., 2015
Receptor insulínico 1 (<i>InR-1</i>)	Via de sinalização da insulina	Azevedo; Hartfelder, 2008
Receptor insulínico 2 (<i>InR-2</i>)	Via de sinalização da insulina	Azevedo; Hartfelder, 2008
Peptídeo semelhante à insulina 1 (<i>ILP-1</i>)	Via de sinalização da insulina	Azevedo; Hartfelder, 2008
Peptídeo semelhante à insulina 2 (<i>ILP-2</i>)	Via de sinalização da insulina	Azevedo; Hartfelder, 2008
Proteína alvo da rapamicina (<i>Tor</i>)	Sensibilidade a nutrientes	Patel et al., 2007
Hexamerina 70a (<i>hex 70a</i>)	Proteína de estocagem	Cunha et al., 2005; Martins et al., 2010
Hexamerina 70b (<i>hex 70b</i>)	Proteína de estocagem	Cunha et al., 2005; Martins et al., 2010
Hexamerina 110 (<i>hex 110</i>)	Proteína de estocagem	Cunha et al., 2005; Martins et al., 2010
Receptor de ecdisteroides isoformas A e B (<i>EcR-A</i> e <i>EcR-B</i>)	Via de sinalização dos ecdisteroides	Mello et al., 2014
<i>LOC726407</i> e <i>lncov-1</i>	Morte celular em ovários	Humann; Tibério; Hartfelder, 2013

Fonte: Do autor.

Para 13 transcritos já haviam *primers* desenhados, cujas sequências estão disponíveis na literatura. Para os demais, que ainda não foram estudados em *A. mellifera*, foram desenhados *primers* utilizando o *software* Primer Express (versão 3.0, Applied Biosystems). No quadro 3 encontram-se listadas as sequências dos *primers* utilizados, bem como suas respectivas temperaturas de *melting* e o tamanho dos fragmentos esperados após amplificação por PCR.

Quadro 3. Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados durante as análises de RT-qPCR.

Gene	Sequências (5'-3')	T _m	Pb
<i>tum</i> *	F: TCG GAT TAT GGG CAG ACT TTG R: TGG TAT AAA GCA GCA TCA GCA TCT	60°C	73
<i>mnb</i> *	F: AAG GGA AAT GAG AAC GGG AAA R: CAA AAC GAT GAA ATG CAA AGC A	60°C	70
<i>ATPsynβ</i> *	F: ACG TGC TCG TGT CGC TTT AA R: TGT CCT TCT TGA TCA CGG AAA TAT T	60°C	63
<i>ant</i> *	F: TGA ACG TGT GAA GCT GTT GCT R: TGG ATT GCG CAC AAA ACA AT	56°C	100
<i>caspase-1</i>	F: AAT GTC CTA CAC TTT CTG GAA AAC C R: ATG AAC CAT GAA CCG CGA GTG	65°C	217
<i>InR-1</i>	F: GGA TCT GGT GTG GGA CAG TT R: ATC CCC ACG TCG AGT ATC TG	60°	151
<i>InR-2</i>	F: GGG AAG AAC ATC GTG AAG GA R: CAT CAC GAG CAG CGT GTA CT	60°	171
<i>ILP-1</i>	F: CGA TAG TCC TGG TCG GTT TG R: CAA GCT GAG CAT AGC TGC AC	60°C	237
<i>ILP-2</i>	F: TTC CAG AAA TGG AGA TGG ATG R: TAG GAG CGC AAC TCC TCT GT	60°C	165
<i>Tor</i>	F: AAC AAC TGT TGC TGA CGG TG R: GTT GCA GTC CAG GCT TTT TG	60°C	153
<i>Hex70a</i>	F: AAA GCC AAT CAC GCT CTG AT R: AAT CGT GAT TCA GAT ACC AGC	60°C	110
<i>Hex70b</i>	F: ATA CGA CGA GTT CGG TCA TG R: ACG AAG ACA GAT TCG TGG CT	60°C	141
<i>Hex110</i>	F: GGC GGA GGA ATT CAG CAA AA R: TGG CCT ACA GGA TTC TGG AT	60°C	152

<i>EcR-A</i>	F: CCA ACA GCA ACA ACG GCT AC R: AAA GAG CCA GGC TGC GAC AA	60°C	107
<i>EcR-B</i>	F: ACA GTG TTG CCA ACG GTC AC R: AAA GAG CCA GGC TGC GAC AA	60°C	87
<i>LOC 726407</i>	F: CGA GGT AGC GGT TCC TAC AAG R: AAT GCT TCT GTC CGG AAC AT	60°C	127
<i>Incov-1</i>	F: GGA GAA GCT TTG GGG AGA G R: CTG CTA CAC ACC ACC ATA AC	60°C	146
<i>RpL32</i>	F: CGT CAT ATG TTG CCA ACT GGT R: TTG AGC ACG TTC AAC AAT GG	60°C	150

Fonte: Do autor.

Nota: Os genes sinalizados com (*) tiveram seus primers desenhados no presente trabalho. Temperatura de anelamento (Tm). Tamanho do fragmento gerado em pares de base (Pb).

Os *primers* que necessitaram ser desenhados foram submetidos a teste de eficiência e tiveram suas curvas de calibração e de dissociação estabelecidas. Todos os quatro pares de *primers* mostraram-se eficientes com coeficiente de correlação angular acima de 0,9 e eficiência entre 80 e 120%. Os demais genes tiveram a sequência de *primers* retirada de artigos científicos que avaliaram a expressão dos mesmos em distintos contextos da biologia de *A. mellifera*. Essas referências estão descritas no quadro 4 abaixo.

Quadro 4. Referências bibliográficas de onde foram retiradas algumas das sequências de primers utilizadas no presente trabalho.

Genes	Referências
<i>caspase-1</i>	Wu et al., 2015
<i>InR-1; InR-2</i>	Azevedo; Hartfelder, 2008
<i>ILP-1; ILP-2</i>	Wang et al., 2013
<i>TOR</i>	Patel et al., 2007
<i>hex 70a; hex 70b; hex 110</i>	Martins et al., 2010
<i>EcR-A; EcR-B</i>	Mello et al., 2014
<i>LOC 726407; Incov-1</i>	Humann; Tibério; Hartfelder, 2013
<i>RpL32</i>	Lourenço et al., 2008

Fonte: Do autor.

3.4.4 Ensaios de RT-qPCR em tempo real

Anteriormente à análise quantitativa por PCR em tempo real, as amostras de RNA foram usadas como molde para a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) complementar (cDNA) por meio de transcrição reversa usando SuperScript® II Reverse Transcriptase (Lote: 1212314, Invitrogen) e Oligo dT₁₂₋₁₈ (Lote: 1858135, Life Technologies) como *primer*.

As RT-qPCR em tempo real foram realizadas utilizando SYBR® Green no sistema 7500 Real time PCR (Applied Biosystems). Todas as amostras foram analisadas em triplicatas biológicas e técnicas. As condições de reação foram: 7,4 µL de água Milli Q estéril, 10 µL de Power SYBR® PCR Mastermix (Lote: 1605525, Applied Biosystems), 0,8 µL de primer-F (10 µM), 0,8 µL de primer-R (10 µM) e 1 µL de cDNA (1:5). Uma exceção foram os *primers* para o gene *ant* que foram utilizados na concentração de 1 µM, na intenção de reduzir a formação de dímeros. O termociclador foi programado para executar um ciclo de 2 minutos a 50°C, 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos constituídos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto na temperatura de anelamento específica de cada par de primer. Ao final dos 40 ciclos de amplificação era executada a curva de dissociação dos *primers*. Os ensaios foram realizados seguindo as indicações MIQE (BUSTIN et al., 2009; <http://miqe.gene-quantification.info/>).

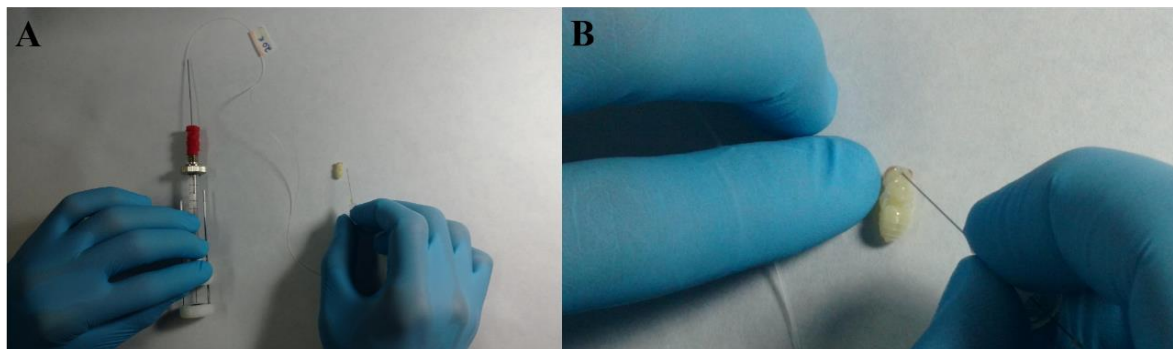
Os dados de amplificação gerados ao final da reação de RT-qPCR foram analisados seguindo a metodologia do $\Delta\Delta C_t$ comparativo, proposto por Pfaffl (2004). Na intenção de aumentar a confiabilidade dos dados gerados foi utilizado o software LinRegPCR versão 2015.4 para o cálculo do *threshold* (RAMAKERS et al., 2003).

3.5 Análise do efeito hormonal sobre a expressão gênica

Com a finalidade de verificar o efeito dos ecdisteroides e do hormônio juvenil sobre a expressão gênica, operárias adulto-farato de olho rosa foram tratadas com um dos hormônios e tiveram seus cérebros dissecados e o RNA extraído para posterior análise por RT-qPCR. Dentre os genes que se mostraram diferencialmente expressos no cérebro, foram escolhidos oito, cuja influência hormonal sob a expressão dos mesmos ainda não foi descrita na literatura. São eles: *tum*, *mnb*, *ATPsyn β* , *ant*, *ILP-1*, *ILP-2*, *caspase-1* e *lncov-1*. A expressão destes genes foi analisada em três diferentes tempos pós-tratamento: 1, 6 e 12 h. O processo de dissecação,

extração de RNA e RT-qPCR foi executado conforme descrito no item 3.4. A administração dos hormônios foi realizada com auxílio de microseringa tipo Hamilton para cromatografia gasosa, acoplada a uma agulha gengival 30G curta. O aparato de injeção utilizado e a forma e a região de administração podem ser vistos na figura 4.

Figura 4. Aparato utilizado durante as administrações hormonais.



Fonte: Do autor.

Nota: Em (A) temos uma microseringa tipo Hamilton (5 µL) unida a uma agulha gengival (30G) por meio de um tubo de polietileno (PE 10). Em (B) está sendo mostrada a forma e a região onde foram administrados os hormônios.

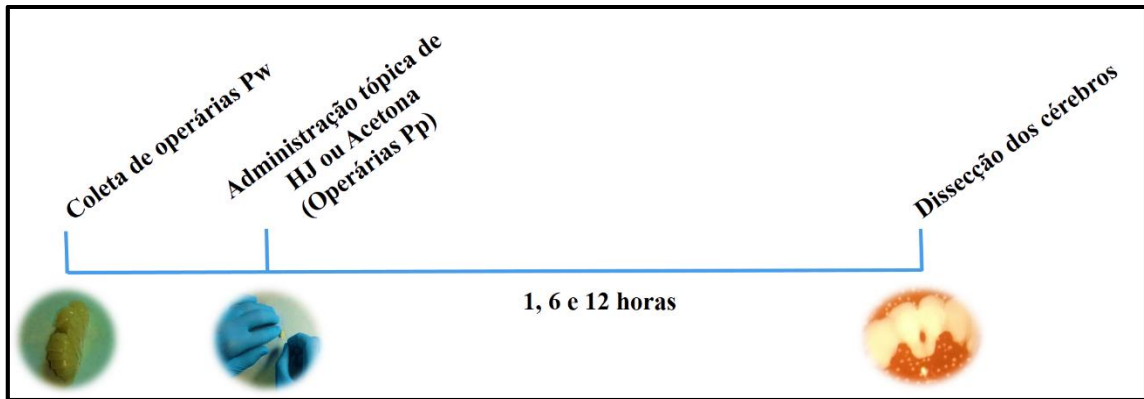
3.5.1 Tratamento com hormônio juvenil

Para a execução deste experimento foi utilizado Hormônio Juvenil III (HJ III, Lote: #SLBK4858V, Sigma-Aldrich) ressuspendido em tolueno (Vetec, Lote: 1345831) com 0,5% de 1,2 propanodiol (Sigma, Lote: 398039), constituindo assim a solução estoque. Anteriormente ao tratamento, o tolueno foi volatilizado com auxílio de nitrogênio gasoso e o HJ foi novamente ressuspendido, desta vez com acetona (Proquimios, Lote: 06/0150), para que obtivéssemos a solução de trabalho a ser administrada topicamente na região retro-ocular das abelhas.

Durante os ensaios de administração de HJ foram coletadas 45 pupas de olho branco, as quais foram mantidas em estufa com temperatura e umidade controladas ($33\pm 3^{\circ}\text{C}$ e 80%). Ao atingirem a fase de adulto-farato de olho rosa, elas foram divididas em três grupos: HJ, grupo em que cada indivíduo foi tratado com 2 µL de HJ III na concentração de 5 µg/µL; Veículo, grupo tratado com 2 µL de acetona e Controle, grupo que não recebeu tratamento. Para determinar o efeito temporal do HJ sobre a expressão gênica, foram tomadas amostras 1, 6 e

12 h após a administração. O desenho experimental deste ensaio encontra-se resumido na figura 5.

Figura 5. Resumo do desenho experimental utilizado para o tratamento das abelhas com hormônio juvenil.



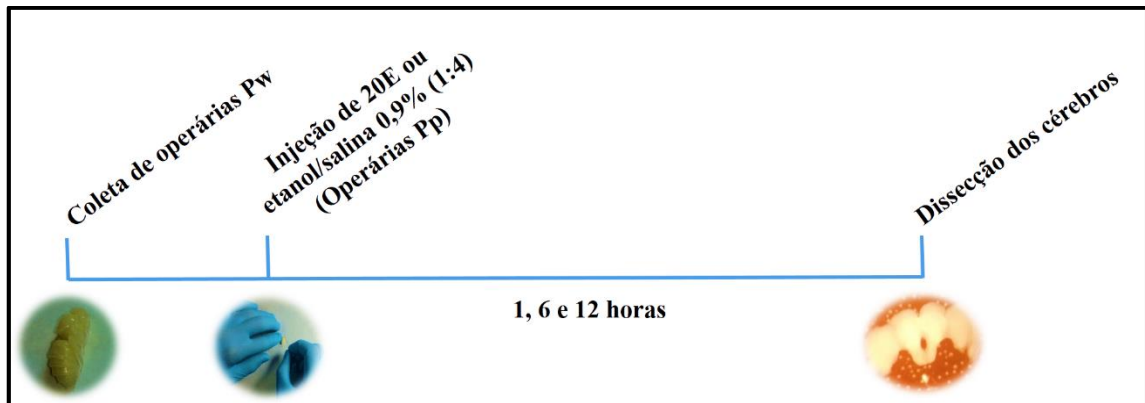
Fonte: Do autor.

3.5.2 Tratamento com 20-hidroxiecdisona (20E)

O efeito dos ecdisteroides sobre a expressão gênica também foi verificado utilizando 45 adultos-farato de olho rosa divididos em 3 grupos: 20E, abelhas tratadas com 2 μ L de 20-hidroxiecdisona (Sigma, Lote: H5142) na concentração de 2,5 μ g/ μ L; grupo veículo, tratado com 2 μ L de solução de etanol absoluto/salina 0,9% (1:4) e controle, grupo que não recebeu nenhum tipo de manipulação.

Devido sua dificuldade em atravessar a cutícula, a administração de 20E e de seu veículo foi feita mediante microinjeção na região retro-ocular. Assim como ocorrido durante os ensaios com o HJ, foram conduzidos três experimentos independentes para verificar o efeito temporal da 20E sobre a expressão gênica. O resumo do esquema experimental utilizado durante este ensaio encontra-se resumido na figura 6.

Figura 6. Resumo do desenho experimental utilizado para o tratamento das abelhas com 20-hidroxiecdisona.



Fonte: Do autor.

3.6 Imunofluorescência

Com a finalidade de visualizar *in situ* a expressão dos produtos proteicos dos genes *ATPsyn β* e *hex 70a* foi realizada a técnica de imunofluorescência indireta em cérebros inteiros de adultos-farato Pbm. Para a localização da hexamerina 70a foi utilizado anticorpo policlonal (Affinity Bio Reagentes, Golden, CO, EUA) específico para esta proteína, produzido a partir da sequência de aminoácidos SYKMHQKPYNKD (MARTINS et al., 2011). A subunidade beta da ATP sintase mitocondrial foi localizada de forma indireta mediante a utilização de um anticorpo específico para a subunidade alfa (Anti- ATPsyn α , MitoSciences, #MS507; ABCAM, Cambridge, MA, EUA) (SANTOS; ALBERICI E HARTFELDER, 2016). Esta localização indireta torna-se possível e sensata tendo em vista que as subunidades α e β são unidas umas às outras e estão presentes em números iguais, formando três trios na porção F1 da ATP sintase mitocondrial (FIGURA 27).

Os cérebros destinados à técnica de imunofluorescência foram dissecados utilizando solução tampão fosfato-salino 1x (PBS; 8g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄) pH 7,4 gelado e posteriormente fixados com paraformaldeído 4% por 30 minutos sob agitação. Após a fixação, os cérebros foram lavados 3x com PBST (PBS + 0,5% de Triton X-100).

Uma vez fixados, os cérebros foram permeabilizados duas vezes com Triton X-100 2% em PBS 1x, por 10 min. Em seguida, foram lavados com PBST por 10 min. Após a

permeabilização, procedeu-se ao bloqueio das ligações inespecíficas utilizando solução de PBST acrescida de 1% de albumina bovina sérica (Lote: SLBQ0908V, Sigma) por 5 min, sendo esse processo repetido 5 vezes. Em seguida, os cérebros foram incubados com a solução de PBST + albumina 1% (PBST₂) acrescida de 10% de soro de cabra (PBST₃) por 30 min. Decorrido o tempo de incubação com PBST₃, os cérebros foram incubados com anticorpo primário contra a hexamerina 70a ou contra ATP sintase- α , ambos na diluição de 1:200, por um período de 48h a 4°C. Findadas as 48 horas, os cérebros foram lavados com PBST₂ três vezes por 5 min e cinco vezes por 20 min. Por intermédio das lavagens todo o excesso de anticorpo primário foi retirado dos tecidos, restando apenas aquele ligado a epítomos específicos. Sendo assim, os cérebros foram incubados com anticorpo secundário Alexa fluor 488 por 2 h a temperatura ambiente, sendo que para hexamerina 70a foi utilizado anticorpo anti-rabbit e para ATP sintase- α anticorpo anti-mouse. Ao final desse processo, os cérebros foram novamente lavados com PBST₂ três vezes por 5 min e cinco vezes por 20 min. Para a marcação do DNA nuclear utilizou-se 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) na proporção de 1:4000 em PBST₂ por 4 min a temperatura ambiente. Em seguida, os tecidos foram colocados em solução de glicerol 80% em PBST₂ e deixados em geladeira *overnight*, para posterior montagem das lâminas. Por se tratar de um tecido de espessura considerável, as lâminas utilizadas durante a montagem foram acopladas a dois calços de lamínulas de vidro (20 x 20 mm; 0,17 mm de espessura) com a finalidade de criar um espaço em altura capaz de acomodar o cérebro sem deformá-lo quando sobre ele fosse colocada outra lamínula de vidro (24 x40 mm). Lâmina e lamínula foram seladas usando esmalte para unhas incolor. Após a montagem, as lâminas foram analisadas em microscópio confocal. As imagens capturadas pelo microscópio confocal foram então visualizadas e sobrepostas utilizando o software ImageJ.

3.7 Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando *GraphPad Prism* versão 6. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As comparações entre as castas foram feita por meio do teste t de student ou ANOVA *two way* seguido de pós teste de Bonferroni. O nível de significância para a rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0,05$). Previamente

às análises estatísticas, os dados foram verificados quanto à normalidade por meio do teste Shapiro-Wilk, utilizando o programa Past versão 3.18.

4 RESULTADOS

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

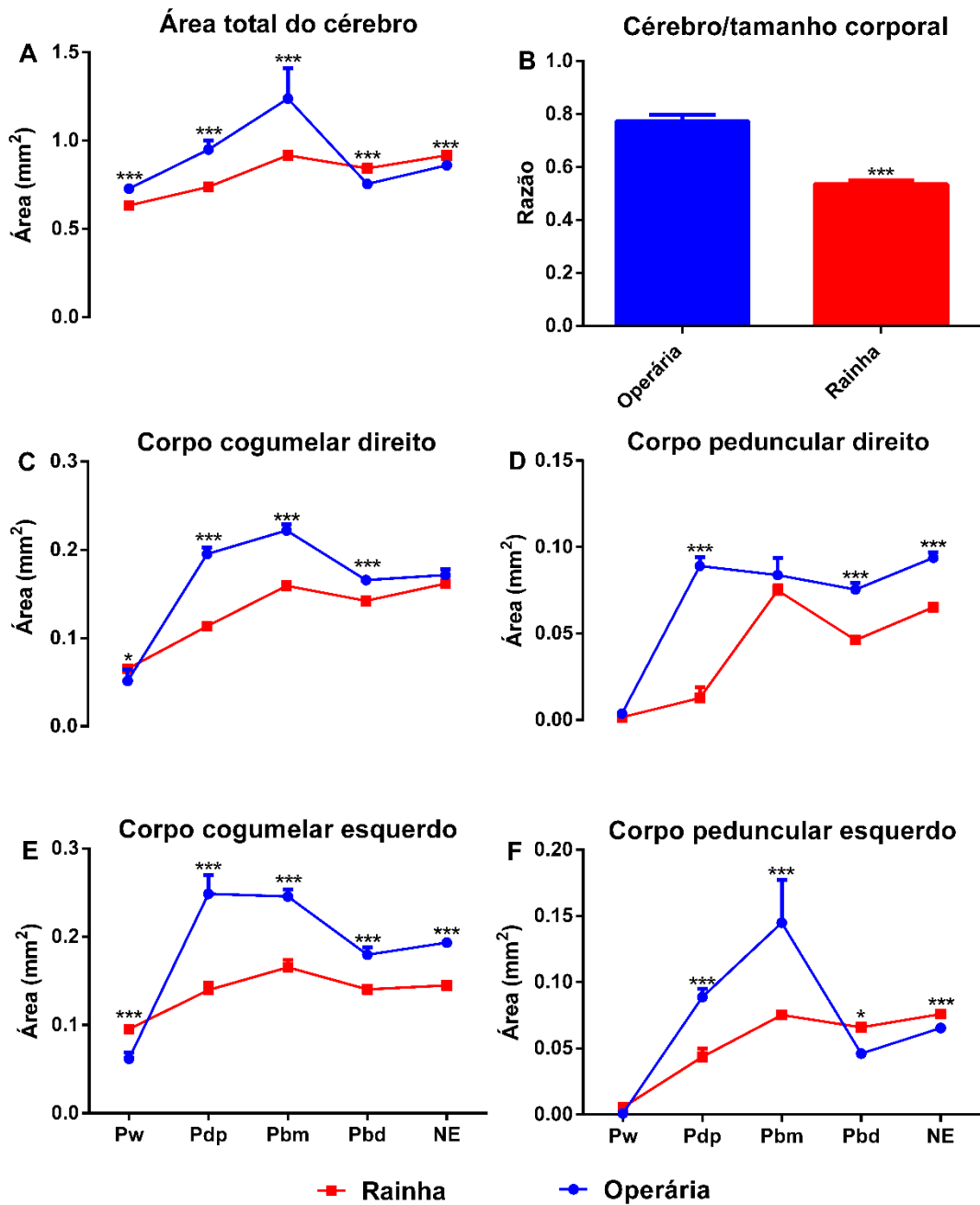
4.1 Morfometria cerebral

Na figura 7 é possível visualizar a comparação das áreas cerebrais entre rainhas e operárias nas fases de Pw, Pdp, Pbm, Pbd e NE. O gráfico A refere-se à área total do cérebro. Consta-se que desde a fase pupal Pw o cérebro de operárias apresenta-se maior do que o de rainhas, diferença que se mantém nas fases seguintes (Pdp e Pbm). Na fase Pbd ocorre uma alteração de padrão, de modo que o cérebro de rainhas fica maior do que o de operárias. Esta diferença mante-se nos indivíduos recém-emergidos. No entanto, quando se fala em termos proporcionais, o cérebro de operárias nos indivíduos adultos mostra-se maior do que o de rainhas, tal como pode ser visto gráfico B. Nele, é demonstrada a relação entre a área ocupada pelo cérebro e o comprimento corporal dos indivíduos das diferentes castas.

O gráfico C refere-se à área ocupada pelo corpo cogumelar direito (CGD), o qual é maior em operárias nas fases de Pdp, Pbm e Pbd, porém na fase de Pw ele é maior em rainhas e em NE não há diferenças no tamanho desta estrutura entre as duas castas. O gráfico E mostra a área ocupada pelo corpo cogumelar esquerdo (CGE). Em Pw, assim como ocorre com o CGD, o CGE é maior em rainhas. Esta relação se inverte em favor das operárias em todas as fases seguintes, ou seja, o CGE de operárias cresce de forma acelerada durante o desenvolvimento adulto-farato e se torna maior do que o de rainhas, mantendo-se assim na fase adulta. Em relação à área ocupada pelos corpos pedunculares direitos (CPD), nossos resultados demonstrados na figura 7D, revelam que nas fases Pw e Pbm não há diferenças entre rainhas e operárias, no entanto, nas fases de Pdp, Pbd e NE o CPD de operárias mostra-se maior do que o de rainhas. Os corpos pedunculares esquerdos (CPE) (FIGURA 7F) apresentam em Pw área semelhante entre as castas, contudo, nas duas fases seguintes estas estruturas crescem intensamente em operárias e se tornam significativamente maiores do que em rainhas. Assim como visto no

desenvolvimento geral do cérebro, na fase de Pbd, ocorre uma inversão e o CPE de rainhas torna-se ligeiramente maior do que o de operárias, permanecendo assim no indivíduo NE.

Figura 7. Análise morfométrica do cérebro de abelhas *A. mellifera* em fases do desenvolvimento pupa/adulto-farato mostrando comparação da área ocupada pelo cérebro, corpos cogumelares e corpos pedunculares entre rainhas e operárias.



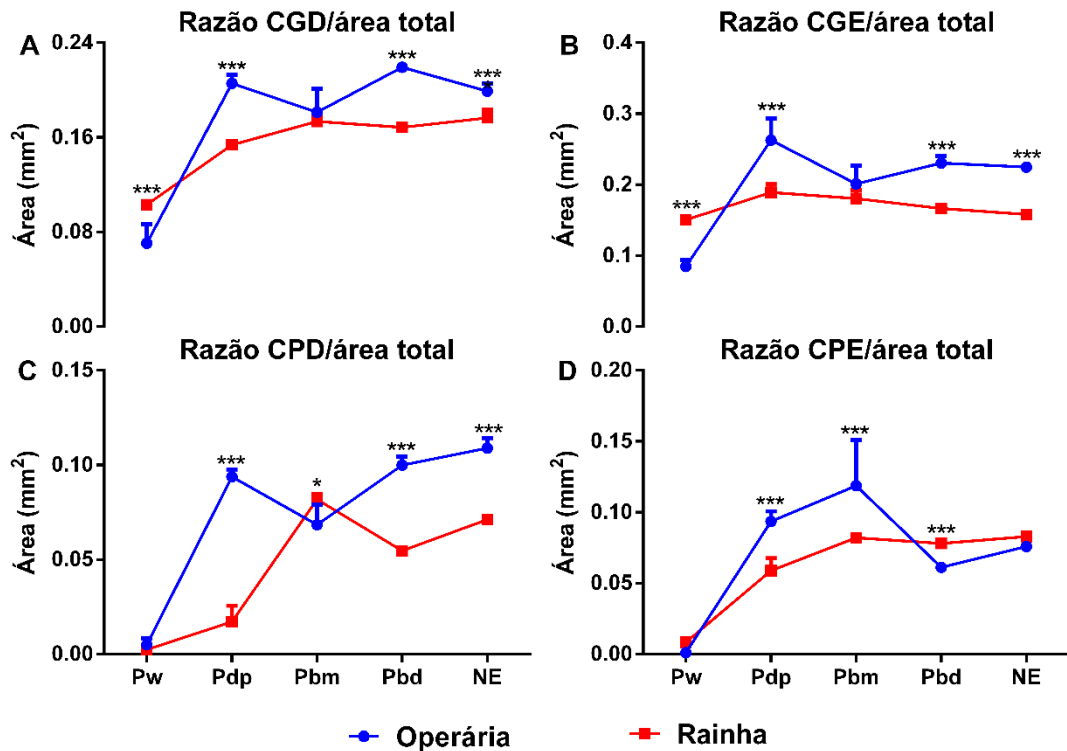
Fonte: Do autor.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. **p<0,01; ***p<0,001; quando comparado com rainhas.

Para verificar, em termos proporcionais, a área ocupada pelas neurópilas em relação à área total do cérebro, procedemos ao cálculo da razão da área de cada neurópila pela área cerebral total. Esses dados de razão morfométrica estão demonstrados na figura 8. Em A temos os dados referentes ao CGD, o qual é relativamente maior em operárias durante a maioria das fases de desenvolvimento analisadas, com exceção da fase pupal Pw, em que o CGD é maior em rainhas, e adulto-farato Pdp, fase ontogenética em que não há diferença estatística entre as castas. O CGE demonstrou ter desenvolvimento semelhante ao CGD, sendo assim os mesmos resultados foram observados para o corpo cogumelar do hemisfério esquerdo (FIGURA 8B). A mesma análise foi realizada para o CPD e CPE. Os resultados referentes ao CPD demonstraram que ele ocupa mais espaço no cérebro de operárias nas fases de Pdp, Pbd e NE; em Pw não há diferença entre as duas castas e na fase de Pbm há uma ligeira diferença favorecendo as rainhas (FIGURA 8C). Na figura 8D observamos a área relativa ocupada pelo CPE. Em Pw e NE não há diferenças significativas entre as castas, em Pdp e Pbm a área é maior em operárias, já o contrário é observado em Pbd.

De modo geral, os resultados de áreas ocupadas pelas neurópilas utilizando valores brutos foram semelhantes aos resultados de áreas proporcionalizadas. Em suma, eles demonstraram que as neurópilas são mais desenvolvidas em operárias, excetuando a fase de Pw. Em Pbm, quando se refere aos valores brutos as neurópilas são maiores em operárias, exceto os CPD, mas em termos proporcionais o CGD e CGE não demonstram diferenças entre as castas, já o CPD é maior em rainhas e o CPE maior em operárias.

Figura 8. Razão entre a área ocupada pelos corpos cogumelares direitos (CGD) e esquerdos (CGE); e pedunculares direitos (CPD) e esquerdos (CPE) em relação à área total do cérebro de abelhas *A. mellifera* em fases do desenvolvimento pupa/adulto-farato.

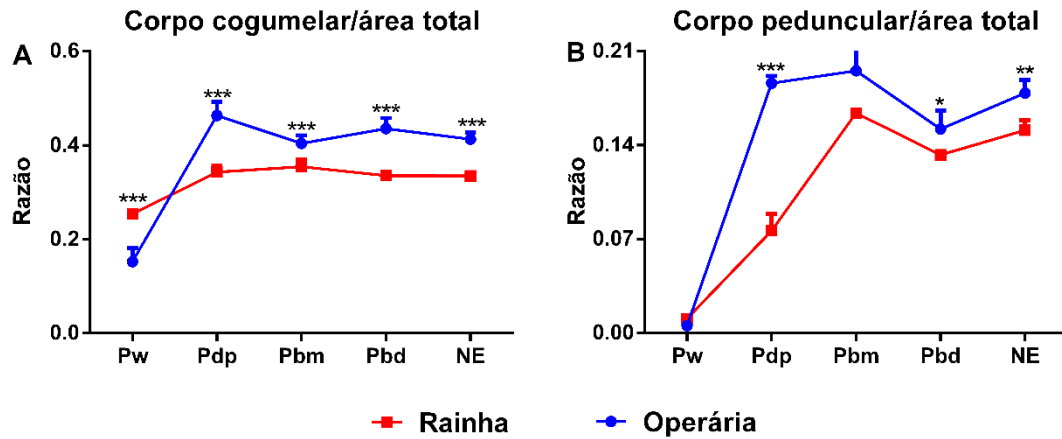


Fonte: Do autor.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; quando comparado com rainhas.

Com o intuito de dar uma visão mais ampla a respeito da área ocupada pelos corpos cogumelares e pedunculares no cérebro das duas castas, os valores de área de cada uma das neurópilas nos dois hemisférios, esquerdo e direito, foram somadas e comparadas entre as castas em relação à área total do cérebro. Na figura 8 é mostrada a razão entre as áreas ocupadas pelos CGs (FIGURA 9A) e CPs (FIGURA 9B) em relação à área total do cérebro. Por meio destes dados fica mais evidente que ambas neurópilas apresentam desenvolvimento maior em operárias ao longo de todas as fases analisadas, exceto na fase de Pw, onde os CGs de rainhas são maiores do que os de operárias e na fase de Pbm em que não foram evidenciadas diferenças estatísticas entre os CPs de rainhas e operárias.

Figura 9. Razão entre a área ocupada pelos corpos cogumelares e pedunculares, diretos e esquerdos somados, em relação a área total do cérebro de abelhas *A. mellifera* em fases do desenvolvimento pupa/adulto-farato.



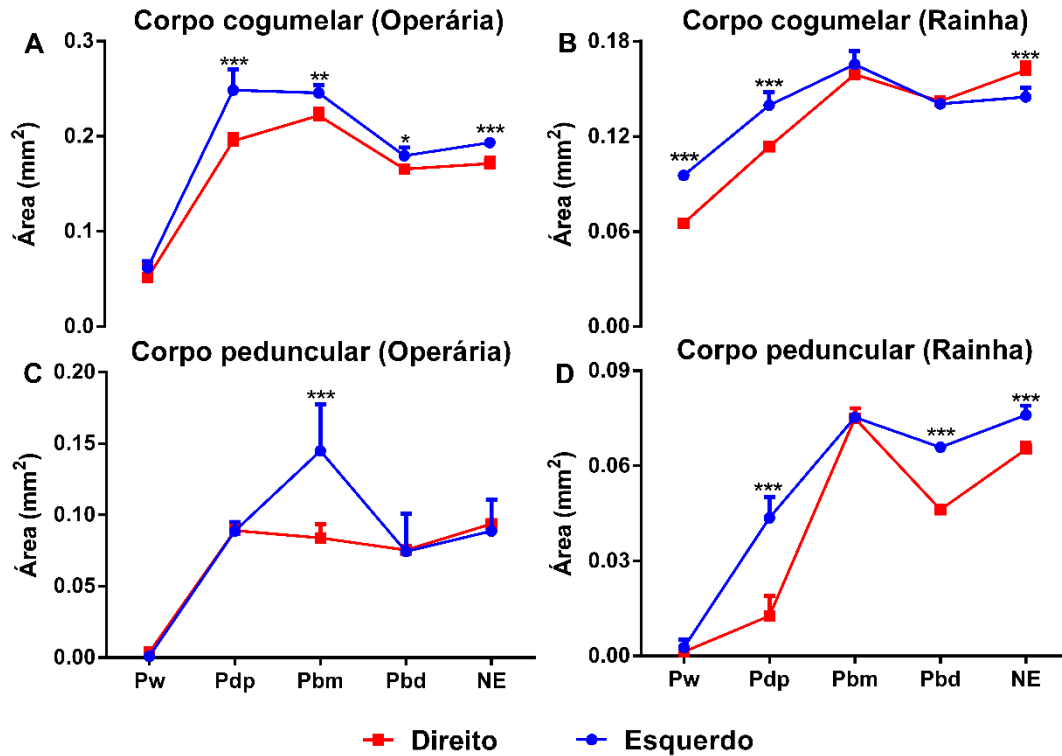
Fonte: Do autor.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; quando comparado com rainhas.

Na tentativa de evidenciar uma possível heterocronia no desenvolvimento dos hemisférios direito e esquerdo, capaz de gerar uma assimetria no cérebro das castas femininas de *A. mellifera*, comparamos a área ocupada pelas neurópilas do hemisfério direito com as do hemisfério esquerdo. Estes resultados estão apresentados na figura 10.

No que se refere aos corpos cogumelares (FIGURAS 10A e 10B) foi possível constatar que há um desenvolvimento maior do lado esquerdo do cérebro em relação ao direito nas fases Pdp, Pbm, Pbd e NE em operárias e Pw, Pdp de rainhas. Em rainhas recém-emergidas foi CG do lado direito que apresentou maior tamanho. Já os corpos pedunculares esquerdos se mostraram maiores do que os direitos na fase de Pbm em operárias (FIGURA 10C) e em Pdp, Pbd e NE em rainhas (FIGURA 10D).

Figura 10. Análise morfométrica do cérebro de abelhas *A. mellifera* em fases do desenvolvimento pupa/adulto-farato mostrando comparação entre a área ocupada pelas estruturas do hemisfério direito em relação ao esquerdo.



Fonte: Do autor.

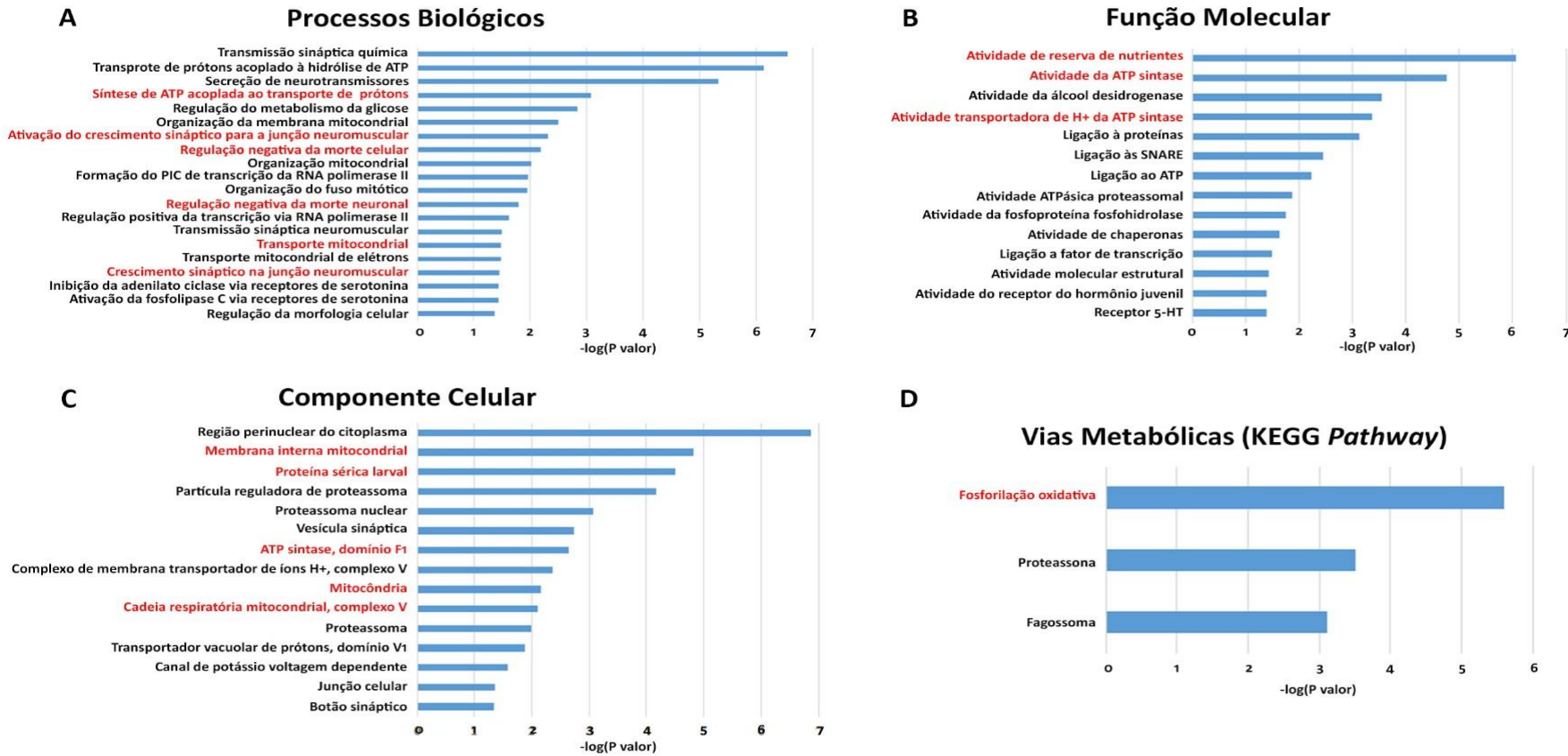
Nota: Valores expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; quando comparado com o hemisfério esquerdo.

4.2 Análise de enriquecimento funcional

As análises de expressão gênica em cérebros de rainhas e operárias durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato partiram de dados de *screening* por *microarray* obtidos em cérebros de adultos-farato Pp (Oliveira, 2014). Os ensaios de *microarray* foram realizados utilizando cerca de 14 mil sondas, que permitiram gerar uma lista de 382 DGEs, todos mais expressos em operárias. Para 229 deles, foram encontrados ortólogos em *D. melanogaster* (ver anexo, quadro 1). Essa lista dos ortólogos foi utilizada para a realização de análises de enriquecimento funcional no que se refere a processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e vias metabólicas (KEGG *pathways*). Para o item processos biológicos foram identificados 46 enriquecimentos significativos, 16 para funções moleculares e 25 para

componentes celulares (ver anexo, quadros 2, 3 e 4). No tocante a vias metabólicas, três vias mostraram-se enriquecidas. Na figura 11 foram representados alguns dos enriquecimentos mais relevantes, estando assinalados em vermelho aqueles que influenciaram mais diretamente na escolha dos genes a serem estudados por RT-qPCR.

Figura 11. Enriquecimento funcional dos 229 genes diferencialmente expressos em cérebros de rainhas e operárias Pp com ortólogos em *D. melanogaster*.



Fonte: Do autor.

Nota: Foram avaliados enriquecimentos ($p < 0,05$) relacionados a processos biológicos (A), funções moleculares (B), componentes celulares (C) e vias metabólicas (D). Em vermelho estão sinalizados os enriquecimentos que influenciaram diretamente na escolha dos genes selecionados para estudo por RT-qPCR.

Dentre os 17 transcritos selecionados para as análises de RT-qPCR, cinco (*tum*, *mnb*, *ATPsynβ*, *ant* e *hex 70a*) estavam, na lista de DGEs de Oliveira (2014) e foram escolhidos tendo como base os resultados de enriquecimento funcional. Os demais (*InR-1*, *InR-2*, *ILP-1*, *ILP-2*, *Tor*, *hex 70b*, *hex 110*, *LOC 726407*, *Incov-1*, *caspase-*, *EcR-A* e *EcR-B*), apesar de não constarem na lista de DGEs, foram selecionados por estabelecerem relação com as funções enriquecidas e/ou por terem associação com o processo de determinação de castas em *A. mellifera*.

Os genes neurogênicos *tum* e *mnb* foram selecionados por se relacionarem com o processo de crescimento sináptico, uma das funções que demonstrou estar enriquecida (FIGURA 11A). O enriquecimento funcional relacionado ao metabolismo mitocondrial, mais especificamente ao transporte de elétrons e síntese de ATP pela ATP sintase mitocondrial (FIGURAS 11A e B), nos levou a selecionar dois genes importantes para o processo de síntese e transporte de ATP na mitocôndria, o *ant* e o *ATPsynβ*. Reserva de nutrientes e proteínas de estocagem também foram significativamente enriquecidas pelas análises (FIGURAS 11B e C). Diante disso, foram selecionados genes codificadores de hexamerinas (*hex 70a*, *hex 70b*, *hex 110*) e genes da via insulina/Tor (*InR-1*, *InR-2*, *ILP-1*, *ILP-2*, *Tor*), uma clássica via de sensibilidade a nutrientes. A regulação negativa da morte celular programada e o controle negativo da morte neuronal também mostraram estar enriquecidos (FIGURA 11A), o que nos levou a selecionar genes possivelmente relacionados a esses processos (*LOC 726407*, *Incov-1*, *caspase-1*) (HUMANN; TIBÉRIO; HARTFELDER, 2013; WU et al., 2015). Apesar de não estar diretamente relacionado às funções enriquecidas, selecionamos o gene codificador dos receptores de ecdisteroides para ter seus níveis de transcrição. Isso porque os ecdisteroides são os hormônios predominantes na hemolinfa durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato, sendo por isso capazes de modular a expressão de diversos genes e, por conseguinte, processos biológicos importantes como é o caso da proliferação e morte celular (HARTFELDER; ENGELS, 1998; GANESHINA et al., 2000; MALUN; MOSELEIT; GRUNEWALD, 2003).

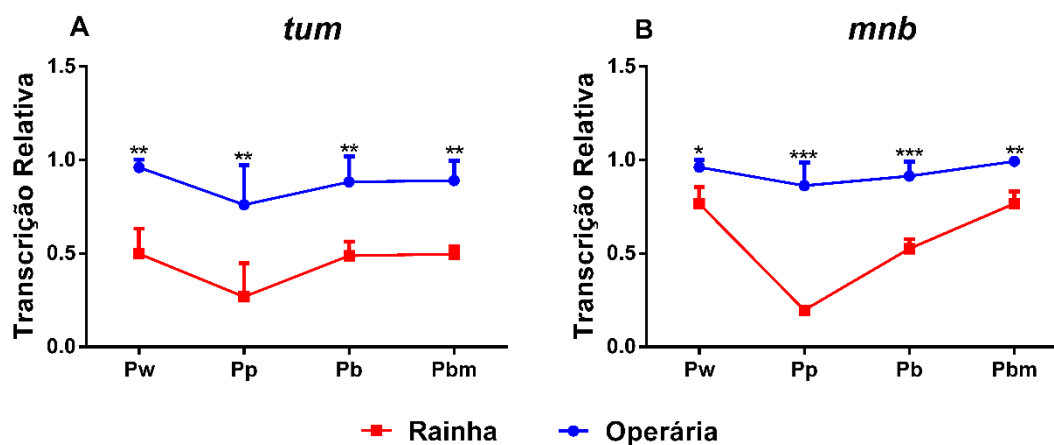
4.3 Análise de perfis transcricionais

Após a realização das análises de ontologia genética e seleção de genes alvos, partimos para a determinação dos níveis transcricionais por RT-qPCR. Com o intuito de dar uma visão mais ampla a respeito do comportamento dos genes ao longo do desenvolvimento pupal e adulto-farato, foram escolhidos quatro estágios para serem estudados; pupal Pw e adulto-farato Pp, Pb e Pbm. Estas fases foram escolhidas de modo a representar o começo, o meio e o fim desenvolvimento compreendido entre o estágio larval e a emergência para a vida adulta. Nos tópicos a seguir são apresentados os perfis transcricionais dos genes, os quais foram agrupados levando em consideração suas relações funcionais.

4.3.1 *Tumbleweed e Minibrain*

Na figura 12 estão representados os padrões de expressão dos genes *Tumbleweed* (A) e *Minibrain* (B). Ambos os genes demonstraram ser mais expressos em cérebros de operárias durante todo o desenvolvimento pupal e adulto-farato e também apresentaram comportamento temporal semelhante, com queda na expressão na fase de Pp seguida de aumento em fases subsequentes, podendo ser reflexo direto do pico de ecdisteroides experimentado por ambas as castas.

Figura 12. Perfil de transcrição dos genes *tum* e *mnb* em cérebros de rainhas e operárias de *A. mellifera* durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato



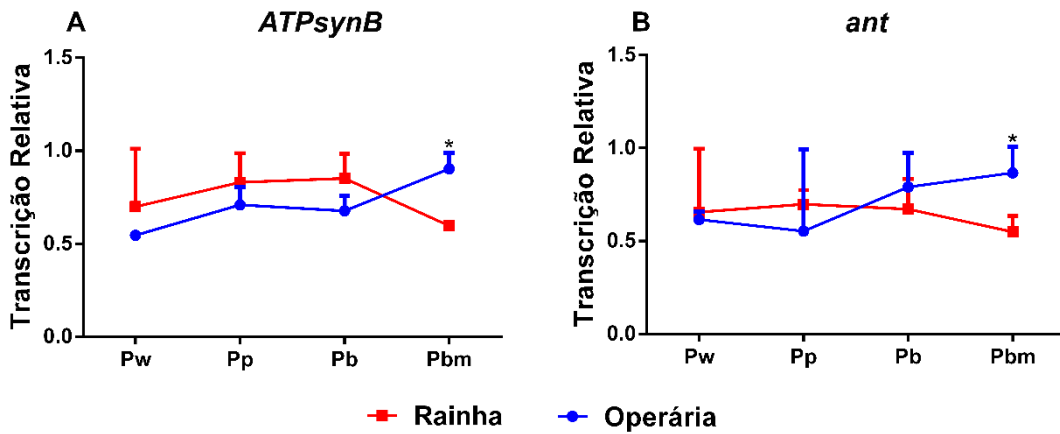
Fonte: Do autor.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; quando comparado com rainhas.

4.3.2 ATP sintase- β e ADP/ATP translocase

Conforme pode ser observado na figura 13, os perfis de expressão dos dois genes que codificam para proteínas mitocondriais foram semelhantes, apresentando diferença estatística favorecendo os cérebros de operárias no final do desenvolvimento adulto-farato (Pbm), sem, no entanto, apresentar diferenças entre as castas nas demais fases analisadas (Pw, Pp e Pb).

Figura 13. Perfil de transcrição dos genes *ATPsyn β* e *ant* em cérebros de rainhas e operárias de *A. mellifera* durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.



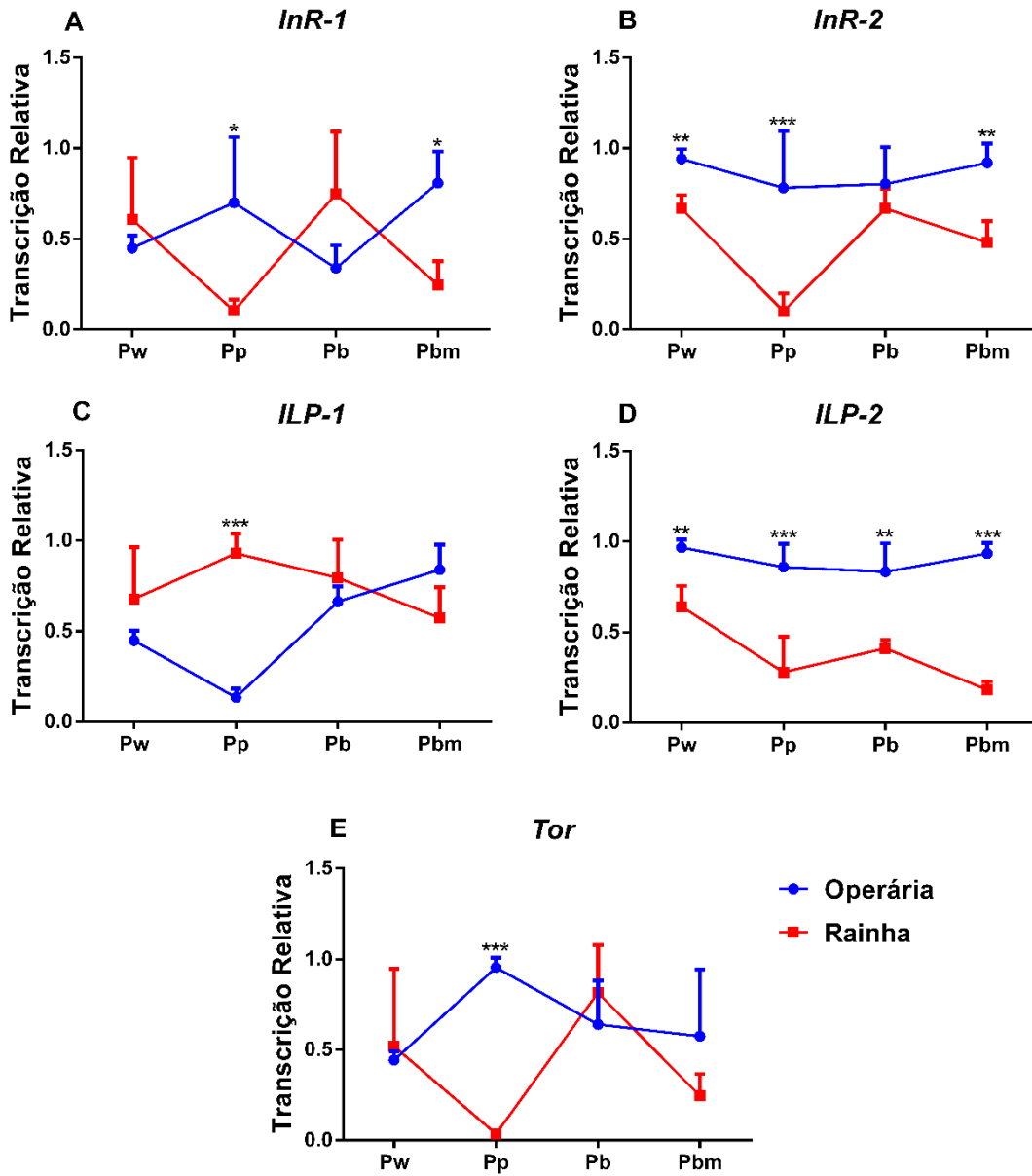
Fonte: Do autor.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com rainhas.

4.3.3 Via Insulina/TOR

A figura 14 mostra os resultados obtidos para os cinco genes envolvidos na via Insulina/Tor. No geral, os receptores insulínicos demonstraram padrão de expressão favorecendo operárias, sendo que *InR-1* (FIGURA 14A) é mais expresso em operária Pp e Pbm e *InR-2* é mais expresso em todas as fases de desenvolvimento estudadas, exceto na fase de Pb, onde não houve diferença estatística entre as castas (FIGURA 14B). No que se refere os níveis transcripcionais dos peptídeos semelhantes a insulina, foi observado que o *ILP-1* é mais expresso em rainhas Pp e similarmente expresso nas duas castas nas demais fases (FIGURA 14C). Por outro lado, o *ILP-2* é mais expresso em operárias desde o início do desenvolvimento pupal (Pw) até o final do desenvolvimento adulto-farato (Pbm) (FIGURA 14D). As análises dos níveis de expressão do gene *Tor* revelaram que o mesmo é mais expresso em operárias Pp, no entanto, nas demais fases analisadas os testes estatísticos demonstraram não haver diferenças na expressão entre rainhas e operárias (FIGURA 14E).

Figura 14. Perfil de transcrição dos genes *InR-1*, *InR-2*, *ILP-1*, *ILP-2* e *Tor* em cérebros de rainhas e operárias de *A. mellifera* durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.



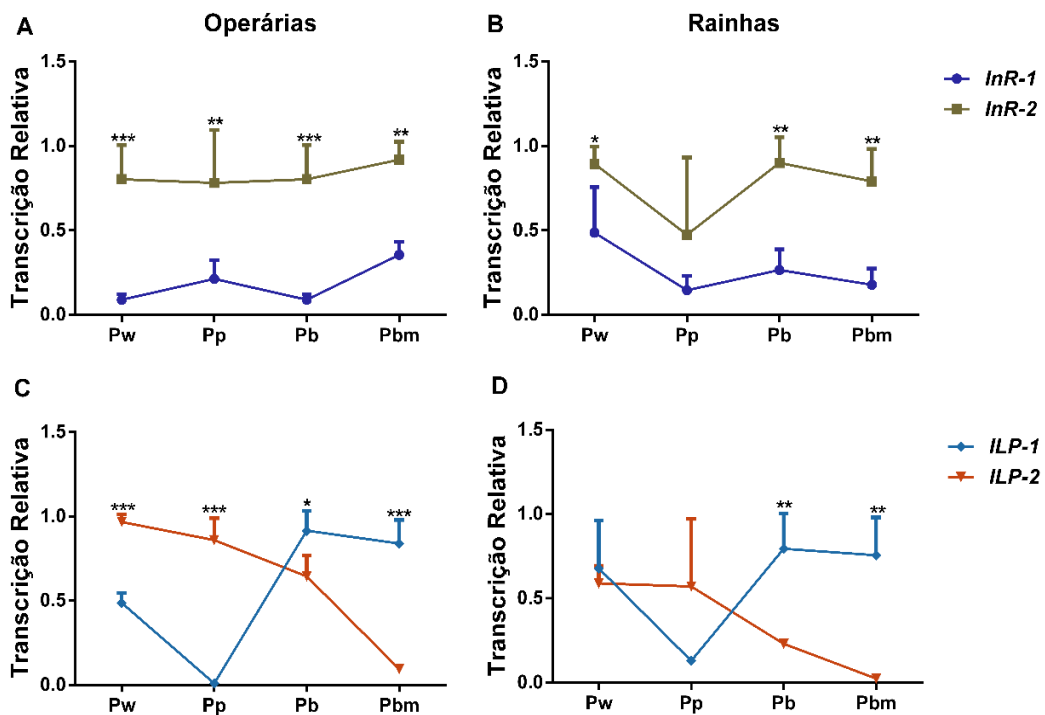
Fonte: Do autor.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 quando comparado com rainhas.

Objetivando obter um panorama mais amplo a respeito da expressão dos receptores e peptídeos insulínicos, comparamos os níveis transcripcionais das variantes 1 e 2 dos receptores e peptídeos dentro de cada uma das castas. Os resultados obtidos estão representados na figura 15.

Com relação às análises comparativas entre os receptores insulínicos, nossos resultados demonstram que, de forma geral, o *InR-2* é mais expresso do que *InR-1* em todas as fases de desenvolvimento analisadas, tanto no cérebro de rainhas quanto no de operárias; excetuando-se a fase de Pp de rainhas onde não houve diferença estatística entre as variantes dos receptores. Os resultados encontrados para os peptídeos insulínicos também revelaram diferenças de padrão de expressão entre as duas castas. Em operárias, nas fases de Pw e Pp o *ILP-2* é mais expresso do que o *ILP-1*. Esta situação se inverte de modo que em Pb e Pbm é o *ILP-1* que apresenta maiores níveis de transcrição. Por outro lado, em rainhas Pw e Pp não há diferenças na expressão dos dois peptídeos, porém, nas fases subsequentes as rainhas apresentam o mesmo padrão que as operárias, ou seja, *ILP-1* mostrou-se mais expresso do que *ILP-2*.

Figura 15. Comparação dos níveis de transcrição entre as variantes 1 e 2 dos receptores (*InR-1* e *InR-2*) e peptídeos insulínicos (*ILP-1* e *ILP-2*) em cérebros de rainhas e operárias de *A. mellifera* durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.



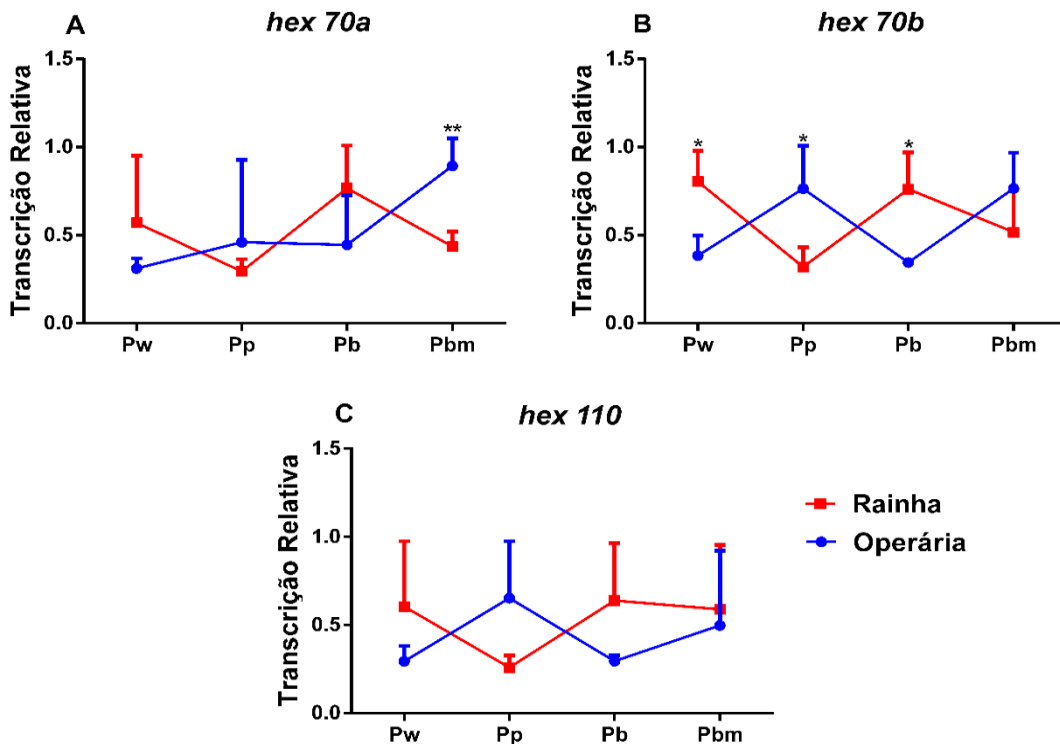
Fonte Do autor.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com rainhas.

4.3.4 Hexamerinas

Com relação os genes de hexamerinas, o achado inicial mais interessante foi o de que as hexamerinas são transcritas no cérebro durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato. Ademais, nossos resultados revelaram que a variante 70a (FIGURA 16A) mostra-se mais expressa em cérebros de operárias em fase de desenvolvimento mais próximo da emergência para a vida adulta (Pbm), sem demonstrar diferença estatisticamente significativa nos demais períodos estudados (Pw, Pp e Pb). O gene *hex 70b* demonstrou um perfil de expressão oscilatório, com períodos de alta e baixa expressão subsequentes, sendo mais expresso em rainhas em Pw e Pb, e mais expresso em operárias Pp; em Pbm não foi detectada diferença de expressão entre as castas (FIGURA 16B). Segundo os testes estatísticos, *hex 110* é igualmente expresso nas duas castas em todas as fases da ontogênese analisadas (FIGURA 16C).

Figura 16. Perfil de transcrição dos genes de Hexamerinas (*hex 70a*, *70b* e *110*) em cérebros de rainhas e operárias de *A. mellifera* durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.



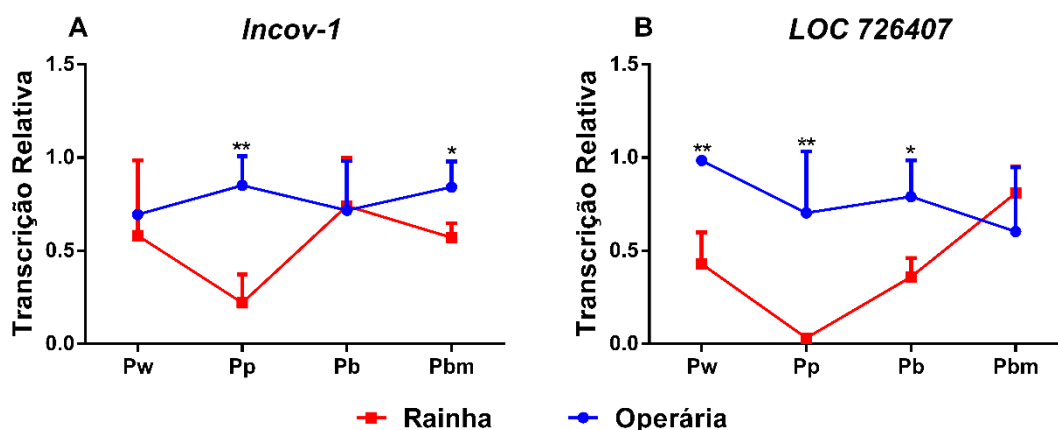
Fonte: Do autor.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparado com rainhas.

4.3.5 Sistema *Incov-1*/LOC 726407

Na figura 17 estão representados os perfis de expressão do *Incov-1* e do LOC 726407. Nela é possível verificar que ambos transcritos mostraram-se mais expressos em cérebros de operárias. O lncRNA *Incov-1* foi significativamente mais expresso nas fases de Pp e Pbm. Nas demais fases (Pw e Pb) não foram detectadas diferenças nos níveis de transcrição deste RNA. Por outro lado, LOC 726404 foi mais expresso em operárias em todas as fases analisadas, com exceção da fase de Pbm.

Figura 17. Perfil de transcrição de *Incov-1* e LOC 726407 em cérebros de rainhas e operárias de *A. mellifera* durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.



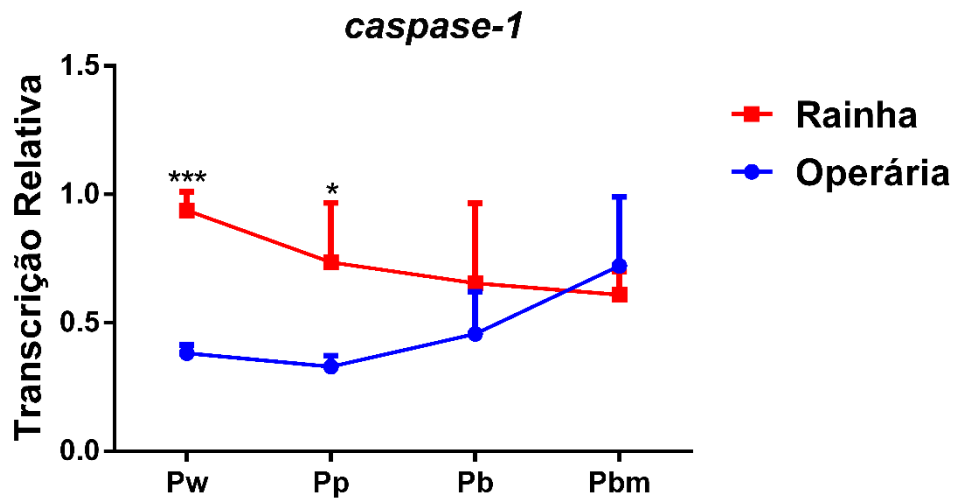
Fonte: Do autor.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparado com rainhas.

4.3.6 *Caspase-1*

Os resultados referentes a *caspase-1* revelam que sua expressão é aumentada em cérebros de rainhas no início de desenvolvimento pupal e adulto-farato (Pw e Pp). Essa expressão diminui nos períodos subsequentes em rainhas e aumenta em operárias sem, no entanto, apresentar diferenças estatisticamente significantes entre as castas (FIGURA 18).

Figura 18. Perfil de transcrição da *caspase-1* em cérebros de rainhas e operárias de *A. mellifera* durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.



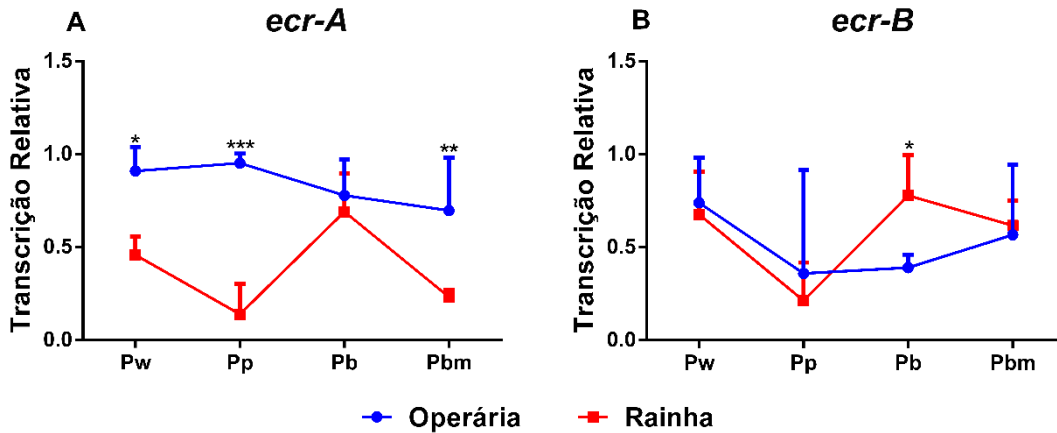
Fonte: Do autor.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ quando comparado com rainhas.

4.3.7 Receptor de ecdisteroides

Como resultado para os receptores de ecdisteroides, obtivemos que a variante A do gene *EcR* é mais expressa em cérebros de operárias em todas as fases de desenvolvimento estudadas, com exceção da fase de Pb, onde não foram detectadas diferenças de expressão entre as castas. Ao longo do período analisado, a expressão de *EcR-B* mostrou-se similar entre as castas, exceto em Pb, momento em que a expressão em rainhas excede a de operárias (FIGURA 19). Para ambas as castas os níveis de expressão de *EcR-A* é maior do que *EcR-B* (ver anexo, FIGURA 2).

Figura 19. Perfil de transcrição das variantes A e B do receptor de ecdisteroides em cérebros de rainhas e operárias de *A. mellifera* durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.



Fonte: Do autor.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com rainhas.

4.4 Tratamentos hormonais

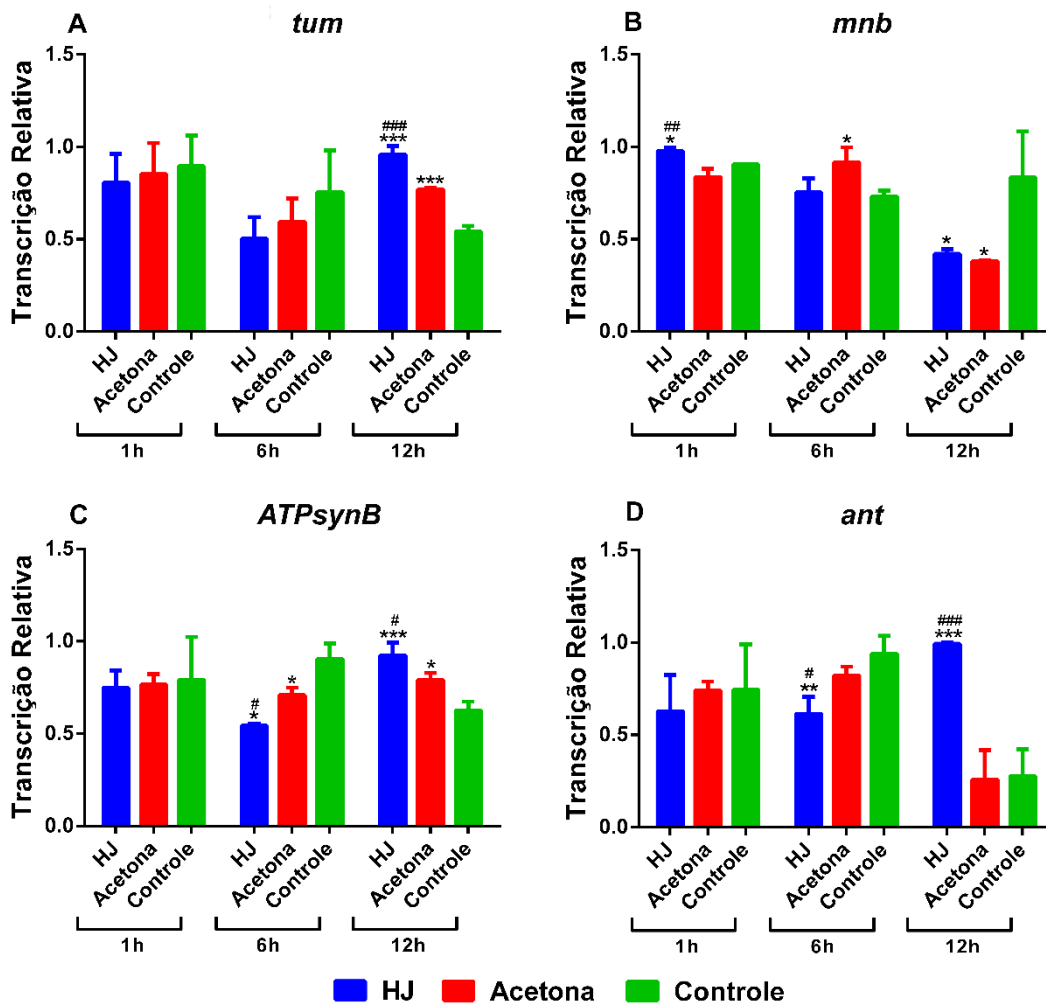
Como previamente exposto, o desenvolvimento de castas em *A. mellifera* é governado hormonalmente e neste cenário os ecdisteroides e o HJ são os protagonistas (DUBROVSKY, 2005). É sabido que eles exercem seus efeitos regulando, direta ou indiretamente, a expressão de uma gama de genes (BARCHUK et al., 2007; LAGO et al., 2016; WEGENER et al., 2013; MELLO et al., 2014; WANG et al., 2013).

Alguns dos genes estudados em nosso trabalho já foram analisados quanto a sua responsividade a hormônios. Dentre eles estão os genes de hexamerinas, *Tor*, os genes codificadores dos receptores de insulina dos ecdisteroides (ZHOU; TARVER; SCHARF, 2007; MARTINS et al., 2010; MELLO et al., 2014; MUTTI et al., 2011). Com a finalidade de verificar a influência hormonal sobre os demais genes (*tum*, *mnb*, *ATPsyn β* , *ant*, *ILP-1*, *ILP-2*, *caspase-1* e *Incov-1*); e assim ganhar informações sobre quais genes, em resposta a diferenciais hormonais, poderiam ser os mais diretamente envolvidos na morfogênese cerebral, adultos-farato Pp foram tratados com HJ ou 20E e tiveram o RNA cerebral extraído em três diferentes tempos de pós tratamento (1, 6 e 12h), para posterior análise por RT-qPCR.

4.4.1 Tratamento com hormônio juvenil

Na figura 20 estão representados os dados obtidos com os ensaios de responsividade ao HJ para os genes *tum*, *mnb*, *ATPsyn β* e *ant*. Os resultados revelam que tanto *tum* quanto *mnb* são regulados positivamente pelo HJ, entretanto *mnb* revelou-se um gene de resposta mais rápida, tendo sua expressão aumentada 1 h após o tratamento com o hormônio e *tum* apresentou resposta mais tardia, alterando sua expressão apenas no tempo de 12 h. Os genes codificadores de proteínas mitocondriais, cujos resultados estão sumarizados em C e D, responderam ao tratamento hormonal na sexta e décima segunda hora. A resposta ao tratamento com HJ foi a mesma para os dois genes em ambos os tempos. Houve redução dos níveis de transcrição na 6^a e aumento na 12^a hora.

Figura 20. Resposta transcricional dos genes *tum*, *mnb*, *ATPsynβ* e *ant* ao tratamento com hormônio juvenil 1, 6, e 12h pós- tratamento.



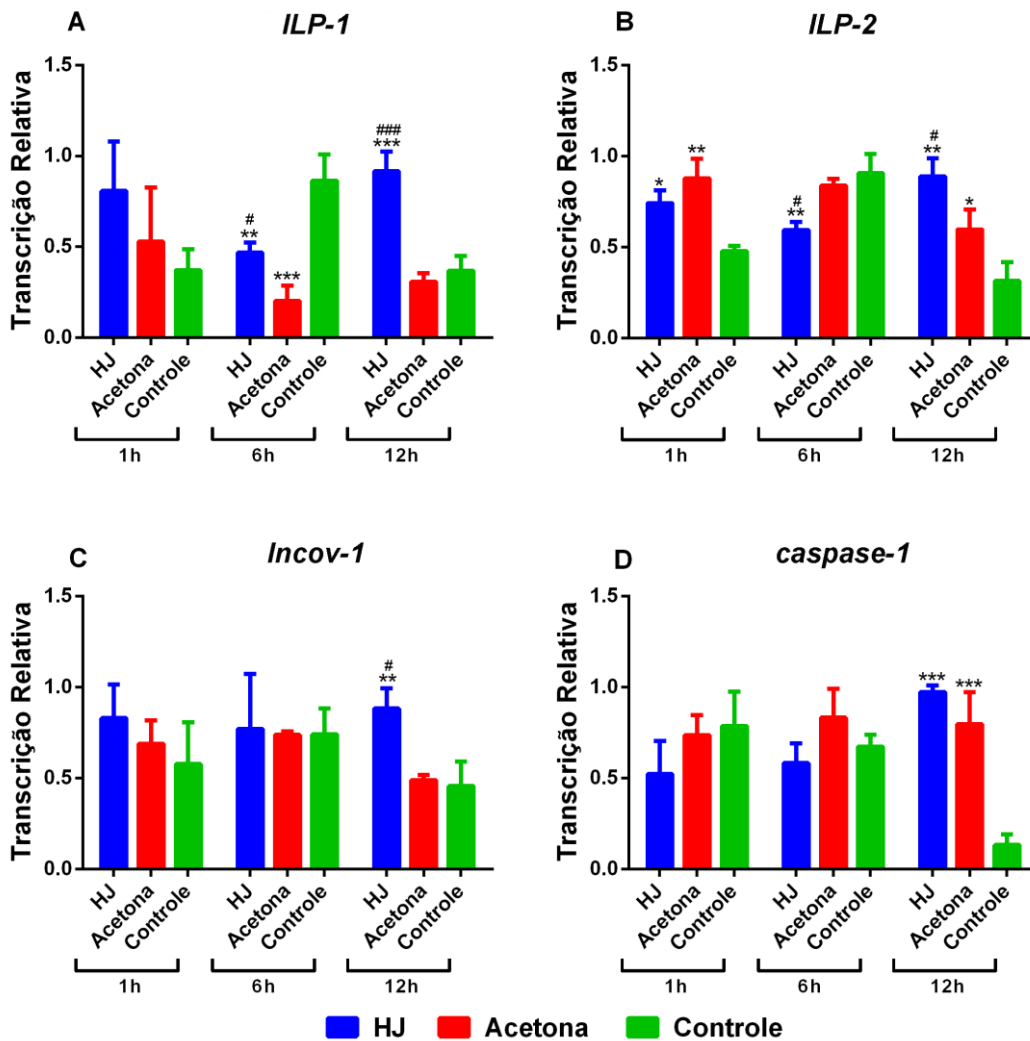
Fonte: Do autor.

Nota: Ensaios realizados em adultos-farato de olho rosa (Pp). Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo acetona.

Os genes *ILP-1* e *ILP-2* foram responsivos ao HJ na 6^a e 12^a hora (FIGURAS 21A e 21B). O *ILP-1* teve resposta positiva ao HJ em ambos tempos pós-tratamento. Uma análise pouco criteriosa poderia nos fazer supor que na 6^a há um efeito negativo sobre a expressão gênica, no entanto o gráfico referente à sexta hora nos mostra que o veículo (acetona) apresenta um grande efeito repressor sobre o gene e que o grupo que recebeu injeção de HJ + veículo apresenta expressão gênica maior do que o grupo que recebeu apenas o veículo, mostrando que o hormônio é capaz de reverter parcialmente o efeito

repressor da acetona. Assim como ocorreu com os genes codificadores de proteínas mitocondriais, o *ILP-2* apresentou resposta bifásica, tendo sua expressão reprimida na 6^a e estimulada na 12^a hora. O *Incov-1*, representado em C, teve sua expressão aumentada pelo tratamento com HJ na 12^a, o mesmo aconteceu com *caspase-1* (FIGURA 21D).

Figura 21. Resposta transcricional dos genes *ILP-1*, *ILP-2*, *Incov-1* e *caspase-1* ao tratamento com hormônio juvenil 1, 6, e 12h pós- tratamento.



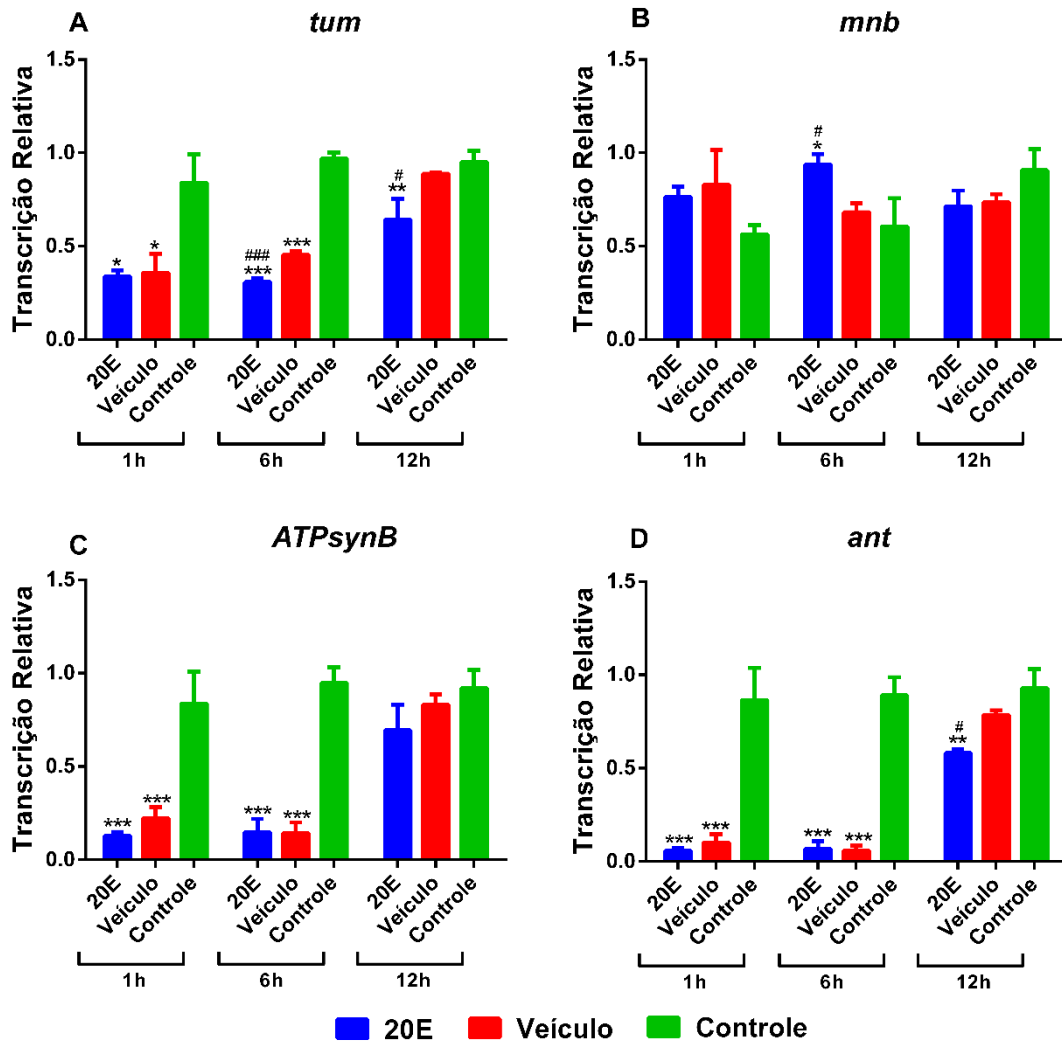
Fonte: Do autor.

Nota: Ensaios realizados em adultos-farato de olho rosa (Pp). Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo acetona.

4.4.2 Tratamento com 20-hidroxiecdisona

A figura 22 mostra a responsividade dos genes *tum*, *mnb*, *ATPsyn β* e *ant* à injeção de 20E. Em (A) vê-se que o gene *tum* respondeu ao tratamento hormonal com 20E na 6^a e 12^a hora, tendo sua expressão reprimida em ambas. O gene *mnb* (B) teve sua expressão estimulada decorridas 6h do tratamento com 20E e não alterou sua expressão nas demais horas analisadas. Os resultados encontrados para o gene *ATPsyn β* (C) e *ant* (D) foram similares. Na 1^a e 6^a hora tanto o grupo tratado com 20E quanto o grupo tratado somente com o veículo tiveram a expressão gênica reprimida. Na 12^a hora, no entanto, em relação ao gene *ant*, somente o grupo tratado com 20E demonstrou ter sofrido efeito repressor. O gene a *ATPsyn β* , na 12^a, apesar de ter apresentado padrão gráfico semelhante ao do gene *ant*, não apresentou diferenças significativas entre os grupos.

Figura 22. Resposta transcricional dos genes *tum*, *mnb*, *ATPsyn-β* e *ant* ao tratamento com 20-hidroxiecdisona 1, 6, e 12h pós- tratamento.



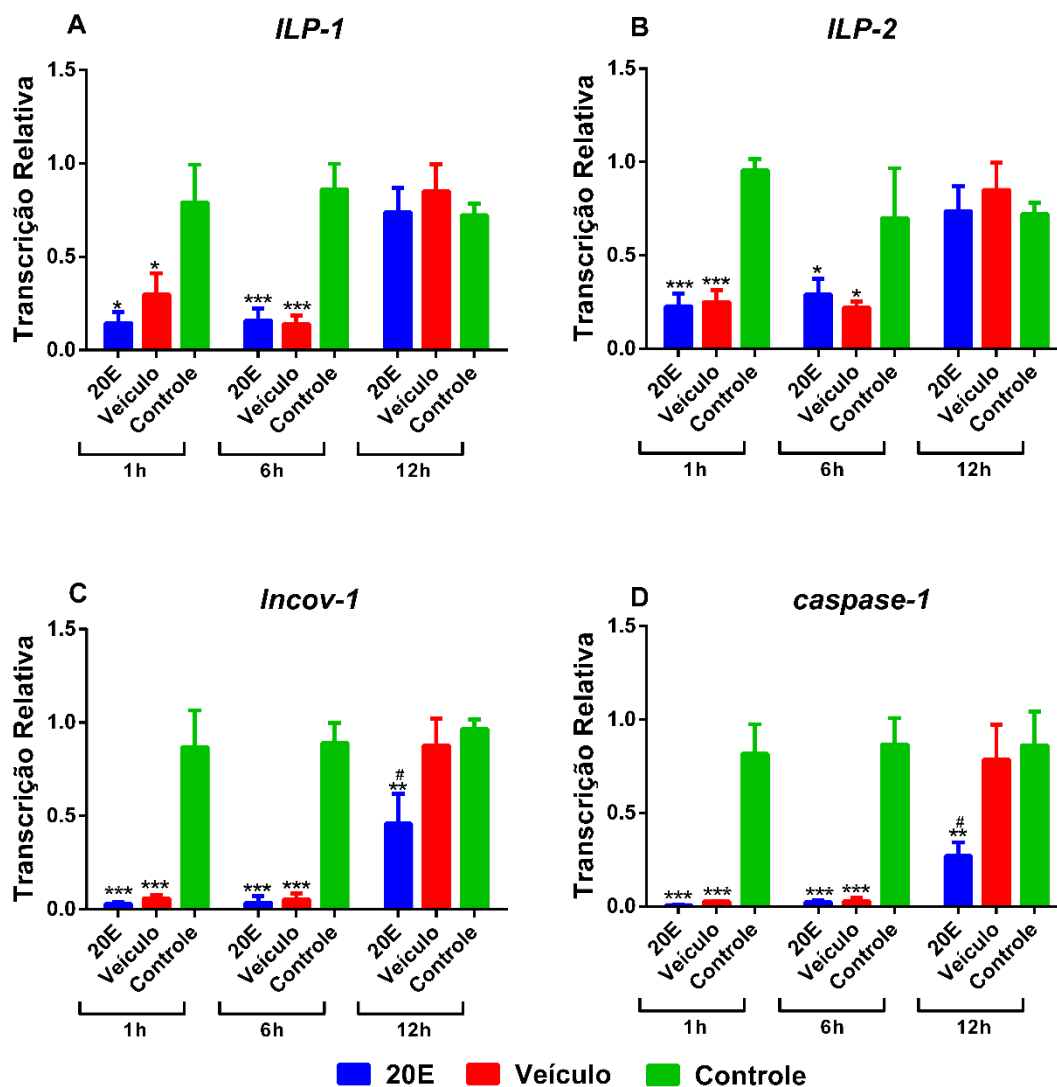
Fonte: Do autor.

Nota: Ensaios realizados em adultos-farato de olho rosa (Pp). Valores expressos como média ± EPM.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo acetona.

Os peptídeos semelhantes a insulina 1 e 2 (FIGURAS 23A e 23B) não demonstraram sofrer efeito direto da 20E em nenhum dos tempos testados. Os genes *lncov-1* (FIGUR 23C) e *caspase-1* (FIGURA 23D) apresentaram comportamento parecido diante do aumento exógeno dos ecdisteroides, sendo que ambos demonstram ser reprimidos na 12^a hora.

Figura 23. Resposta transcripcional dos genes *ILP-1*, *ILP-2*, *Incov-1* e *caspase-1* ao tratamento com 20-hidroxiecdisona 1, 6, e 12h pós- tratamento.



Fonte: Do autor.

Nota: Ensaios realizados em adultos-farato de olho rosa (Pp). Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo acetona.

Conforme pode ser visto nas figuras 20, 21, 22 e 23, para alguns genes, os veículos utilizados na diluição dos hormônios provocou alterações na expressão gênica; o que pode ser decorrente do efeito perturbador da acetona, no caso do HJ; e no caso da 20E, do efeito lesivo provocado pela perfuração com agulha. Contudo, consideramos como efeitos

hormonais efetivos as situações em que o grupo tratado com os hormônios diferia tanto do grupo controle quanto do grupo tratado com veículo.

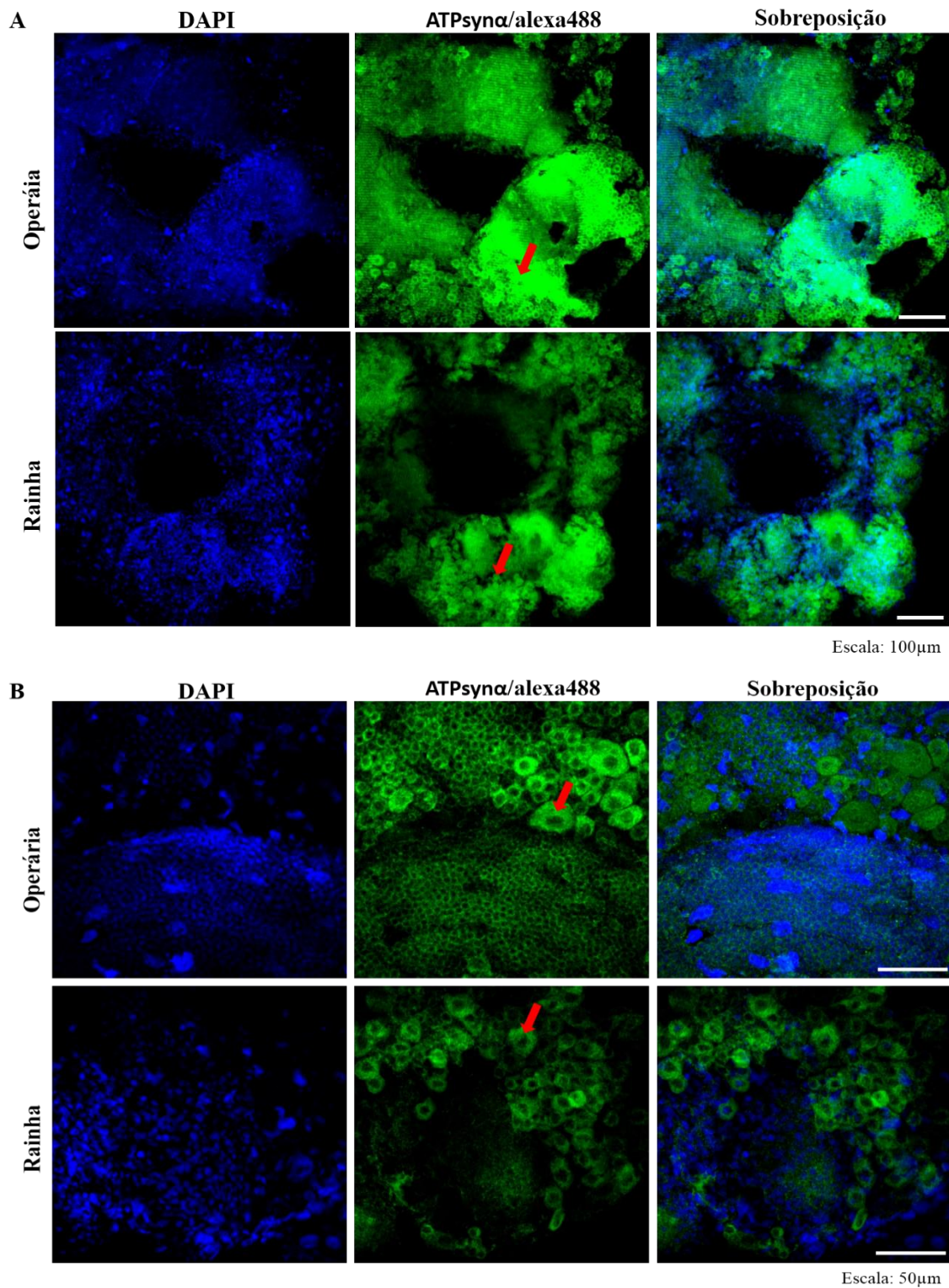
4.5 Imunofluorescência

4.5.1 Imunolocalização da ATP sintase mitocondrial em cérebros de rainhas e operárias

Utilizando anticorpo específico para a subunidade α da ATP sintase mitocondrial (ATPsyn α), localizamos a expressão dessa proteína no cérebro de rainhas e operárias Pbm. Apesar de nossas análises de expressão gênica terem sido focadas na subunidade beta, fizemos uso de anticorpos para ATPsyn α , gentilmente cedidos pelo professor Dr. Klaus Hartmann Hartfelder. Na estrutura quaternária da enzima ATP sintase, as subunidades α e β estão presentes lado a lado e em igual proporção (ver FIGURA 26). Dessa forma, valendo-se de anticorpo para a ATPsyn α somos capazes de localizar de forma indireta a ATPsyn β e assim estimar a densidade mitocondrial no cérebro de cada uma das castas.

Na figura 24 observamos que a proteína é expressa em toda extensão do cérebro nas duas castas (FIGURA 24A). Em maior aumento é possível observar que as marcações positivas do anticorpo se concentram no citoplasma das células (FIGURA 24B), algo esperado tendo em vista a localização subcelular das mitocôndrias. No que se refere à intensidade geral das marcações, o cérebro de operárias parece apresentar uma fluorescência verde mais acentuada, sugerindo que na casta há maior expressão de ATPsyn α , e por conseguinte, de ATPsyn β .

Figura 24. Imunolocalização da ATPsyn α em cérebros de rainhas e operárias Pbm.



Fonte: Do autor.

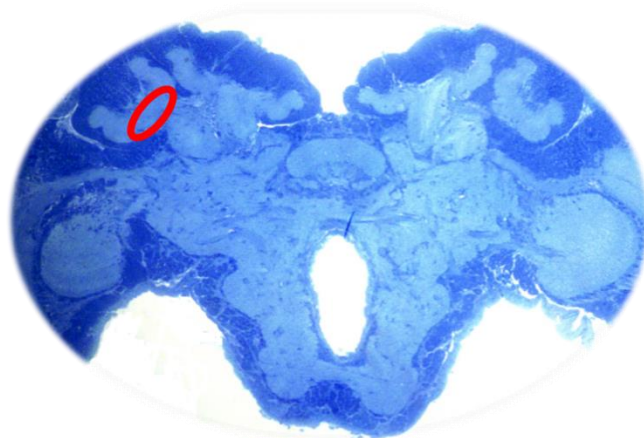
Nota: As marcações em verde representam positividade para a proteína ATPsyn α e em azul temos os núcleos celulares corados com DAPI. (A) Aumento de 20 vezes. (B) Aumento de 60 vezes dando enfoque na região subesofágica. As setas em (A) correspondem a região representado em (B). As setas em (B) mostram a localização citoplasmática da marcação positiva para ATPsyn α .

4.5.2 Imunolocalização da Hexamerina 70a em cérebro de operárias

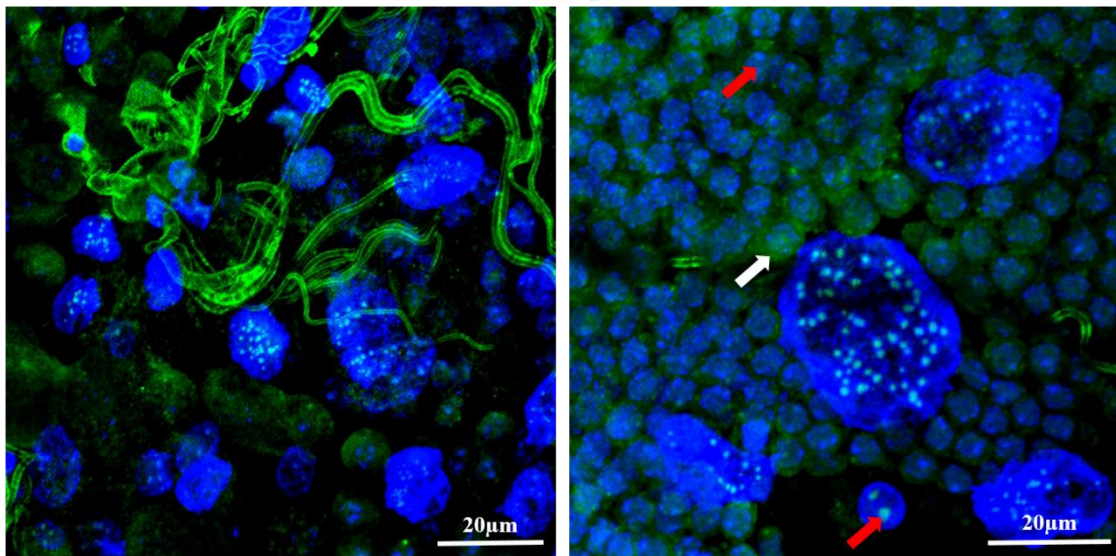
Para complementar nossos dados referentes à expressão das hexamerinas no cérebro em desenvolvimento, procedemos à imunolocalização da Hex 70a no cérebro de operária na fase de Pbm. Por meio desse experimento buscamos identificar a correta localização dessa proteína nas células neurais, algo que poderia nos sinalizar quanto a função exercida por ela no cérebro, tendo vista que o tecido neural não é um clássico produtor de hexamerinas. Nossos resultados (FIGURA 25) demonstraram que, de fato, a Hex 70a é expressa em células do cérebro de abelhas no período adulto-farato, apoiando resultados de Oliveira (2014) obtidos mediante hibridação de lâminas de *microarray* e nossas validações por RT-qPCR. As marcações positivas para Hex 70a se localizam tanto no citoplasma quanto no núcleo das células. Os pontos esbranquiçados no núcleo revelam sobreposição da marcação verde do anticorpo secundário Alexa 488 com a fluorescência azul do DAPI.

Figura 25. Imunolocalização da hexamerina 70a no cérebro de operárias Pbm.

A



B



Fonte: Do autor.

Nota: Em (A) está representado um corte histológico corado com azul de metileno, o círculo vermelho evidencia em (A) a região do cérebro representada em (B,) a qual corresponde ao anel basal do cálice lateral. A seta branca em (B) evidencia a localização citoplasmática da Hex 70a e as setas em vermelho a localização nuclear.

5 DISCUSSÃO

5.1 Morfometria cerebral

Nossas análises de morfometria cerebral revelaram que durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato, mais especificamente entre as fases de Pw e Pbm, o cérebro de operárias se desenvolve de forma mais acelerada. Como pode ser visto na figura 7A, de Pw a Pbm o cérebro de operárias apresenta maior área quando comparado ao cérebro de rainhas. Nas duas fases subsequentes, apesar de em termos absolutos o cérebro de rainhas ser maior, a proporção cérebro/corpo é maior em operárias NE (FIGURA 7B). Ademais, as análises de área relativa e absoluta das neurópilas demonstraram que, de maneira geral, estas estruturas são maiores no cérebro de operárias (FIGURAS 7, 8 e 9). Detectamos ainda, a existência de lateralização cerebral em ambas as castas (FIGURA 9).

Rainhas e operárias são facilmente distinguidas, tanto por aspectos comportamentais quanto morfológicos (WILSON, 1971; WINTSON, 1987). Em *A. mellifera*, algumas estruturas são símbolos do difenismo morfológico, dentre elas se destacam os ovários, órgãos altamente desenvolvidos em rainhas e atrófico em operárias (SNODGRASS, 1956). O desenvolvimento casta-específico dos ovários inicia-se a partir do terceiro estágio larval, momento em que as larvas passam a ser alimentadas diferencialmente. A alimentação diferencial modula os títulos de HJ de modo a favorecer sua síntese em larvas de rainhas. Os maiores títulos de HJ em rainhas tem efeito protetivo aos ovários, impedindo a ocorrência de morte celular programada neste órgão. Sendo assim, rainhas adultas chegam a possuir cerca de 200 ovaríolos por ovário, enquanto que operárias possuem no máximo 20 (CAPELLA; HEARTFELDER, 1998; LATTORFF; MORITZ, 2013; SNODGRASS, 1956)

Assim como os ovários, o cérebro apresenta desenvolvimento casta-específico durante o período larval. Em resposta à alimentação diferencial, o cérebro de rainhas se desenvolve de maneira mais acelerada (MODA et al., 2013). No entanto, até então, nada se sabia a respeito da dinâmica do desenvolvimento cerebral durante o período pupal e adulto-farato. Nossos dados demonstrando que durante esta fase da ontogênese há um favorecimento do desenvolvimento do cérebro de operárias são interessantes e mostram-

se coerentes quando consideramos o maior grau complexidade das tarefas desempenhadas pelas operárias adultas. A correlação positiva entre complexidade de tarefas e o aparecimento de especializações neuroanatômicas já foi visto até mesmo em seres humanos (MAGUIRE; WOOLLETT; SPIERS, 2006).

O cérebro de operárias, ao apresentar maior área de CGs torna-se potencialmente mais apto a desenvolver tarefas mais complexas, tendo em vista que essas estruturas são correlacionadas com a inteligência dos insetos, sendo protagonistas nos processos de aprendizagem e memória (STRAUSFELD et al., 1998). Em *D. melanogaster*, indivíduos mutantes para o *mushroom body miniature¹* (*mbm¹*), gene relacionado com a proliferação de percursos neurais, exibem redução no tamanho dos CGs e prejuízo no aprendizado e consolidação de memória (RAABE, et al., 2004; BELLE; HEISENBERG, 1996).

Em *A. mellifera*, é sabido que o padrão morfológico do cérebro é influenciado pelo tipo de tarefa desempenhada pelo indivíduo. Ao longo da vida, as operárias desempenham diferentes tarefas dentro da colônia e, para isso, alteram seu padrão comportamental. As mudanças comportamentais atreladas ao desempenho de tarefas estão relacionadas à idade das operárias e é conhecido como polietismo etário (SEELEY, 1982). O polietismo etário visto em *A. mellifera* cursa com alterações na anatomia cerebral, principalmente nos CGs (WITHERS; FAHRBACH; ROBINSON, 1993). Similarmente ao que ocorre em *A. mellifera*, vespas forrageiras da espécie *Polybia aequatorialis* possuem cálices maiores do que aquelas que executam tarefas dentro do ninho (O'DONNELL; DONLAN; JONES, 2004). Tais achados reforçam a ideia de que funções complexas, como o forrageamento, exigem desenvolvimento cerebral mais pronunciado, principalmente de estruturas relacionadas à cognição, como é o caso dos CGs.

Tal teoria já demonstrou ser aplicada ao desenvolvimento cerebral casta-específico em algumas espécies. Em formigas do gênero *Componotus* há diferenças neuroanatômicas entre rainhas e operárias, sendo que as primeiras apresentam CGs menores (EHMER; GRONENBERG, 2004; MYSORE et al., 2009). Seguindo essa mesma linha de pensamento, Julian e Gronenberg (2002) observaram que em formigas as rainhas virgens apresentavam cérebros maiores do que as rainhas maduras. Para os autores, um cérebro maior é requerido nas virgens que necessitam voar para acasalar-se e posteriormente montar o ninho. Por outro lado, as rainhas maduras não mais voam e desempenham sua função exclusivamente reprodutora dentro da colônia, fazendo com que o investimento em cérebros maiores seja desnecessário.

Nossos dados de análises morfométricas revelam que em *A. mellifera*, tal como ocorre em formigas, o desenvolvimento cerebral é casta-específico e se dá de modo a favorecer o cérebro de operárias. Neste contexto, o período pupal e adulto-farato são críticos, pois neles ocorrem remodelações cerebrais importantes, como aumento da proliferação celular nos CGs de operárias (ROAT; LANDIM, 2010), que farão com que a casta operária chegue a vida adulta com CGs maiores (FIGURA 9) e mais eficientes no processamento sensorial (GROH; RÖSSLER, 2008; GROH; AHRENS; RÖSSLER, 2006).

Interessantemente, nossos resultados foram ainda capazes de revelar a ocorrência de lateralização anatômica no cérebro de *A. mellifera*, que em operárias é mais evidente e favorece o lado esquerdo do cérebro (FIGURA 10). Há alguns anos acreditava-se que a lateralização cerebral era uma característica exclusiva da espécie humana e que isso justificava sua superioridade cognitiva (FRASNELLI, 2013). Atualmente sabe-se que a assimetria cerebral é vista em todos os vertebrados e em diversos invertebrados, mesmo naqueles mais primitivos como os nematódeos. Em *Caenorhabditis elegans*, organismo dotado de um sistema nervoso rudimentar composto de dois neurônios bilateralmente simétricos; apesar de não existir assimetria anatômica, há expressão assimétrica de receptores, genes e microRNAs, revelando a existência de uma assimetria molecular e funcional na espécie (HOBERT, 2014).

Um cérebro é considerado lateralizado ou assimétrico se houver diferenças anatômicas e/ou funcionais entre os hemisférios. Acredita-se que o estabelecimento de lateralizações anatômicas, e, por conseguinte, funcionais, reflitam uma estratégia evolutiva que visa prevenir a duplicação de respostas frente a estímulos sensoriais provenientes de órgãos que são bilaterais, como é o caso dos olhos e antenas de insetos. Essa estratégia é capaz de aumentar a velocidade e a eficiência do processamento cerebral nos animais bilaterais. Dessa maneira, quando um hemisfério se especializa no desempenho de uma tarefa, o outro fica livre para desempenhar tarefa diferente (BISAZZA; ROGERS; VALLORTIGARA, 1998). No caso de estruturas cerebrais idênticas bilaterais, costuma haver predomínio funcional de uma delas, algo capaz de prevenir o desencadeamento de respostas conflituosas em decorrência de diferentes estímulos provenientes de órgãos sensoriais bilaterais (VALLORTIGARA; CHIANDETTI; SOVRANO, 2011)

Em *A. mellifera*, o processo de lateralização já foi verificado ao nível comportamental. Letzkus e colaboradores (2006), utilizando o paradigma de extensão de

probóscide, testaram a resposta das antenas direita e esquerda a odores aprendidos. Como resultado, os autores verificaram que o aprendizado olfativo era mais eficiente quando as abelhas usavam a antena direita. Na tentativa de encontrar uma explicação para esse padrão de resposta, os autores quantificaram o número de receptores sensoriais (*sensilla placodea*) em cada uma das antenas e observaram um maior número na antena direita. Dados quantitativos similares foram reportados por Frasnelli e colegas (2010). Reforçando esses resultados, Anfora e coautores (2010), por meio de registros eletroantegráficos, demonstraram que a antena direita apresenta maiores níveis de despolarização quando exposta a odores florais e feromônios de alarme. No entanto, não há superioridade da antena direita em relação à esquerda quando se trata de memória de longo prazo. Quando abelhas são condicionadas a odores e estes odores são reapresentados a elas em um curto espaço de tempo, verifica-se um predomínio de atividade da antena direita. Entretanto, ao reapresentar o estímulo odorante após 24 h, é a antena esquerda a que mais responde. Dessa forma, conclui-se que estímulos memorizados a curto prazo são detectados pela antena direita e aqueles relacionados a memórias de longo prazo ficam a cargo da antena esquerda (FRASNELLI; VALLORTIGARA; ROGERS, 2012; ROGERS; VALLORTIGARA, 2008).

Buscando entender melhor as bases neurais e genéticas que suportam a diferenciação funcional das antenas em *A. mellifera*, Guo e coautores (2016), por meio de sequenciamento de RNA, mensuraram a expressão gênica nos hemisférios direito e esquerdo do cérebro de operárias submetidas ao paradigma de extensão de probóscide. Foram encontrados 1.038 genes diferencialmente expressos entre os dois hemisférios, 353 deles mais expressos no esquerdo e 685 no direito. Novamente, no referido estudo, foi verificado que antena direita está relacionada à memória de curto prazo e a esquerda à memória de longo prazo. De forma interessante, os autores constataram que a expressão da proteína quimiossensorial 1 foi maior do lado esquerdo, sugerindo que este hemisfério seja bastante ativo durante o processamento quimiossensorial. Adicionalmente, os autores buscaram identificar as funções desempenhadas pelos genes mais expressos em cada hemisfério. Foi constatado que aqueles genes superexpressos no hemisfério esquerdo são relacionados com comunicação e desenvolvimento celular, desenvolvimento do sistema nervoso e neurogênese.

Nossos achados referentes ao processo de lateralização no cérebro de *A. mellifera* veem corroborar estes dados já reportados na literatura. Aqui, pela primeira vez, provamos que existe maior desenvolvimento dos corpos cogumelares do lado esquerdo

do cérebro de operárias, os quais, provavelmente, estão relacionados ao estabelecimento de memórias de longo prazo e têm seu desenvolvimento estimulado pela maior expressão de genes neurogênicos superexpressos no hemisfério esquerdo. Por outro lado, rainhas recém-emergidas demonstram ter assimetria favorecendo os CGs direitos. As rainhas, por executarem na maior parte do tempo suas tarefas no interior da colônia, podem eventualmente requerer maior eficiência na memória de curto prazo, o que evitaria, por exemplo, a oviposição de dois ovos em um mesmo alvéolo.

Nossos dados, adicionados aos dados já existentes na literatura, deixam claro que em *A. mellifera*, durante o período pupal e aduto-farato, existe desenvolvimento cerebral casta-específico que favorece o cérebro das operárias e que esse processo decorre de modo a estabelecer uma lateralização anatômica e funcional neste órgão. Os resultados referentes às análises morfométricas apresentados em nosso trabalho fizeram parte de um artigo científico publicado em 2017 (BARCHUK et al., 2017; ver Apêndice).

5.2 Enriquecimento funcional

Diante de dados de expressão gênica em larga escala, como é caso dos dados de *microarray*, torna-se essencial lançar mão de ferramentas que permitam extrair informações mais globais dos resultados. Isto é feito mediante a busca de relações entre os genes revelados, o que permite montar um resumo das funções biológicas mais bem representadas (HUANG, SHERMAN, LEMPICKI, 2009a). Nesse contexto, o software DAVID mostra-se bastante útil pois permite que uma lista gênica seja analisada de forma a buscar relações funcionais entre os genes, sendo necessário, para isso, fornecer identificadores gênicos como símbolo ou o *gene ID* (HUANG, SHERMAN, LEMPICKI, 2009b). Procedemos nossas análises utilizando uma lista de ortólogos em *D. melanogaster*, tendo em vista o maior conhecimento existente a respeito desta espécie. Diversas funções mostram-se enriquecidas pelas análises do DAVID, sendo que algumas delas nortearam a escolha dos genes a serem estudados por RT-qPCR. (FIGURA 11).

Os resultados de nossas análises de *gene ontology* conversam harmoniosamente com os resultados de Vleurinck e colaboradores (2016). Neste trabalho os autores compararam o transcriptoma do cérebro de rainhas e operárias Pdp e encontraram 1760 genes diferencialmente expressos. Assim como no caso das análises de *microarray*

realizadas por Oliveira (2014), a maioria dos genes foram mais expressos em operárias. Os enriquecimentos funcionais demonstraram que havia representatividade significativa de genes relacionados a reações metabólicas envolvendo o grupo fosfato (GO:0006796), dentro das quais se incluem as reações mitocondriais de fosforilação oxidativa (GO:0006839, GO:0006122); funções relacionadas ao transporte através de membranas (GO:0006122, GO:0015370), onde inclui-se a transmissão sináptica química (GO:0007268) e a secreção de neurotransmissores (GO:0007269); bem como atividade de controle da transcrição (GO:0030528), que em nossas análises está representada pela formação do complexo de pré-iniciação da transcrição da RNA polimerase II (GO:0045899) e regulação positiva da transcrição via RNA polimerase II (GO:0045944). No que se refere aos componentes celulares, no trabalho de Vleurinck, há enriquecimento relacionado ao citoesqueleto (GO:0005856) e fibras contráteis (GO:0044449), que em nosso trabalho está representado pelo enriquecimento associado a microtúbulos citoplasmáticos (GO:0005875, GO:0005881). Ademais, os autores encontraram enriquecimento relativo a sinapses (GO:0045202), projeções neuronais (GO:0043005) e junções celulares (GO:0005911), os quais são equivalentes aos nossos achados de enriquecimento associado ao botão sináptico (GO:0043195), vesícula sináptica (GO:0008021) e junção celular (GO:0030054).

A maior expressão gênica no cérebro de operárias, evidenciada pelos dois trabalhos supracitados, sugere que durante o período pupal e/ou adulto-farato, maiores remodelações cerebrais aconteçam na casta trabalhadora de modo a preparar este órgão para orquestrar o estabelecimento de comportamentos sociais sofisticados exibidos por operárias adultas (VLEURINCK et al., 2016). Em *A. mellifera*, pelo menos no contexto do desenvolvimento do corpo larval, o aumento na expressão gênica favorece o crescimento. Utilizando sequenciamento de RNA, Chen e colaboradores (2012) demonstraram que o maior desenvolvimento de larvas de rainhas é subsidiado por níveis mais elevados de expressão gênica. Neste trabalho foram encontrados 4596 e 4787 DGEs entre rainhas e operárias, respectivamente, nas fases L4 e L5. Em ambas as fases, cerca de 70% dos genes foram mais expressos em larvas de rainhas. Resultado similares já haviam sido reportados por Barchuk e colaboradores (2007), que ao compararem dados de *microarray* de larvas L4, encontraram 167 DGEs entre as castas, sendo que deste total 107 foram regulados positivamente em rainhas. Análises de *gene ontology* revelaram que os genes mais expressos em rainhas apresentavam caráter fisiometabólico, o que pode explicar maior desenvolvimento desta casta no período larval. Em nossas análises GO

também é possível verificar representatividade de genes relacionados o metabolismo, principalmente mitocondrial e relacionado ao controle da expressão gênica, porém, há também expressão de genes de desenvolvimento relacionados à sobrevivência neuronal. Desta maneira, é possível supor que a maior expressão gênica no cérebro de operárias, tanto de genes de caráter fisiometabólicos quanto de genes de desenvolvimento, determine maior crescimento deste órgão em trabalhadoras quando comparado com rainhas.

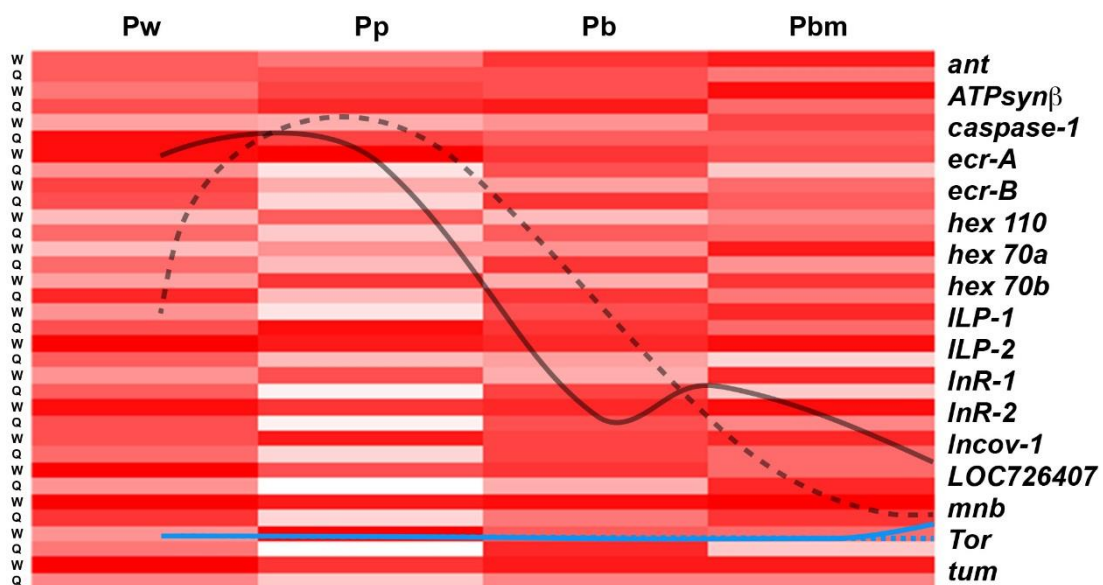
5.3 Análise do perfil transcricional e imunolocalização

A seleção de genes a serem estudados por RT-qPCR teve como uma de suas bases as análises de enriquecimento funcional dos dados de *microarray* de Oliveira (2014). Por se tratar de uma ferramenta de *screening*, os dados gerados por ensaios de *microarray* carecem de validação. Neste contexto, a técnica de RT-qPCR apresenta-se como uma opção para a validação de DGEs revelados por *microarray* (MOREY; RYAN; DOLAH, 2006). Dos cinco genes (*tum*, *mnb*, *ATPsyn β* , *ant* e *hex 70a*) selecionados a partir do trabalho de Oliveira (2014), todos tiveram sua expressão diferencial em favor das operárias validada em pelo menos uma das quatro fases de desenvolvimento analisadas. Porém, apenas *mnb* e *tum* tiveram expressão diferencial validade na fase Pp, fase utilizada nos ensaios de *microarray*. Outros doze transcritos também tiveram seu perfil de transcrição determinados. Estes foram escolhidos tendo como base não só os enriquecimentos funcionais, mas também a associação dos mesmo com o processo de determinação de castas em *A. mellifera*.

Como resultados gerais dos ensaios de RT-qPCR, obtivemos que todos os transcritos, exceto a *hex 110*, apresentaram diferença de expressão entre as castas em pelo menos uma das quatro fases analisadas. Dentre eles, doze foram mais expressos em operárias (*tum*, *mnb*, *ATPsyn β* , *ant*, *InR-1*, *InR-2*, *ILP-2*, *Tor*, *hex 70a*, *Incov-1*, *LOC 726407* e *EcR-A*). Em rainhas, apenas três transcritos foram mais expressos (*ILP-1*, *caspase-1* e *EcR-B*), sendo que *ILP-1* e *EcR-B* demonstraram ser diferencialmente expressos em apenas uma fase, Pp e Pb respectivamente, não demonstrando diferença de expressão nas demais fases. O transcrito codificador da Hex 70b mostrou padrão oscilatório, sendo mais expresso em cérebros de rainhas Pw e Pb e em operárias Pp. Todos

os dados relativos a expressão gênica estão sumarizados no *heatmap* a seguir (FIGURA 26). Nele quanto mais intensa a cor vermelha, maior é a expressão gênica. Os títulos de ecdisteroides e HJ na hemolinfa estão sobreposto ao *heatmap* para dar uma visão geral do ambiente hormonal em cada uma das fases do desenvolvimento estudada.

Figura 26. *Heatmap* sumarizando os dados de expressão gênica em cérebros de rainhas (Q) e operárias (W) de *A. mellifera* durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.



Fonte: Do autor.

Nota: Os traços sobrepostos ao *heatmap* representam os títulos hormonais na hemolinfa, sendo que as linhas pretas referem-se aos ecdisteroides e as azuis ao hormônio juvenil. Linhas contínuas representam rainhas e linhas interrompidas representam as operárias. A representação dos títulos de ecdisteroides foi feita tendo como base o trabalho de Pinto et al. (2002) e a dos títulos de hormônio juvenil no de Rembold (1987).

Detalhes da expressão de cada gene serão expostos e discutidos nos itens a seguir. Assim como feito na sessão de resultados, o perfil de expressão gênica será discutido de forma agrupada, tendo como base a correlação funcional existente entre eles.

5.3.1 *Tumbleweed e Minibrain*

Os nossos resultados de análise do perfil transcricional dos genes *tumbleweed* e *minibrain* demonstraram que o cérebro de operárias apresenta maiores níveis de transcritos para esses genes em todas as quatro fases de desenvolvimento analisadas. Ambos os genes já foram estudados em outras espécies no contexto do embriogênese neural e foram associados ao correto desenvolvimento do cérebro, sendo por isso considerados genes neurogênicos (GAO et al., 1999; TEJEDOR et al, 1995).

A proteína *tumbleweed* e seu ortólogos, CYK-4 e RacGAP50C, atuam como reguladores negativos das Rho, uma família de hidrolases de guanosina trifosfato (GTPase). Um de seus papéis biológicos mais bem descrito refere-se à formação do anel contrátil responsável pela citocinese celular. *Tumbleweed* associa-se com a proteína Pavarotti e juntas recrutam microtúbulos para a zona de ocorrência de citocinese (ZAVORTINK et al., 2005). No contexto da divisão celular, a função de *tum* parece ser essencial e não redundante, de modo que, em camundongos, uma mutação homozigótica neste gene acarreta redução na proliferação celular e morte ainda na fase de blastocisto (VAN DE PUTTE et al., 2001)

A atividade do gene *tum* é também essencial durante a morfogênese neural. Em 1999, data em que ainda não se conhecia o produto proteico do gene, pesquisadores demonstraram que mutações neste gene acarretavam prejuízos no desenvolvimento de neurônios em embriões de *D. melanogaster*. Os animais mutantes apresentavam arborização dendrítica excessiva e sem padrão de orientação, redução no número de neurônios nos dois hemisférios e crescimento axonal defeituoso (GAO et al., 1999). Estudando isoladamente neurônios dos corpos cogumelares de *D. melanogaster*, a crucialidade de *tum* para a proliferação de neuroblastos e limitação da extensão axonal foi confirmada (GOLDSTEIN; JAN; LUO, 2005).

Assim como *tum*, o gene *mnb* demonstrou ter maior atividade transcricional no cérebro de operárias. A proteína *minibrain*, também conhecida como DYKR1A, pertence à família de tirosina quinases de especificidade dual (DYRK), assim designadas devido à sua capacidade de fosforilar tanto aminoácidos aromáticos (tirosina) quanto alifáticos (serina e treonina) (SOPPA; BECKER, 2015). As proteínas quinases (PKs) formam um grupo vasto dentro do proteoma dos animais. Desta maneira, é estimado que o genoma de um mamífero seja capaz de codificar mais de mil PKs (HUNTER, 1987). Em

decorrência dessa diversidade, por meio de modificação da atividade de seus substratos, as PKs medeiam muitos processos de transdução de sinal e por isso controlam diversas funções celulares, incluindo metabolismo, transcrição, rearranjo do citoesqueleto, apoptose, diferenciação, proliferação e ciclo celular (MANNIG et al., 2002).

Um das funções controladas pelas PKs, mais especificamente pela subfamília DYRK, refere-se ao desenvolvimento do sistema nervoso. Isso se deve à capacidade de membros dessa subfamília de interagir com substratos proteicos importantes para a função neural (TEJEDOR; HÄMMERLE, 2011).

A primeira associação entre o gene *mnb* e a função neural foi reportada em 1995, data em que pesquisadores verificaram que, em *D. melanogaster*, mutações de perda de função neste gene geravam sérios prejuízos ao desenvolvimento neural. Os animais mutantes exibiam espaçamento anormal de neuroblastos e redução no número de progenitores neurais. Sendo assim, exibiam comprometimento na neurogênese pós-embriônica, o que culminava em animais adultos com redução no tamanho do cérebro (TEJEDOR et al., 1995).

A indispensabilidade de *minibrain* (DYRK1A) para a neurogênese foi também demonstrada em modelos murinos. Em embriões de camundongos, a depleção total de DYRK1A mostrou-se letal. Animais com expressão nula da enzima são incapazes de completar a fase de organogênese, vindo a óbito durante esse processo. Em períodos anteriores à morte, estes animais apresentam reduzido crescimento corporal e atraso no desenvolvimento dos órgãos primitivos. Por outro lado, os animais mutantes heterozigotos, nos quais a expressão de DYRK1A é reduzida, chegam a nascer, no entanto, apresentam menor densidade neuronal e, por conseguinte, redução no volume cerebral. Ensaios de hibridização *in situ* revelaram intensa expressão de DYRK1A no tubo neural e vesícula ótica de camundongos, sugerindo importante papel durante os estágios iniciais da neurogênese (FOTAKI et al., 2002). Adicionalmente, os animais heterozigotos exibem redução no volume do corpo celular, na arborização dendrítica e extensão axonal dos neurônios piramidais do córtex cerebral (BENAVIDES-PICCIONE et al., 2005).

A redução na densidade e volume do soma neuronal e, conseqüentemente, do volume cerebral visto nos animais mutantes, pode estar relacionada ao aumento de morte celular por apoptose visto em situações de baixa atividade de DYRK1A. A atividade dessa quinase demonstrou ser crucial para a sobrevivência celular durante o desenvolvimento da retina de camundongos. Ao longo da embriogênese, a retina, parte

ocular do sistema nervoso central, experimenta eventos de morte celular programada mediados por caspase-9. Animais com baixa expressão de DYRK1A reduzem a celularidade nas diversas camadas da retina, sendo que as camadas de origem neural são mais afetadas. Essa redução decorre do aumento das taxas de apoptose mediada por caspase-9. DYRK1A fosforila o resíduo treonina-125 da caspase-9 e garante a sobrevivência celular na retina (LAGUNA et al., 2008). Os maiores níveis transcricionais de *mnb* no cérebro de operárias podem estar exercendo papel similar, garantido uma maior proliferação de neuroblastos e sobrevivência neuronal.

Ademais, há evidências de que minibrain possa exercer controle sobre a expressão gênica. Na cadeia polipeptídica da proteína existe uma sequência que sugere transporte e função nuclear. Essa região é composta por tetrâmeros de leucinas separados por heptâmeros de aspartato, e é característica de proteínas com capacidade de ligação ao DNA, como as proteínas c-Fos e c-Jun (SONG, et al., 1996). Corroborando essa hipótese, pesquisadores demonstraram que DYRK1A é capaz de se ligar a regiões promotoras do DNA que apresentem a sequência palindrômica TCTCGCGAGA e recrutar, bem como fosforilar, a enzima RNA polimerase II, podendo assim alterar o padrão de expressão gênica (DI VONA et al., 2015).

Nossos resultados aliados às informações já disponíveis na literatura colocam os genes *tum* e *mnb* como possíveis mediadores genéticos da morfogênese diferencial em castas de *A. mellifera*. Hipotetizamos que, conjuntamente, *tum* e *mnb* garantam maior proliferação de neuroblastos e maior sobrevivência neuronal no cérebro de operárias durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato. O gene *tum* fazendo isso diretamente e o *mnb*, direta, ao exercer sua atividade quinase sobre substratos neurogênicos, e indiretamente, ao controlar a expressão de outros genes.

Diante da existência de uma literatura mais vasta correlacionando o gene *mnb* ao desenvolvimento neural, bem como sua suposta capacidade reguladora sobre a transcrição gênica, adicionados ao fato de que seus níveis transcricionais são bem maiores do que os de *tum* nos cérebros de rainhas e operárias (anexo, FIGURA 1), o escolhemos para realizarmos ensaios de silenciamento por RNA de interferência. Tais análises já estão em andamento e farão parte de um segundo artigo a ser publicado com os dados obtidos na presente tese.

5.3.2 ATP sintase- β e ADP/ATP translocase

O perfil de transcricional obtido para os genes *ATPsyn β* e *ant* foram similares, demonstrando diferença de expressão favorecendo operárias na fase de adulto-farato Pbm. Os resultados de imunolocalização indireta de ATPsyn β revelaram que, por meio da técnica utilizada, não foi possível identificar com clareza diferenças na abundância de mitocôndrias no cérebro das duas castas. Sendo assim, estudos posteriores, utilizando ferramentas metodológicas adicionais, como a microscopia eletrônica de transmissão, poderão trazer informações mais concludentes.

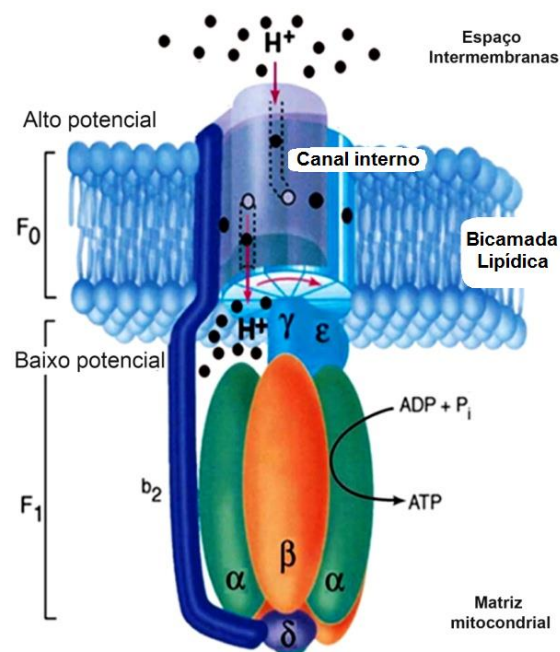
A inclusão dos genes *ATPsyn β* e *ant* nos ensaios de RT-qPCR foi motivada por nossas análises de ontologia genética, as quais demonstraram haver vários enriquecimentos relacionados ao metabolismo mitocondrial (ver anexo, quadros 2, 3 e 4). Além dos dois genes escolhidos, diversos outros relacionados à função mitocondrial fazem parte da lista dos DGEs de Oliveira (2014), como exemplo, podemos citar os genes codificadores das enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, malato desidrogenase, glicogênio fosforilase, transaldolase, subunidades E e γ da ATP sintase micondrial, subunidade α da proteína mitocondrial trifuncional e o fator de transcrição mitocondrial B1. Essa representatividade expressiva coloca as mitocôndrias como possíveis protagonistas no cenário da neurogênese casta-específica em *A. mellifera*.

No contexto da divisão de castas já parece haver um protagonismo mitocondrial. Estudo dando enfoque ao corpo gorduroso de larvas demonstrou que rainhas apresentam maior densidade mitocondrial, maiores taxas de consumo de oxigênio e maiores níveis de transcrição de genes relacionados a biogênese mitocondrial. Acredita-se que tais diferenças sejam essenciais para o processo de diferenciação de castas na espécie (SANTOS; ALBERICI; HARTFELDER, 2016). Há também indícios de que diferenças no metabolismo mitocondrial sejam importantes para o estabelecimento do polietismo etário observado em operárias adultas (CERVONI et al., 2017).

As mitocôndrias são orgânulos presentes no citoplasma de células eucarióticas cuja função primordial relaciona-se à produção de energia (GRAY, 1989). A energia gerada pelo metabolismo mitocondrial é armazenada em moléculas de adenosina trifosfato (ATP) pela ação de uma enzima chamada de ATP sintase mitocondrial ou F₀F₁ ATP sintase. Tal enzima apresenta grande conservação entre os táxons e é composta por dois domínios; F₀ que se insere na membrana externa da mitocôndria e F₁, uma unidade

catalítica hidrofílica, localizada na matriz mitocondrial (PAUMARD et al., 2002). Estruturalmente, a fração F_0 é formada por um anel oligomérico de subunidades c , uma subunidade b isolada e um dímero de b . O domínio F_1 é composto por cinco subunidades: α , β , γ , δ e ϵ ; que obedecem à estequiometria de três subunidades α e β , para uma subunidade γ , δ e ϵ . Os domínios F_1 e F_0 são unidos fisicamente por duas hastes, uma central formada pela união das subunidades γ e ϵ , e uma periférica formada pelas subunidades δ e b_2 (FIGURA 27) (STOCK; LESLIE; WALKER, 1999; MÜLLER; GRÜBER, 2003; VON BALLMOOS; WIEDENMANN; DIMROTH, 2009). Utilizando a energia potencial eletroquímica gerada pela cadeia transportadora de elétrons, o anel c de F_0 rotaciona quando prótons se ligam a seus resíduos de glutamato. A rotação do anel c é transferida para a subunidade γ , que, ao girar, promove alteração conformacional da subunidade β , que torna-se capaz de sintetizar ATP. Tal processo é conhecido como catálise rotatória (YOSHIDA; MUNHEYUKI; HISABORI, 2001; JONCKHEERE; SMEITINK; RODENBURG, 2012; MILLER, et al., 2013).

Figura 27. Estrutura da ATP sintase mitocondrial. Em destaque são mostradas as subunidades que compõem a porção F_1 .



Fonte: Adaptado de MILLER et al., 2013.

Nota: É possível notar a presença e arranjo da subunidade β .

Uma vez gerado na matriz mitocondrial, o ATP deve ser direcionado para o citosol. Em decorrência da alta seletividade da membrana interna e das características bioquímicas das moléculas, o transporte mitocondrial de ADP e ATP é realizado por uma proteína presente na membrana interna, denominada ADP/ATP translocase (ANT). O gene *ant* é um gene nuclear responsável por codificar este transportador. ANT tem íntima relação com a ATP sintase, de modo que a eficiência da fosforilação oxidativa depende da função transportadora desta proteína. Pesquisadores acreditam que a capacidade de a fosforilação oxidativa gerar apenas o ATP como moeda energética é dada pela especificidade do transporte realizado por ANT (PFAFF; KLINGENBERG, 1968; KLINGENBERG, 2008). Dada a essencialidade das funções desempenhadas pela ATP sintase e pelo translocador ADP/ATP, a expressão destas proteínas pode ser diretamente correlacionada à função mitocondrial, de forma que um aumento na expressão sugere um aumento no metabolismo das mitocôndrias.

Apesar de primordial, a geração de energia não é a única função desempenhada pelas mitocôndrias. Outras funções essenciais para a sobrevivência dos organismos têm participação direta dessas organelas, como, por exemplo, a síntese de aminoácidos, fosfolípidos e grupo heme; sinalização do cálcio, proliferação e apoptose (KÜHLBRANDT, 2015).

Diante disso, é razoável supor que a maior expressão dos genes *ATPsynβ* e *ant* no cérebro de operárias não resulte apenas em maiores níveis de geração de energia. É possível hipotetizar que uma maior atividade mitocondrial no cérebro de operárias garanta maiores taxas de proliferação de neuroblastos e maior eficiência cognitiva a esses indivíduos, algo essencial para o desempenho das complexas tarefas realizadas pelas operárias na vida adulta. É sabido que o metabolismo mitocondrial, mais especificamente a atividade da cadeia transportadora de elétrons, é capaz de regular a proliferação celular. Algo comprovado em tumores com alta taxa de proliferação, que ao terem o complexo I da cadeia respiratória bloqueado pela metformina, reduzem sua capacidade proliferativa (WHEATON et al., 2014). Na fase de Pbm, eventos proliferativos ainda estão ocorrendo no cérebro de *A. mellifera* (GANESHINA, SCHÄFER; MALUN, 2000). O aumento da expressão dos genes codificadores de proteínas mitocondriais em operárias e a redução em rainhas pode favorecer a proliferação nas primeiras e freá-la nas últimas.

Além disto, a maior expressão de proteínas mitocôndrias em operárias nas fases finais do desenvolvimento do adulto-farato pode refletir uma necessidade de um cérebro

adulto com elevado padrão cognitivo. Em decorrência da complexidade das tarefas desempenhadas pelas operárias, é coerente que elas possuam um cérebro bem suprido energeticamente e eficiente em termos de memória e aprendizado. Em *D. melanogaster*, já foi demonstrado que interferências na fosforilação oxidativa em neurônios dos corpos cogumelares afetam negativamente a consolidação da memória de longo prazo (PLAÇAIS et al., 2013).

A correlação positiva entre metabolismo mitocondrial e cognição foi também sugerida em outros animais. Em camundongos, a exposição ao níquel, agente perturbador da função mitocondrial, que ao bloquear enzimas essenciais para ocorrência da fosforilação oxidativa leva à diminuição no consumo de oxigênio e produção de ATP, bem como promove acúmulo de lactato e radicais livres na célula; provoca prejuízos na função neural, reduzindo drasticamente a capacidade de aprendizado e memória nestes animais (HE et al., 2013).

Há ainda associações entre deficiências no metabolismo mitocondrial e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer. Pacientes portadores dessa doença experimentam uma progressiva perda da capacidade de memorização e aprendizado, que progride para um estado de demência (KUMAR et al., 2015). A disfunção mitocondrial parece fazer parte da fisiopatologia do Alzheimer, de modo que, em modelos animais da doença, são detectadas reduções na expressão de genes do metabolismo energético e metabolização deficitária de glicose (LIANG et al., 2008). Especificamente, o gene *ATPsyn β* mostrou possuir atividade reduzida em camundongos portadores de Alzheimer. Essa atividade correlaciona-se com a gravidade da doença, quanto mais severa a patologia, menor é a expressão de *ATPsyn β* (WANG et al., 2017).

Diante do exposto, sugerimos que o cérebro de operárias ao possuir maiores níveis transcricionais de genes codificadores de proteínas mitocondriais apresentem maior eficiência metabólica destas organelas, algo que, durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato, promoveria maiores taxas de proliferação de neuroblastos no cérebro dessa casta e, na vida adulta, subsidiaria a manutenção de um cérebro cognitivamente eficiente.

Em suma, nossos resultados relativos aos genes codificadores de proteínas mitocondriais são interessantes uma vez que abrem precedentes para investigações futuras que podem apresentar dois eixos de abordagem: (1) determinação do papel das mitocôndrias na proliferação de neuroblastos, (2) detecção de possíveis diferenças na abundância e no metabolismo mitocondrial em cérebros adultos de rainhas e operárias.

5.3.3 Via de sinalização Insulina/TOR

Ao determinarmos os níveis de transcrição dos genes relacionados à via de insulina/TOR verificamos que os receptores insulínicos (*InR-1* e *InR-2*) estão mais expressos em cérebros de operárias, sendo que em ambas as castas, a variante 2 é mais expressa que a 1. Quanto aos peptídeos semelhantes a insulina (*ILP-1* e *ILP-2*), a variante 1 foi mais expressa em rainhas e a 2 mais expressa em operárias.

A via de sinalização insulina/TOR é uma via clássica e conservada de detecção de disponibilidade de nutrientes, capaz de regular eventos celulares como a síntese proteica, lipidogênese, proliferação, sobrevivência, crescimento e morte celular (GRÖNKE et al., 2010; STRABBURGER et al., 2012; YOON, 2017). A conservação dos componentes da via é tamanha que em invertebrados, como *D. melanogaster*, os receptores insulínicos são altamente similares, no que se refere à sequência primária de aminoácidos, aos receptores de mamíferos, de modo que a insulina destes vertebrados é capaz de se ligar aos receptores da mosca da fruta com afinidade razoável (GAROFALO, 2002; GORCZYCA; AUGART; BUDNIK, 1993). Foi valendo-se dessa conservação que pesquisadores, usando anticorpo contra insulina de mamíferos, relataram pela primeira vez a existência de peptídeos semelhantes a insulina (ILPs) em tecido de insetos (DUVE, 1978; NÄSSEL; LIU; LUO, 2015). Um peptídeo recém-descoberto é classificado como ILP quando sua sequência primária de aminoácidos apresenta alta similaridade como a da insulina de mamíferos, principalmente no que se refere ao número e posição dos resíduos de cisteína. Diferentemente do que é visto nos mamíferos, nos insetos não há sítio específico para a produção dos ILPs, sendo eles produzidos em diferentes taxas nos mais variados tecidos (NÄSSEL; BROECK, 2016).

O primeiro relato da existência de ILPs em *A. mellifera* data de 1985, quando O'Connor e Baxter, ao produzirem extrato um parcialmente purificado de cabeça, corpo inteiro, mas não de corpos decapitados de abelhas, verificaram a existência de reatividade cruzada em radioimunoensaio para insulina suína. Os extratos obtidos pelos autores ainda foram capazes de deslocar a insulina de seus receptores específicos no fígado de ratos e mostraram atividade semelhante à insulina quando em contato com adipócitos. Com esses experimentos, ficou comprovado que na cabeça de *A. mellifera* há expressão de moléculas semelhantes à insulina com alta conservação evolutiva (O'CONNOR; BAXTER, 1985). Esses resultados se devem à existência de um importante sítio de produção de ILPs no

cérebro de insetos, representado pelas células neurosecretórias localizadas na *pars intercerebralis* (NÄSSEL; BROECK, 2016). Em alguns insetos já foram descobertas outras células com capacidade de síntese de ILPs, como é o caso das células neurosecretórias laterais do cérebro de *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* (RIEHLE et al., 2006; MARQUEZ et al., 2011). Uma vez produzidos no cérebro, esses peptídeos podem atuar como neurotransmissores ou serem liberados na circulação via terminações axonais e estruturas neurohemais, de modo a atuar como hormônios (NÄSSEL; BROECK, 2016).

No contexto da homeostasia cerebral, evidências demonstram que, a sinalização insulínica é capaz de induzir a proliferação de progenitores neurais no hipocampo de ratos, garantir a sobrevivência de neurônios em cultura, bem como melhorar a memória de curto e longo prazo em camundongos (ÂBERG et al., 2000; MIELKE; TAGHIBIGLOU; WAHG, 2006; MARKS et al., 2009). Nos insetos, pouco se sabe a respeito do papel da via insulínica na neurogênese e homeostasia cerebral, no entanto, em *D. melanogaster*, foi demonstrado que a proliferação de células tronco neurais é dependente de ILPs produzidos no cérebro (LIU; SPÉDER; BRAND, 2014).

Em *A. mellifera*, até então, não existem estudos relacionando a via de sinalização da insulina com o desenvolvimento e fisiologia neural. Os trabalhos existentes envolvendo a via concentram-se quase que exclusivamente no processo de determinação de castas. Os primeiros trabalhos abordando esse assunto, usando ferramentas de análises da expressão gênica, encontraram resultados similares aos nossos, pois verificaram que o *ILP-1* é mais expresso em rainhas em resposta a uma alimentação mais nutritiva e que o *ILP-2* é mais expresso em operárias (WHEELER; BUCK; EVANS, 2006; AZEVEDO; HARTFELDER, 2008). Também corroborando nossos resultados, estudo realizado com objetivo de evidenciar as bases moleculares subjacentes à longevidade de rainhas, detectou maior expressão de *InR-1* e *InR-2* em cabeças inteiras de operárias (CORONA et al., 2007). Após a publicação dos resultados obtidos nestes trabalhos pioneiros, houve avanços nos estudos da via insulínica na espécie, de modo que começaram a sugerir evidências de distinção funcional entre os componentes da via. Ensaio utilizando RNA de interferência (RNAi) para os dois ILPs de *A. mellifera* foram capazes de demonstrar que *ILP-2* é essencial para proliferação celular em ovários e que níveis baixos de *ILP-1* reduzem os títulos de HJ na hemolinfa larval (WANG et al., 2013). Reforçando essa ideia de distinção funcional entre os ILPs de *A. mellifera*, experimentos envolvendo manipulação de dieta demonstrou que *ILP-1*, mas não *ILP-2*, responde a variações no

status nutricional (IHLE; BAKER; AMDAM, 2014). Diante disso, é possível especular que o *ILP-1* tenha maior relação com o metabolismo e o *ILP-2* relacione-se com proliferação de crescimento celular.

Com relação aos receptores, também é possível supor que haja distinção funcional. No início do desenvolvimento larval de rainhas, a expressão de *InR-1* é cerca de dez vezes maior do que a de *InR-2*, sugerindo que ele, assim como *ILP-1*, seja altamente responsivo à nutrição. Por outro lado, nos ovários de larvas de rainhas é o *InR-2* que apresenta maiores níveis de expressão (Azevedo, 2007). Dessa forma é sensato hipotetizar que *ILP-2*, mediante interação com *InR-2*, seja capaz de desencadear eventos proliferativos tanto em ovários quanto em cérebros de *A. mellifera*.

Associando nossos dados aos já existentes na literatura é concebível hipotetizar que a via insulínica, por intermédio de *InR-2* e *IL-2*, medeia a morfogênese diferencial do cérebro em castas de *A. mellifera* e que na vida atue garantindo a homeostasia neural, favorecendo a consolidação de memória, principalmente em operárias.

5.3.4 Hexamerinas

Concernente aos dados das hexamerinas, o primeiro aspecto importante a ser salientado refere-se a sua expressão e localização no cérebro, local atípico para esse tipo e proteína. Com relação ao perfil transcricional das hexamerinas no cérebro, encontramos que o gene *hex 70a* é mais expressa em operárias ao final do desenvolvimento do adulto-farato. O gene *hex 70b* demonstrou ter perfil oscilatório, com momentos de maior expressão em rainhas (Pw e Pb) e pico em operárias Pp. O gene *hex 110* demonstrou ser igualmente expresso entre as castas em todas as fases analisadas. Os resultados de imunolocalização revelaram que a Hex 70a é de fato transcrita e traduzida no cérebro e apresenta localização citoplasmática e também nuclear.

Análises em larga escala já haviam sugerido a presença de hexamerinas no cérebro de *A. mellifera*. Estudo de proteoma realizado em cérebro de operárias adultas revelou que há diferenças na expressão da hexamerina 110 entre nutrízes e forrageiras (HERNÁNDEZ et al., 2012). Utilizando sequenciamento de RNA, outro trabalho demonstrou que o gene codificador da hexamerina 70a é expresso no cérebro de rainhas e operárias durante o desenvolvimento adulto-farato (VLEURINK et al., 2016). No

entanto, nossos resultados são pioneiros no que tange a validação da expressão e localização de hexamerinas nos cérebros de *A. mellifera*.

As hexamerinas fazem parte de uma família de hexâmeros proteicos de elevado peso molecular, 500 quilodaltons (KDa), presentes na hemolinfa de insetos. Elas são sintetizadas principalmente pelo corpo gorduroso de larvas em alimentação e secretadas na hemolinfa, atingindo grandes picos momentos antes da metamorfose. Parte das hexamerinas circulantes retorna ao corpo gorduroso, via receptor específico, e são armazenadas em grânulos no interior dos trofócitos, até serem recrutadas durante a metamorfose, momento em que servirão de fonte de aminoácidos para a síntese de proteínas adultas (HAUNERLAND, 1996; TELFER; KUNKEL, 1991).

A atividade dos genes de hexamerinas gera monômeros proteicos que são nomeados de acordo com seu peso molecular. Em *A. mellifera* foram identificados quatro monômeros de hexamerinas, chamadas de hexamerina 70a, 70b, 70c e 110 (DANTY et al., 1998). Os genes codificadores das variantes a, b e c das hexamerinas de ~70 KDa estão localizados sequencialmente em um mesmo cromossomo, sugerindo a ocorrência de duplicação gênica, fenômeno comum entre as hexamerinas de insetos. O gene codificador da Hex 110 se localiza em um cromossomo diferente e codifica para uma proteína formada por 1.008 aminoácidos que possui um peso molecular em torno de 110 KDa (MARTINS et al., 2010).

Apesar da clássica função relacionada à reserva de aminoácidos, muitas outras parecem ser desempenhadas pelas hexamerinas. Uma vez na hemolinfa, essas proteínas tem a capacidade de atuar como moléculas transportadoras, ligando-se ao HJ e aos ecdisteroides (BRAUN; WYATT, 1996; LI et al., 2017). Há também evidências da participação das hexamerinas na resposta imune em *Culex quinquefasciatus* e eventos proliferativos em *Manduca sexta*, *Sapodoptera littoralis*, *Leptinotarsa decemlineata* e *A. mellifera*. Nesta última, tratamento com anticorpo contra Hex 70a demonstrou prejudicar a proliferação celular e espessamento em ovariolos de pupas de rainhas. Ademais, a Hex 70a já foi localizada no núcleo interfásico, sugerindo que essa proteína exerça efeito nuclear não relacionado a proliferação (POOPATHI et al., 2014; HAKIM et al., 2007; MARTINS et al., 2011). Adicionalmente, a Hex 70a, parece ser uma hexamerina marcadora do desenvolvimento de operárias. Isso porque sua transcrição, mas não das demais hexamerinas, é intensamente estimulada pela geleia de operária e sua produção no corpo gorduroso de operárias continua sendo maior do que em rainhas na vida adulta (MARTINS et al., 2010).

Para explicar a maior expressão de *hex 70a* no cérebro de operárias Pbm, levantamos duas hipóteses não excludentes entre si. Primeira, a Hex 70a, diante de seu suposto papel nuclear no processo de divisão celular, pode estar mediando os eventos finais de proliferação de neuroblastos no cérebro de operárias, o que não estaria acontecendo em cérebros de rainhas tendo em vista que, tal como mostrado por Roat e coautores (2010), eventos proliferativos não são mais vistos no cérebro da casta reprodutora nas fases finais do desenvolvimento adulto-farato. Segunda, dada sua localização nuclear, a Hex 70a, pode também estar realizando função não relacionada à proliferação celular. A proteína poderia atuar como fator de transcrição, regulando a expressão gênica no cérebro de operárias de modo a prepará-lo para o desempenho de tarefas na vida adulta. Dados obtidos e ainda não publicados pela pesquisadora Juliana Ramos Martins reforçam a hipótese de atuação da Hex 70a como fator de transcrição (comunicação pessoal). Esta proteína foi colocalizada com histona H3 no núcleo de trofócitos, sugerindo sua ligação ao DNA. Estes resultados foram confirmados por ensaios de imunoprecipitação, os quais demonstraram que a Hex 70a precipita-se com fragmentos de DNA.

A expressão do gene codificador da Hex 70b mostrou ter padrão oscilatório entre as castas. Interessantemente, ao se avaliar a expressão dentro de cada casta ao longo do desenvolvimento pupal e adulto-farato, um período de alta é seguido por um período de baixa expressão, tanto em rainhas quanto em operárias. Isso sugere que essa proteína esteja atuando majoritariamente como reserva de aminoácidos; sendo sintetizada em uma fase, consumida na fase seguinte e resintetizada em fase pós-consumo. Cunha e colaboradores (2005) demonstraram que a Hex 70b tem boa atuação como fornecedora de aminoácidos em situações de escassez proteica. Operárias alimentadas com dieta pobre em proteínas rapidamente recrutam a Hex 70b circulante, provavelmente para utilizá-la na biossíntese proteica. Em comparação com Hex 70a e Hex 70c, a subunidade b parece atuar mais como proteína de estocagem. Por meio do mesmo experimento mencionado acima, os autores verificaram que, em resposta a carência proteica, os níveis de Hex 70b são os que mais diminuem na hemolinfa, sugerindo recrutamento como fonte de aminoácidos. A Hex 70a praticamente não demonstrou se alterar em resposta à dieta pobre em proteínas, indicando que seu papel principal não seja relacionado à estocagem (CUNHA, 2005).

Em relação ao gene codificador da Hex 110, verificamos que não há diferenças entre os cérebros de rainhas e operárias ao longo do desenvolvimento pupal e adulto-

farato, o que nos leva a supor que ela não participe do estabelecimento do difenismo cerebral nas castas de *A. mellifera* durante o período estudado. No entanto, tem sido sugerido que a Hex 110, juntamente com as outras hexamerinas, seja importante no processo de diferenciação de castas. Em *A. mellifera*, durante o desenvolvimento larval, todas as hexamerinas são reguladas positivamente em operárias, sendo que a Hex 110 é a mais diferencialmente expressa dentre todas. Inclusive, tem sido mostrado que essa família de proteínas é indispensável para o desenvolvimento de operárias (CAMERON; DUNCAN; DEARDEN, 2013). Desta maneira, supomos que a atuação da Hex 110 seja importante e casta-específica durante o desenvolvimento do cérebro larval.

Em resumo, nossos resultados, referentes a imunolocalização da hex 70a e aos níveis de transcrição das hexamerinas (70a, 70b e 110), são interessantes pois demonstram que, mesmo durante o período de restrição alimentar, há uma atividade gênica das hexamerinas no cérebro de *A. mellifera*, órgão atípico para esse tipo de proteína, sendo que algumas vezes essa atividade é casta específica. Isso sugere que elas, mais especificamente a Hex 70a, influenciem o estabelecimento do difenismo cerebral, favorecendo o cérebro de operárias.

5.3.5 Sistema *lncov-1* e LOC 726407

O sistema gênico *lncov-1/LOC 726407*, de maneira geral, demonstrou ser mais expresso no cérebro de operárias. Tal resultado não suporta nossa hipótese inicial de que o sistema gênico estaria envolvido com o processo de morte celular no cérebro pupal em castas de *A. mellifera*, de maneira a induzir maiores taxas de morte no cérebro de rainhas.

O surgimento desta hipótese se deu tendo como referência dois trabalhos que, ao estudarem a expressão de RNAs em fase crítica da diferenciação dos ovários em castas de *A. mellifera*, identificaram o, até então desconhecido, *lncov-1*, o qual foi associado como o processo de morte celular em ovários de operárias, tendo em vista sua localização genômica em locus de características quantitativas (QTLs) associado como número e ovariolos (HUMANN; HARTFELDER, 2011; HUMANN; TIBÉRIO; HARTFELDER, 2013).

O *lncov-1* está presente no quinto íntron de um gene computacionalmente predito localizado no cromossomo 11, o *LOC 726407*, cuja função é completamente

desconhecida. A suposta proteína codificada por esse gene apresenta 466 aminoácidos e um domínio característico de proteínas extracelulares ou associadas a membrana plasmática denominado CUB (TIBÉRIO, 2013; HUMANN; TIBÉRIO; HARTFELDER, 2013). As proteínas que apresentam esse domínio foram primariamente associadas ao desenvolvimento, no entanto, já foi provado que essa família de proteínas é capaz de desempenhar diversas funções que vão desde inflamação até neurotransmissão e orientação axonal (BLANC et al., 2007; BORK; BECKMANN, 1993).

Os lncRNAs, classe à qual pertence o *lncov-1*, ainda são moléculas cuja função é pouco conhecida. São escassos os trabalhos que tem como foco identificar e atribuir funções a esses RNAs. Estudo robusto abordando a função neural dos lncRNAs na espécie humana, descobriu que algumas dessas moléculas são capazes de induzir diferenciação de células tronco pluripotentes em neurônios e também a neurogênese. Utilizando um protocolo de *microarray* específico, comparando células progenitoras neurais com células embrionárias humanas e neurônios dopaminérgicos, foram identificados diversos lncRNAs diferencialmente expressos, os quais são fortes candidatos a serem determinantes da pluripotência de células tronco e do processo de desenvolvimento neural em humanos. Neste estudo foram identificados 4 lncRNAs (RMST, lncRNA_1, lncRNA_N2 e lncRNA_N3) que estão relacionados com o processo de neurogênese. A realização de *knockdown* para estes RNAs foi capaz de provar redução do número de neurônios em cultura, diminuição da expressão de marcadores neurais e aumento de marcadores gliais (NG; JOHNSON; STANTON, 2012). Em estudo posterior, foi demonstrado que o RMST tem capacidade de se associar com fatores de transcrição e induzir a expressão de genes neurogênicos (NG et al., 2013). A associação entre lncRNAs e desenvolvimento neural já foi também sugerida em outros organismos, inclusive em invertebrados como *D. melanogaster* (YOUNG et al., 2012).

O estudo dos lncRNAs em *A. mellifera* ainda é incipiente. Os dados, até então disponíveis, se restringiam ao sistema reprodutor e à imunidade. Assim como Humann, Tibério e Hartfelder (2013), outros pesquisadores também correlacionaram a expressão de lncRNAs à reprodução em *A. mellifera*. No trabalho foi estudada a expressão de RNAs em ovários de rainhas em diferentes *status* reprodutivos e como resultado foram revelados diversos lncRNAs diferencialmente expressos, sugerindo a participação desses RNAs não codificadores na reprodução destas abelhas (CHEN et al., 2017). No contexto imunológico, já foi provado que a expressão de alguns lncRNAs é alterada em resposta a diferentes agentes infecciosos virais (JAYAKODI et al., 2015). Diante disso, nossos

dados são pioneiros no que se refere à análise de expressão de longos RNAs não codificadores no cérebro destas abelhas e sua associação com o processo de neurogênese. Sugerimos aqui que o *lncov-1* exerce função genômica e estimula a transcrição de genes de caráter neurogênico, os quais promovem maior grau de desenvolvimento cerebral em operárias. Essa hipótese pode ser suportada pela localização do *lncov-1* no núcleo celular (HUMANN; TIBÉRIO; HARTFELDER, 2013).

Quanto ao *LOC 726207*, sugerimos que codifique para uma proteína importante para o desenvolvimento e homeostasia cerebral. A proteína Neto-1, assim como a proteína codificada por *LOC 726407*, possui domínio CUB e capacidade de se associar por intermédio desse domínio, com receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e mediar a transmissão sináptica excitatória no cérebro de vertebrados. Camundongos incapazes de expressar Neto1 apresentam déficit de aprendizado e memória, quando submetidos ao teste de labirinto aquático de Morris (NG et al., 2009). Além de ser indispensável para o aprendizado e memória, a neurotransmissão glutamatérgica, mediada pelos receptores NMDA, é essencial para o desenvolvimento cerebral e estabelecimento de sinapses (DANBOLT, 2001). Em *A. mellifera*, os receptores de glutamato estão envolvidos no estabelecimento da memória, e uma perturbação na neurotransmissão glutamatérgica prejudica o estabelecimento da memória de longo prazo nestes insetos (MALESZKA; HELLIWELL; KUCHARSKI, 2000). No cérebro de *A. mellifera*, a atividade excitatória do glutamato parece ser mais expressiva nos corpos cogumelares, mais especificamente nas células de Kenyon, região onde há maior concentração de transportadores para esse neurotransmissor (KUCHARSKI et al., 2000). Diante disso, é possível especular que a proteína *LOC 726407* participe da neurotransmissão glutamatérgica em *A. mellifera*, favorecendo o desenvolvimento cerebral, memória e aprendizado nas operárias.

5.3.6 Caspase-1

Em nossos ensaios de RT-qPCR, verificamos que durante o desenvolvimento pupal e início do desenvolvimento adulto-farato há maior atividade do gene da caspase-1 no cérebro de rainhas. O interesse em estudar o gene codificador da caspase-1 surgiu inicialmente devido ao enriquecimento funcional dirigido à regulação negativa da morte celular programada e controle negativo da morte neuronal (FIGURA 10A).

As caspases são cisteino-proteases relacionadas ao processo de morte celular programada que apresentam considerável conservação entre os metazoários e estão envolvidas nos eventos de remodelação tecidual, principalmente em animais que sofrem metamorfose (ELMORE, 2007; SHEARWIN-WHYATT; KUMAR, 1999).

Um tecido animal cujo desenvolvimento e remodelação parecem depender muito da ocorrência de morte celular programada mediada por caspases é o tecido neural. Em mamíferos, já foi demonstrado que a atividade das caspases é essencial para o correto desenvolvimento do sistema nervoso. Um estudo realizado utilizando camundongos mutantes nulos para caspase-9 revelou haver nesses animais um decréscimo nos eventos apoptóticos no cérebro, levando a um prejuízo no desenvolvimento do sistema nervoso e até mesmo a letalidade embrionária em alguns casos. Ao realizar análise histológica do cérebro dos mutantes recém-nascidos observou-se intensa perturbação da arquitetura cerebral, com desorganização cortical, áreas necróticas e expansão ventricular, além de crescimento tecidual para além da calota craniana (HAKEM et al., 1998). Trabalho similar foi desenvolvido em animais mutantes nulos para caspase-3. No estudo, os autores observaram que a depleção gerou intensa perturbação no desenvolvimento cerebral e o fenótipo dos animais foi similar ao dos mutantes para caspase-9 (KUIDA et al., 1996).

No sistema nervoso, as caspases não só medeiam eventos de morte celular requeridos para o correto desenvolvimento neural, mas também apresentam funções não relacionadas ao processo de apoptose e que são essenciais para a manutenção da homeostasia tecidual (SHALINI, 2015). Aparentemente, fatores como intensidade e tempo de ativação determinam o tipo de função desempenhada por essas proteases. Ativações mais longas e intensas são requeridas para a ocorrência de apoptose, em contraste, funções não apoptóticas podem ser executadas mediante sinais ativadores mais breves e de menor intensidade (SNIGDHA et al., 2012).

Estudos de eletrofisiologia realizados em hipocampo de ratos e camundongos revelaram que a plasticidade sináptica, característica do sistema nervoso essencial para o aprendizado e consolidação de memória, é dependente da atividade das caspases (LU et al., 2006; LI et al., 2010). A plasticidade sináptica configura-se como sendo a capacidade de modificação na eficiência da transmissão sináptica; seja por meio de potenciação de longo prazo (LTP), que leva ao aumento da eficiência sináptica, ou por depressão de longo prazo (LTD), que reduz a transmissão de sinais via sinapses (BLISS; LØMO, 1973). Em modelos murinos, foi demonstrado que proteínas anti-apoptóticas e mutações de perda de caspase-3 impedem o estabelecimento da LTD via bloqueio da internalização

dos receptores de glutamato AMPA (*α -amino-3-hydroxy-5methyl-isoxazolepropionic acid*) (LI et al., 2010).

A conectividade neural é outro aspecto importante do sistema nervoso influenciado pela atividade catalítica das caspases. Durante o desenvolvimento do tecido neural, dendritos e axônios exibem intenso crescimento em resposta à ação de fatores neurotróficos, e à medida que crescem estabelecem diversas conexões, algumas das quais são supérfluas. Tais conexões são desfeitas mediante a ocorrência de um processo denominado *prunning*, que em tradução literal para o português significa poda. O *pruning* consiste na eliminação de axônios, dendritos e sinapses indesejáveis, sem ocorrência de morte neuronal, sendo indispensável para a maturação funcional do sistema nervoso (HOLLVILLE; DESHMUKH, 2017). As caspases demonstram ser essenciais durante o processo de *pruning* em *D. melanogaster*. Neurônios sensoriais da mosca da fruta sofrem *pruning* durante a transição larva-pupa. Moscas alteradas geneticamente para não expressarem DRONC (*Death regulator Nedd2-like caspase*), uma caspase iniciadora, são incapazes de realizar *pruning* dendrítico durante a metamorfose. A superexpressão de DIAP1 (*Death associated inhibitor of apoptosis 1*), proteína que exerce efeito inibitório sobre DRONC, também prejudica a ocorrência de remodelação neuronal por *pruning* (WILLIAMS et al., 2006). É sugerido que a não atividade das caspases durante o *pruning* inviabilize a remodelação do citoesqueleto, algo que impediria a eliminação de neuritos e sinapses indesejáveis (HYMAN; YUAN, 2012).

O estabelecimento de conexões neurais eficientes e a modulação da eficiência sináptica, ambos influenciados pela ação das caspases, são essenciais para o processo de aprendizado e consolidação de memória. Sendo assim, era de se esperar que perturbações na sinalização das caspases prejudicassem diretamente esses processos cognitivos. Essa hipótese foi confirmada em modelo murino onde a infusão central de inibidor de caspases prejudicou o aprendizado e memória dos animais submetidos ao labirinto aquático de Morris e ao teste de medo condicionado ao contexto (DASH; BLUM; MOORE, 2000; STEPANICHEV et al., 2005).

Em *A. mellifera* o conhecimento a respeito da maquinaria bioquímica envolvendo caspases é ainda incipiente. Existem poucos trabalhos na literatura científica abordando o papel destas proteínas no contexto de morte por apoptose e nenhum investigando as possíveis funções não apoptóticas dessas enzimas na espécie (DALLACQUA; BITONDI, 2014; WU et al., 2015; RONAI; OLDROYD; VERGOZ, 2016). Nossos resultados referentes à expressão de *caspase-1* em cérebros de rainhas e operárias em

desenvolvimento veem contribuir com os conhecimentos já existentes e levantar novos questionamentos no tocante às funções dessas proteases no desenvolvimento e homeostasia do sistema nervoso destes insetos.

Predições bioinformáticas identificaram no genoma de *A. mellifera* quatro genes codificadores de caspases, dentre os quais está *caspase-1*; gene que codifica para uma caspase ortóloga da caspase-7 de mamíferos (DALLACQUA, 2010; DALLACQUA; BITONDI, 2014; RONAI; OLDROYD; VERGOZ, 2016). A atividade da caspase-1 já foi sugerida como mediadora de eventos apoptóticos em cérebros de abelhas expostas a doses subletais de imidacloprida, um agonista dos receptores nicotínicos muito utilizado como inseticida no setor agrícola (WU et al., 2015). Eventos de morte celular mediados por caspases são também essenciais para o desenvolvimento casta específico dos ovários de *A. mellifera*. Ronai, Oldroyd e Vergoz (2016) demonstraram, por meio de ensaio enzimático que quantifica a atividade das caspases-3 e -7 em homogenato tecidual, que o feromônio de rainha é capaz de induzir apoptose em ovários de operárias adultas. Durante o desenvolvimento larval, proteínas ativadoras e inibidoras da apoptose estão diferencialmente expressas em ovários de rainhas e operárias, sugerindo que os eventos de morte celular que ocorrem, principalmente nos ovários de operárias, sejam mediados por apoptose e tenham participação das caspases (DALLACQUA; BITONDI, 2014).

No presente trabalho, propomos a participação das caspases, mais especificamente da caspase-1, como mediadora dos eventos de morte celular essenciais durante a morfogênese cerebral pós-metamórfica de *A. mellifera*. Esta ação pró-apoptótica estaria ocorrendo em maior intensidade no cérebro de rainha nos estágios iniciais do desenvolvimento de pupal (Pw) e adulto-farato (Pp). Nos demais estágios, a caspase-1 pode estar exercendo funções não apoptóticas relacionadas ao estabelecimento de conexões neurais eficientes requeridas para o aprendizado e memória, em ambas as castas. Experimentos futuros envolvendo análise de expressão gênica das demais caspases no cérebro em desenvolvimento, ensaios de atividade enzimática, silenciamento gênico e análises comportamentais poderão deixar claro o real papel das caspases tanto no desenvolvimento quanto na homeostasia funcional do cérebro de *A. mellifera*.

5.3.7 Receptor de ecdisteroides

Os perfis de transcrição das variantes A e B do receptor de ecdisteroides revelou haver divergências entre elas, de modo que *EcR-A* foi mais expresso no cérebro de operárias em três das quatro fases analisadas e o *EcR-B* foi mais expresso em rainhas, mais especificamente na fase de Pb.

O termo ecdisteroides refere-se de modo genérico a uma classe de compostos que se assemelham estruturalmente à ecdisona, cuja estrutura química básica é um esqueleto carbônico denominado ciclopentanoperidrofenantreno altamente hidroxilado (SAVCHENKO; ODINOKOV, 2012). Nos insetos, esses compostos atuam como hormônios que controlam, principalmente, muda e metamorfose (DINAN, 2003). Ao nível celular, a resposta aos ecdisteroides é transduzida por intermédio dos chamados receptores de ecdisteroides (*ecr*) (SPINDLER et al., 2009).

A maioria dos insetos é capaz de expressar diferentes isoformas de EcR e dessa maneira desencadear distintos padrões de resposta em presença dos ecdisteroides. Em *D. melanogaster*, por exemplo, o gene *EcR* permite a produção três isoformas: EcR-A, EcR-B1 e EcR-B2. Todas as três proteínas geradas são idênticas no que se refere à região de ligação ao DNA e aos ecdisteroides. No entanto, a porção N-terminal é única em cada uma das isoformas, o que influencia na capacidade de ativar ou reprimir a expressão gênica (BRAUN; AZOITEI; SPINDLES-BARTH, 2009; SCHWEDES; TULSIANI; CARNEY, 2011).

A ideia de que diferentes isoformas suscitem distintas respostas é bastante razoável considerando que, em momento crítico da ação dos ecdisteroides, é essencial que alguns tecidos e tipos celulares se comportem de maneira distinta ao serem estimulados pelos altos títulos hormonais. Durante a metamorfose, muitos tecidos se degeneram em resposta aos níveis elevados desses hormônios na hemolinfa, todavia, alguns tecidos e células, como é o caso dos discos imaginais, devem sofrer proliferação para dar origem aos tecidos adultos (ALDAZ; ESCUDERO, 2010). Essa resposta tecido específica aos ecdisteroides é mediada tanto pela expressão diferencial das isoformas nos tecidos quanto pela variação temporal dessa expressão. Em *D. melanogaster* a expressão de *EcR-B1* parece estar relacionada temporalmente a tecidos que sofrem degeneração durante a metamorfose e *EcR-A* a tecidos que experimentam eventos proliferativos, como é o caso dos discos imaginais e os ovários (KIM; PARK; LEE, 1999).

A ação dos ecdisteroides no sistema nervoso varia de acordo com o período do desenvolvimento em questão e a variante do receptor mais expressa no momento. Na mosca da fruta, um aumento da expressão de EcR-B1 previamente à metamorfose provoca eliminação de sinapses e perda da arborização dendrítica. O contrário acontece durante a pupação, momento no qual os elevados títulos de ecdisteroides promovem neuritogênese e sinaptogênese por intermédio de EcR-A. Neste inseto, os níveis de EcR-B1 no tecido neural permanecem praticamente indetectáveis ao longo de todo período pupal, reaparecendo próximo ao surgimento do inseto adulto, momento em que os ecdisteroides atuam suprimindo a maturação neural (TRUMAN et al., 1994). De maneira geral, EcR-B1 parece ser responsável pela metamorfose dos tecidos larvais, incluindo o tecido nervoso, ficando o EcR-A a cargo da maturação dos tecidos adultos que surgem após a metamorfose (SCHUBIGER et al., 2003). No contexto da morte celular EcR-A e EcR-B1 também parecem atuar de maneira distinta. A morte celular que ocorre nos lobos ópticos de *D. melanogaster* é dependente da expressão de *EcR-B1* e, de maneira oposta, *EcR-A* demonstrou ter efeito indutor de sobrevivência celular (HARA et al., 2013).

Em *A. mellifera* foram reportadas duas isoformas de EcR (EcR-A e EcR-B) que diferem entre si na sequência de nucleotídeos. Enquanto a variante A apresenta 2.635 nucleotídeos, a B possui 2.782. Variações no tamanho, na sequência nucleotídica e processamento pós-transcricional, resultam em proteínas com diferenças na sequência primária de aminoácidos. Apesar de o transcrito primário de *EcR-A* ser menor, a proteína gerada por ele apresenta 629 aminoácidos, enquanto que *EcR-B* possui 557. Uma similaridade de 455 aminoácidos é vista nas duas proteínas, ficando as maiores divergências restritas à porção N-terminal, região regulatória com capacidade de ligação ao DNA (MELLO et al., 2014; WATANABE; TAKEUCHI; KUBO, 2010).

Ao longo do desenvolvimento de *A. mellifera* é predominante a expressão de *EcR-A*, exceto durante o período embrionário onde há superexpressão de *EcR-B*. Comparações entre as castas demonstram que *EcR-A* é maior em operárias no final do período larval e início do período pupal, bem como em período próximo à emergência e no indivíduo recém-emergido. Correlacionando os títulos de ecdisteroides na hemolinfa com a expressão de *EcR* no período pupal, verifica-se que há existência de associação negativa entre eles, pois picos de ecdisteroides cursam com baixa expressão de ambas isoformas nas duas castas. Este efeito repressor exercido pelos ecdisteroides sobre *EcR* demonstrou ser mais intensos em rainhas. A aplicação de 20E em pupas Pb reduziu a expressão de

EcR-A e *EcR-B* em rainhas, todavia, em operárias, apenas *EcR-B* mostrou ser reprimido em resposta à aplicação de 20E (MELLO et al., 2014).

Apesar de contribuir bastante para o início do entendimento de como os ecdisteroides exercem seus efeitos ao longo do desenvolvimento de *A. mellifera*, o trabalho mencionado apresenta limitações, uma vez que nele não foram analisadas as variações teciduais na expressão das isoformas de EcR, algo particularmente importante considerando que em outros insetos já foi demonstrado que a expressão das isoformas varia temporal e espacialmente. Nesse contexto, nossos resultados vêm somar aos dados já existentes, pois conferem uma visão geral da expressão de *EcR-A* e *EcR-B* em um importante tecido, o tecido nervoso.

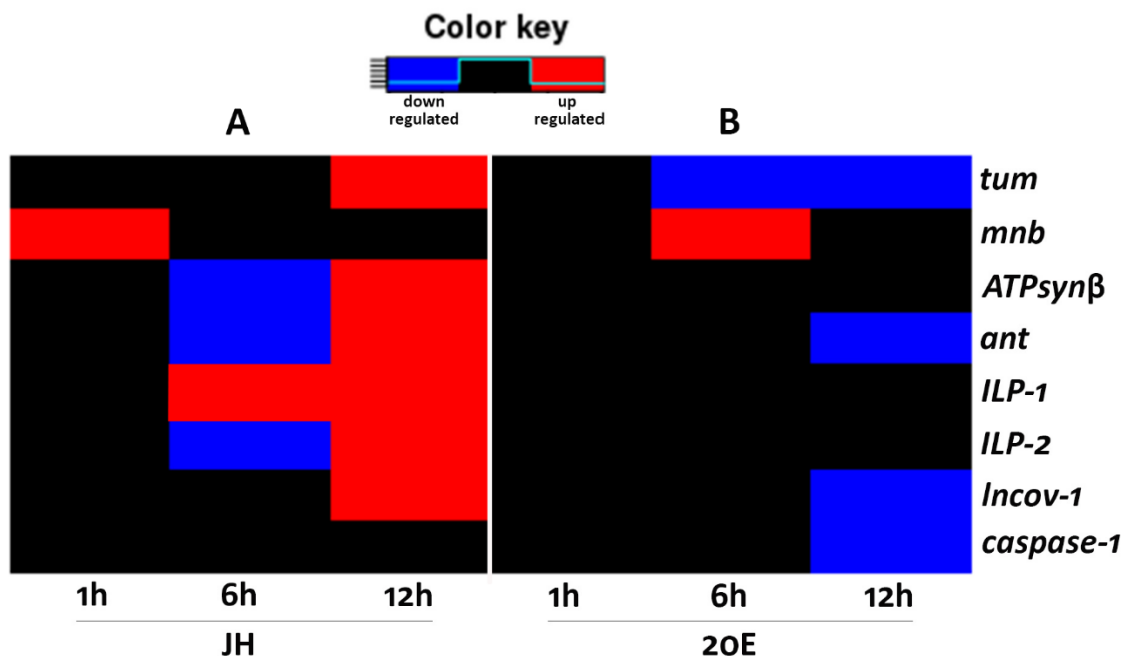
Os resultados encontrados em nosso trabalho conversam de forma harmoniosa com os estudos realizados em *Drosophila* citados anteriormente (TRUMAN, 1994; TRUMAN et al., 1996; SCHUBIGER et al., 2003; HARA et al., 2013). Com base neles, hipotetizamos que a maior expressão de *EcR-A* em cérebro de operárias induza sobrevivência e maturação neuronal em intensidade maior do que em rainhas. Além disso, acreditamos que durante a morfogênese cerebral no período pupal e adulto-farato, *EcR-B* atue mediando, diferencialmente, eventos de morte celular e *pruning* neuronal em rainhas e operárias.

Essa hipótese é reforçada pelos nossos achados de expressão de *EcR-B* em Pw, os quais revelaram níveis similarmente altos de expressão nas duas castas. Durante a metamorfose e início da pupação é essencial que morte celular e *pruning* ocorram no cérebro para que neurônios larvais se degenerem e sinapses desnecessárias sejam desfeitas (HOLLVILLE; DESHMUKH, 2017). Como tais eventos devem inicialmente acontecer em ambas as castas, é coerente que a expressão de *EcR-B* no início da pupação seja coincidente no cérebro de rainhas e operárias. A maior expressão de *EcR-B* em rainhas Pb pode ajudar no estabelecimento das diferenças morfométricas do cérebro entre as castas no período adulto-farato. Tal como mostrado por nossos dados de morfometria, até Pbm o cérebro de rainhas é menor do que o de operárias, isso em decorrência das maiores taxas de morte celular vistas em rainhas, que inicialmente (Pw e Pp) podem ser sustentadas pela maior expressão da *caspase-1* em rainhas, e, posteriormente (Pb), ficar a cargo do *EcR-B*. As hipóteses aqui levantadas carecem de confirmações que poderão ser obtidas mediante utilização de ferramentas como RNAi, tendo como alvos específicos cada uma das isoformas de EcR presentes em *A. mellifera*.

5.4 Tratamentos hormonais

Em decorrência do fato de nossos ensaios hormonais terem sido realizados utilizando dois diferentes hormônios (20E e HJ) em três diferentes tempos pós-tratamento (1, 6 e 12 h), uma grande quantidade de resultados foi gerada, algo que dificulta a aquisição de uma visão geral das respostas gênicas diante de cada um dos hormônios. Na intenção de dar um panorama geral das respostas gênicas às administrações hormonais, foi elaborado um *heatmap* resumando os dados (FIGURA 28).

Figura 28. *Heatmap* resumando os resultados obtidos nos ensaios de administração hormonal.



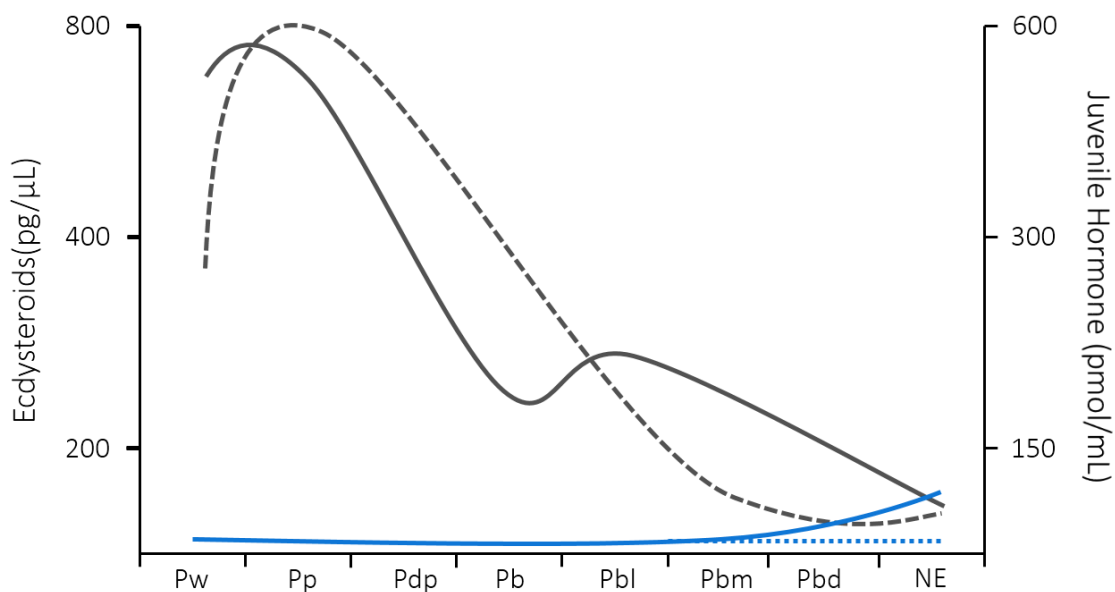
Fonte: Do autor.

Nota: A cor vermelha representa expressão gênica estimulada, o azul expressão gênica reprimida e o preto ausência de resposta ao estímulo hormonal.

Como pode ser visto na figura 28, o tratamento com HJ foi capaz de alterar a expressão de um número maior de genes. Dos oito transcritos analisados, sete responderam ao HJ (*tum*, *mnb*, *ATPsynβ*, *ant*, *ILP-1*, *ILP-2*, *lncov-1*, *caspase-1*), sendo que quatro deles (*ATPsynβ*, *ant*, *ILP-1*, *ILP-2*) responderam em dois tempos de pós-tratamento (6 e 12 h), contra cinco (*tum*, *mnb*, *ant*, *lncov-1*, *caspase-1*) que responderam a 20E.

Para melhor compreender as respostas transcricionais diante da administração exógena de hormônios é necessário considerar os níveis hormonais endógenos. Quanto aos ecdisteroides, é sabido que durante o desenvolvimento larval os títulos são baixos, aumentando na fase de pré-pupa, sendo esse aumento mais expressivo em rainhas (RACHINSKY et al., 1990). No período pupal (Pw) os títulos ainda permanecem maiores em rainhas, situação que começa a se inverter em adultos-farato Pp, momento de maior concentração desses hormônios considerando todo o ciclo de vida desses insetos, e se consolida em Pb, com operárias apresentando concentração de ecdisteroides significativamente superior. Em fases subsequentes os títulos caem em ambas as castas e nova inversão acontece de maneira que rainhas Pbm apresentam concentrações maiores que operárias. As concentrações continuam a cair de forma que níveis baixos são vistos no indivíduo recém-emergido (PINTO et al., 2002; MELLO et al., 2014). No tocante ao hormônio juvenil, é durante o desenvolvimento larval que são detectados os maiores títulos desse hormônio em ambas as castas porém, eles são bem superiores em larvas destinadas a se tornarem rainhas. À medida que o período de alimentação chega próximo ao fim, as concentrações tendem a níveis indetectáveis. Em pré-pupas, momentos antes da metamorfose, ocorre um pico em rainhas e operárias, sendo que em rainhas esse pico é mais expressivo. Durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato as concentrações são baixíssimas e praticamente indetectáveis nas duas castas. A partir de Pbm, até o indivíduo recém-emergido, os títulos apresentam discreto aumento em rainhas e permanecem basais em operárias (REMBOLD, 1987). Para melhor compreensão do ambiente endócrino natural no período estudado em nosso trabalho, os títulos de ecdisteroides e de HJ foram plotados em um mesmo gráfico e exibidos na figura 29.

Figura 29. Perfis hormonais durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato em castas de *A. mellifera*.



Fonte: Do autor.

Nota: Os traços pretos referem-se aos títulos de ecdisteroides e os azuis ao hormônio juvenil. Rainhas são representadas pelas linhas contínuas e operárias pelos tracejados. Os valores foram extraídos dos trabalhos de Rachinsky et al (1990), Pinto et al (2002) e Rembold, (1987).

Considerando o ambiente endócrino no momento de nossas administrações hormonais torna-se coerente encontrar maior responsividade ao HJ. Em adultos-farato Pp os níveis de HJ são baixíssimos, enquanto que os de ecdisteroides são os mais altos de todo o desenvolvimento destes insetos. Desta maneira, acreditamos que a não responsividade de alguns transcritos se deva a mecanismos de saturação. Genes como *ATPsynβ*, *ILP-1* e *ILP-2* podem estar respondendo de forma máxima aos ecdisteroides endógenos e por isso tornam-se insensíveis a 20E exógena.

O único gene a não responder à administração de HJ foi *caspase-1*. É provável que essa insensibilidade ao HJ seja um mecanismo particularmente importante para o desenvolvimento do cérebro durante o período larval. Nesta fase, o cérebro de ambas as castas experimentam eventos proliferativos (MODA et al., 2013), não sendo requerida a ocorrência de morte celular, e por conseguinte ação das caspases. Uma eventual resposta positiva de *caspase-1* ao HJ poderia acarretar picos de morte celular principalmente em larvas jovens e pré-pupas, o que prejudicaria a proliferação de neuroblastos, evento importante para maturação cerebral que ocorre no período pupal e adulto-farato.

Dois genes (*tum*, *lncov-1*) apresentaram respostas antagônicas diante dos dois hormônios. Em alguns casos, os ecdisteroides e o HJ exercem funções divergentes, algo particularmente importante durante o desenvolvimento larval, quando o HJ atua de modo a manter as características juvenis das larvas e os ecdisteroides agem a fim de induzir as mudas e a metamorfose (LI; JIA; LI, 2018; LIU et al., 2018). Esse padrão antagônico de resposta transcricional mostrou acontecer com genes relacionados à imunidade em *D. melanogaster*, os quais são estimulados pela 20E e reprimidos pelo HJ (FLATT et al., 2008).

Outros genes que se comportaram de forma interessante foram *ATPsynβ*, *ant*, *ILP-2*, os quais apresentaram resposta dual ao hormônio juvenil. Esse comportamento pode encontrar explicação no modelo de Ashburner proposto para explicar o mecanismo de ação de hormônios de função nuclear. Este modelo postula que a resposta a hormônios que exercem função no núcleo pode ser dividida em dois momentos. Primeiro, por ação hormonal direta há a modulação da expressão de alguns genes de resposta primária. Estes ao serem ativados, regulam a expressão de outros genes que se responsabilizam pelas respostas tardias e podem, por exemplo, regular a transcrição dos genes de resposta primária (HILL et al., 2013; MELLO et al., 2014). O HJ ao apresentar efeitos genômicos pode agir segundo o modelo de Ashburner. Assim sendo, os genes *ATPsynβ*, *ant*, *ILP-1*, *ILP-2*, em um primeiro momento, podem estar sendo regulados por um conjunto de fatores de transcrição de resposta inicial e, em segundo momento, por intermédio de outro conjunto de fatores de transcrição, invertem seu padrão de resposta.

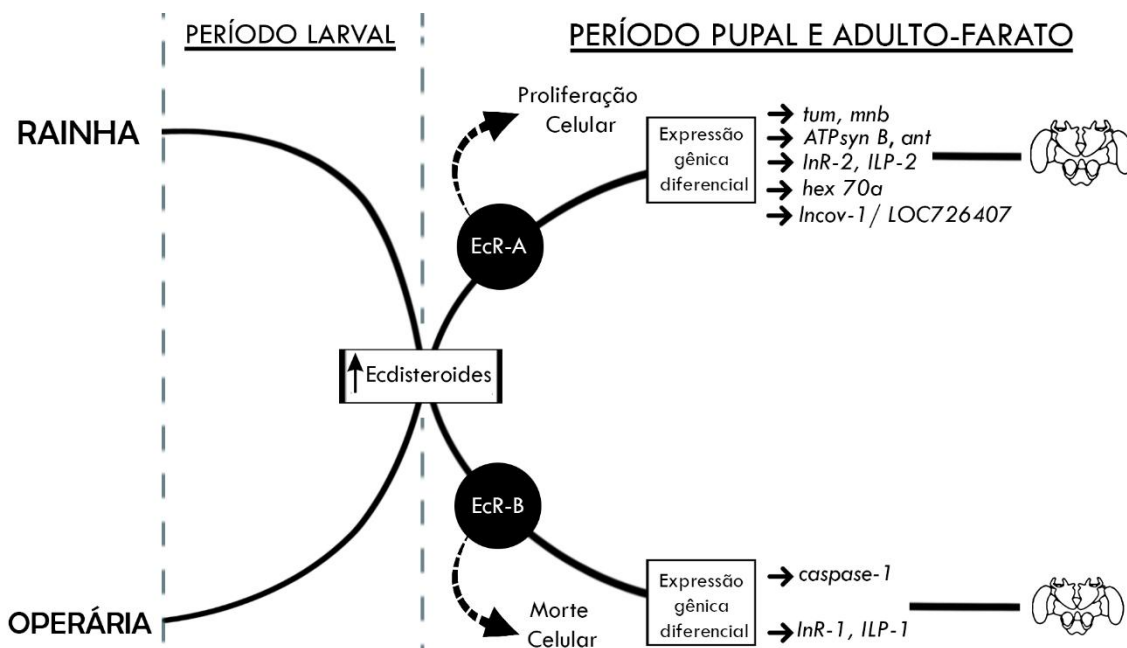
Por fim, mais uma vez o comportamento do gene *minibrain* nos chamou a atenção. Primeiramente por ter sido o único dos oito genes a apresentar responsividade hormonal no tempo de 1 h. Este comportamento suporta a hipótese de que a proteína *minibrain* atue regulando a expressão gênica (KINSTRIE et al., 2006). Genes que codificam para fatores de transcrição costumam apresentar rápida resposta a hormônios. Como exemplo podemos citar os genes *E74* e *E75*, classicamente conhecidos como genes de resposta rápida a 20E, e *Küppel homolog 1*, gene de resposta rápida ao HJ. Segundo, o *minibrain* respondeu positivamente tanto ao HJ quanto a 20E, sugerindo que, em resposta a diferentes contextos hormonais, este gene exerça efeito neurogênico tanto no período larval, favorecendo o cérebro de rainhas, quanto no período pupal, favorecendo as operárias. Estes resultados, aliados à alta expressão de *minibrain*, principalmente no cérebro de operárias e suas já conhecidas funções em outros modelos animais, justificam

nossos ensaios de silenciamento gênico direcionados a esse gene, os quais estão em andamento e farão parte do artigo final da tese.

6 CONCLUSÃO

Durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato ocorre inversão no padrão de desenvolvimento cerebral favorecendo as operárias, privilegiando de maneira mais específica o desenvolvimento dos corpos cogumelares e pedunculares. Em ambas as castas a morfogênese cerebral ocorre de modo a estabelecer uma lateralização anatômica que favorece o hemisfério esquerdo do cérebro. O estabelecimento desse dimorfismo cerebral em *A. mellifera* é guiado por genes diferencialmente expressos e modulados por hormônios, sendo que o gene *minibrain* parece ser um protagonista no contexto do desenvolvimento cerebral em *A. mellifera* (FIGURA 30).

Figura 30. Esquema proposto para explicar o processo de morfogênese cerebral diferencial em castas de *A. mellifera*.



Fonte: Do autor.

REFERÊNCIAS

- ÅBERG, M. A. I. et al. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. **Journal of Neuroscience**, Washington, v. 20, n. 8, p. 2896-2903, 2000.
- ALDAZ, S.; ESCUDERO, L. M. Imaginal discs. **Current Biology**, London, v. 20, n. 10, p. R430, 2010.
- ANFORA, G. et al. Behavioural and electrophysiological lateralization in a social (*Apis mellifera*) but not in a non-social (*Osmia cornuta*) species of bee. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 206, n. 2, p. 236-239, 2010.
- AZEVEDO, S. V. **A via de sinalização insulínica (IIS) na diferenciação de castas em *Apis mellifera***. 2007. 105f. Dissertação (Mestrado Genética) – Faculdade de Medicina, USP-RP, Ribeirão Preto, 2007.
- AZEVEDO, S. V.; HARTFELDER, K. The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development—differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 54, n. 6, p. 1064-1071, 2008.
- BARCHUK, A. R. et al. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. **BMC Developmental Biology**, London, v. 7, n. 1, p. 70, 2007.
- BARCHUK, A. R. et al. The ontogenetic saga of a social brain. **Apidologie**, Paris, v. 49, n. 1, p. 32-48, 2018.
- BEETSMA, J. The process of queen-worker differentiation in the honey bee. **Bee World**, London, v. 60, p. 24-39, 1979.
- BELLE, J. S.; HEISENBERG, M. Expression of *Drosophila* mushroom body mutations in alternative genetic backgrounds: a case study of the mushroom body miniature gene (*mbm*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, n. 18, p. 9875-9880, 1996.
- BENAVIDES-PICCIONE, R. et al. Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the *Dyrk1A*^{+/-} mouse. **Neurobiology of Disease**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 115-122, 2005.

BISAZZA, A.; ROGERS, L. J.; VALLORTIGARA, G. The origins of cerebral asymmetry: a review of evidence of behavioural and brain lateralization in fishes, reptiles and amphibians. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Fayetteville, v. 22, n. 3, p. 411-426, 1998.

BLANC, G. et al. Insights into How CUB Domains Can Exert Specific Functions while Sharing a Common Fold: conserved and specific features of the cub1 domain contribute to the molecular basis of procollagen c-proteinase enhancer-1 activity. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 23, p. 16924-16933, 2007.

BLISS, T. V. P; LØMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of physiology**, Oxford, v. 232, n. 2, p. 331-356, 1973.

BONETTI, H. 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.

BORK, P.; BECKMANN, G. The CUB domain: a widespread module in developmentally regulated proteins. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 231, n. 2, p. 539-545, 1993.

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

BRAUN, R. P.; WYATT, G. R. Sequence of the hexameric juvenile hormone-binding protein from the hemolymph of *Locusta migratoria*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 49, p. 31756-31762, 1996.

BRAUN, S.; AZOITEI, A.; SPINDLER-BARTH, M.. DNA-binding properties of *Drosophila* ecdysone receptor isoforms and their modification by the heterodimerization partner ultraspiracle. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 72, n. 3, p. 172-191, 2009.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CAMERON, R. C.; DUNCAN, E. J.; DEARDEN, P. K. Biased gene expression in early honeybee larval development. **BMC Genomics**, London, v. 14, n. 1, p. 903, 2013.

CAPELLA, I. C. S.; HARTFELDER, K.. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 44, n. 5-6, p. 385-391, 1998.

CERVONI, M. S. et al. Mitochondrial capacity, oxidative damage and hypoxia gene expression are associated with age-related division of labor in honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 220, n. 21, p. 4035-4046, 2017.

CHEN, X. et al. Integration of lncRNA–miRNA–mRNA reveals novel insights into oviposition regulation in honey bees. **PeerJ**, Corte Madera, v. 5, p. e3881, 2017.

CHEN, X et al. Transcriptome comparison between honey bee queen-and worker-destined larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 42, n. 9, p. 665-673, 2012.

CORONA, M. et al. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 104, n. 17, p. 7128-7133, 2007.

CORONA, M.; ESTRADA, E.; ZURITA, M. Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 202, n. 8, p. 929-938, 1999.

CRUZ-LANDIM, C. Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Editora UNESP, 2009.

CUNHA, A. D. et al. Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 51, n. 10, p. 1135-1147, 2005.

DALLACQUA, R. P. Contribuição ao estudo da diferenciação de castas em *Apis mellifera*: caracterização, expressão e localização de genes de morte celular programada nos ovários larvais. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2010.

DALLACQUA, R. P.; BITONDI, M. M. G. Dimorphic ovary differentiation in honeybee (*Apis mellifera*) larvae involves caste-specific expression of homologs of *Ark* and *Buffy* cell death genes. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e98088, 2014.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, New York, v. 65, n. 1, p. 1-105, 2001.

DANTY, E. et al. Identification and developmental profiles of hexamerins in the antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 28, p. 387-397, 1998.

DASH, P. K.; BLUM, S.; MOORE, A. N. Caspase activity plays an essential role in long-term memory. **Neuroreport**, Oxford, v. 11, n. 12, p. 2811-2816, 2000.

DI VONA, C. et al. Chromatin-wide profiling of DYRK1A reveals a role as a gene-specific RNA polymerase II CTD kinase. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 57, n. 3, p. 506-520, 2015.

DINAN, L. Ecdysteroid structure-activity relationships. In: **Studies in Natural Products Chemistry**, Elsevier, 2003. p. 3-71.

DUBROVSKY, E. B. Hormonal cross talk in insect development. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, New York, v. 16, n. 1, p. 6-11, 2005.

DUVE, Hanne. The presence of a hypoglucemic and hypotrehalocemic hormone in the neurosecretory system of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 36, n. 1, p. 102-110, 1978.

EHMER, B.; GRONENBERG, W. Mushroom body volumes and visual interneurons in ants: comparison between sexes and castes. **Journal of Comparative Neurology**, Philadelphia, v. 469, n. 2, p. 198-213, 2004.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, North Carolina, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FARRIS, S. M.; VAN DYKE, J. W. Evolution and function of the insect mushroom bodies: Contributions from comparative and model systems studies. **Current Opinion in Insect Science**, Morgantown, v. 12, p. 19-25, 2015.

FLATT, T. et al. Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 211, n. 16, p. 2712-2724, 2008.

FOTAKI, V. et al. Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. **Molecular and Cellular Biology**, Barcelona, v. 22, n. 18, p. 6636-6647, 2002.

FRASNELLI, E. Brain and behavioral lateralization in invertebrates. **Frontiers in Psychology**, Pully, v. 4, p. 939, 2013.

FRASNELLI, E. et al. Morpho-functional asymmetry of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 209, n. 2, p. 221-225, 2010.

FRASNELLI, E.; VALLORTIGARA, G.; ROGERS, L. J. Left–right asymmetries of behaviour and nervous system in invertebrates. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Fayetteville, v. 36, n. 4, p. 1273-1291, 2012.

GANESHINA, O.; SCHÄFER, S.; MALUN, D. Proliferation and programmed cell death of neuronal precursors in the mushroom bodies of the honeybee. **Journal of Comparative Neurology**, London, v. 417, n. 3, p. 349-365, 2000.

GAO, F. B. et al. Genes regulating dendritic outgrowth, branching, and routing in *Drosophila*. **Genes & development**, Cold Spring Harbor, v. 13, n. 19, p. 2549-2561, 1999.

GAROFALO, R. S. Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, New York, v. 13, n. 4, p. 156-162, 2002.

GOLDSTEIN, A. Y. N.; JAN, Y. N.; LUO, L.. Function and regulation of Tumbleweed (RacGAP50C) in neuroblast proliferation and neuronal morphogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 10, p. 3834-3839, 2005.

GORCZYCA, M.; AUGART, C.; BUDNIK, V. Insulin-like receptor and insulin-like peptide are localized at neuromuscular junctions in *Drosophila*. **Journal of Neuroscience**, United States, v. 13, n. 9, p. 3692-3704, 1993.

GRAY, M. W. Origin and evolution of mitochondrial DNA. **Annual review of cell biology**, Halifax, v. 5, n. 1, p. 25-50, 1989.

GROH, C.; AHRENS, D.; RÖSSLER, W. Environment-and age-dependent plasticity of synaptic complexes in the mushroom bodies of honeybee queens. **Brain, Behavior and Evolution**, Basel, v. 68, n. 1, p. 1-14, 2006.

GROH, C.; RÖSSLER, W. Caste-specific postembryonic development of primary and secondary olfactory centers in the female honeybee brain. **Arthropod Structure & Development**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 459-468, 2008.

GRÖNKE, S. et al. Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides. **PLoS genetics**, San Francisco, CA. v. 6, n. 2, p. e1000857, 2010.

GUO, Y. et al. Lateralization of gene expression in the honeybee brain during olfactory learning. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 34727, 2016.

HAKEM, R. et al. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. **Cell**, Cambridge, v. 94, n. 3, p. 339-352, 1998.

HAKIM, R. S. et al. Growth and mitogenic effects of arylphorin in vivo and in vitro. **Archives of Insect Biochemistry and Pysiology**, New York, v. 64, n. 2, p. 63-73, 2007.

HARA, Y. et al. Ecdysone-dependent and ecdysone-independent programmed cell death in the developing optic lobe of *Drosophila*. **Developmental Biology**, San Diego, v. 374, n. 1, p. 127-141, 2013.

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

HAUNERLAND, N. H. Insect storage proteins: gene families and receptors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Burnaby, v. 26, n. 8-9, p. 755-765, 1996.

HE, Min-Di et al. Disturbance of aerobic metabolism accompanies neurobehavioral changes induced by nickel in mice. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 38, p. 9-16, 2013.

HERNÁNDEZ, L. G. et al. Worker honeybee brain proteome. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 11, n. 3, p. 1485-1493, 2012.

- HILL, R. J. et al. Ecdysone receptors: from the Ashburner model to structural biology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 58, p. 251-271, 2013.
- HOBERT, O. Development of left/right asymmetry in the *Caenorhabditis elegans* nervous system: from zygote to postmitotic neuron. **Genesis**, New York, v. 52, n. 6, p. 528-543, 2014.
- HOLLVILLE, E.; DESHMUKH, M. Physiological functions of non-apoptotic caspase activity in the nervous system. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. London, Academic Press, 2017.
- HOWSE, P. E. Brain structure and behavior in insects. **Annual Review of Entomology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 359-379, 1975.
- HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 37, n. 1, p. 1-13, 2009 (a).
- HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols**, London, v. 4, n. 1, p. 44, 2009 (b).
- HUMANN, F. C.; HARTFELDER, K.. Representational Difference Analysis (RDA) reveals differential expression of conserved as well as novel genes during caste-specific development of the honey bee (*Apis mellifera L.*) ovary. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, n. 8, p. 602-612, 2011.
- HUMANN, F. C.; TIBERIO, G. J.; HARTFELDER, K. Sequence and expression characteristics of long noncoding RNAs in honey bee caste development—potential novel regulators for transgressive ovary size. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. e78915, 2013.
- HUNTER, T. A thousand and one protein kinases. **Cell**, San Diego, v. 50, n. 6, p. 823-829, 1987.
- 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**, Basel, v. 50, p. 433-441, 2006.

HYMAN, B. T.; YUAN, J. Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 13, n. 6, p. 395, 2012.

IHLE, K. E.; BAKER, N. A.; AMDAM, G. V. Insulin-like peptide response to nutritional input in honey bee workers. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 69, p. 49-55, 2014.

JAYAKODI, M. et al. Genome-wide characterization of long intergenic non-coding RNAs (lincRNAs) provides new insight into viral diseases in honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera*. **BMC Genomics**, London, v. 16, n. 1, p. 680, 2015.

JONCKHEERE, A. I.; SMEITINK, J. A. M; RODENBURG, R. J. T. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Lancaster, v. 35, n. 2, p. 211-225, 2012.

JULIAN, G. E.; GRONENBERG, W. Reduction of brain volume correlates with behavioral changes in queen ants. **Brain, Behavior and Evolution**, Basel, v. 60, n. 3, p. 152-164, 2002.

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, London, v. 473, n. 7348, p. 478, 2011.

KIM, S. J.; PARK, J. G.; LEE, C. C. Transcript titers of ecdysteroid receptor components vary between tissues and stages during *Drosophila* development. **Molecules and cells**, Seoul, v. 9, n. 1, p. 61-66, 1999.

KINSTRIE, R. et al. dDYRK2 and Minibrain interact with the chromatin remodelling factors SNR1 and TRX. **Biochemical Journal**, London, v. 398, n. 1, p. 45-54, 2006.

KLINGENBERG, M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Amsterdam, v. 1778, n. 10, p. 1978-2021, 2008.

KUCHARSKI, R. et al. Molecular cloning and expression analysis of a cDNA encoding a glutamate transporter in the honeybee brain. **Gene**, Amsterdam, v. 242, n. 1, p. 399-405, 2000.

KÜHLBRANDT, W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. **BMC Biology**, London, v. 13, n. 1, p. 89, 2015.

KUIDA, K. et al. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. **Nature**, London, v. 384, n. 6607, p. 368, 1996.

KUMAR, A. et al. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological Reports**, Kraków, v. 67, n. 2, p. 195-203, 2015.

LAGO, D. C. et al. Differential gene expression underlying ovarian phenotype determination in honey bee, *Apis mellifera* L., caste development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. New York, v. 79, p. 1-12, 2016.

LAGUNA, A. et al. The protein kinase DYRK1A regulates caspase-9-mediated apoptosis during retina development. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 15, n. 6, p. 841-853, 2008.

LATTORFF, H. M. G.; MORITZ, R. F. A. Genetic underpinnings of division of labor in the honeybee (*Apis mellifera*). **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 29, n. 11, p. 641-648, 2013.

LEE, J.; SEROOGY, K. B.; MATTSON, M. P. Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 80, n. 3, p. 539-547, 2002.

LETZKUS, P. et al. Lateralization of olfaction in the honeybee *Apis mellifera*. **Current Biology**, London, v. 16, n. 14, p. 1471-1476, 2006.

LI, K.; JIA, Q. Q.; LI, S. Juvenile hormone signaling—a mini review. **Insect Science**, Victoria, p. 1-27, 2018.

LI, Y. et al. Gene and expression analysis of the hexamerin family proteins from the grasshopper, *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acridoidea). **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, New York. v. 31, n. 6, p. 1139-1147, 2017.

LI, Z. et al. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. **Cell**, Cambridge, v. 141, n. 5, p. 859-871, 2010.

LIANG, W. S. et al. Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 105, n. 11, p. 4441-4446, 2008.

LIU, J. et al. Epigenetic Alterations of MicroRNAs and DNA Methylation Contribute to Liver Metastasis of Colorectal Cancer. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 64, n. 6, p. 1523-1534, 2019.

LIU, J.; SPEDER, P.; BRAND, A. H. Control of brain development and homeostasis by local and systemic insulin signalling. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, Oxford, v. 16, n. S1, p. 16-20, 2014.

LIU, S. et al. Antagonistic actions of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone within the ring gland determine developmental transitions in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 115, n. 1, p. 139-144, 2018.

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

LU, C. et al. Evidence that caspase-1 is a negative regulator of AMPA receptor-mediated long-term potentiation at hippocampal synapses. **Journal of Neurochemistry**, New York, v. 97, n. 4, p. 1104-1110, 2006.

MAGUIRE, E. A.; WOOLLETT, K.; SPIERS, H. J. London taxi drivers and bus drivers: a structural MRI and neuropsychological analysis. **Hippocampus**, New York, v. 16, n. 12, p. 1091-1101, 2006.

MALESZKA, R.; HELLIWELL, P.; KUCHARSKI, R. Pharmacological interference with glutamate re-uptake impairs long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 49-53, 2000.

MALUN, D.; MOSELEIT, A. D.; GRUNEWALD, B. 20-Hydroxyecdysone inhibits the mitotic activity of neural precursor in the developing mushroom bodies of the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Neurobiology**, v. 54, n. 1, p. 1-14, 2003.

MANNING, G. et al. The protein kinase complement of the human genome. **Science**, New York, v. 298, n. 5600, p. 1912-1934, 2002.

MARKS, D. R. et al. Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors. **Journal of Neuroscience**, Washington, v. 29, n. 20, p. 6734-6751, 2009.

MARQUEZ, A. G. et al. Insulin-like peptides in the mosquito *Anopheles stephensi*: identification and expression in response to diet and infection with *Plasmodium falciparum*. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 173, n. 2, p. 303-312, 2011.

MARTINS, J. R. et al. A honey bee hexamerin, HEX 70a, is likely to play an intranuclear role in developing and mature ovarioles and testioles. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 12, p. e29006, 2011.

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 Molecular Biology**, London, v. 11, n. 1, p. 23, 2010.

MELLO, T. R. P. et al. Developmental regulation of ecdysone receptor (EcR) and EcR-controlled gene expression during pharate-adult development of honeybees (*Apis mellifera*). **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 5, p. 445, 2014.

MICHENER, C. D. The social behavior of the bees. **Belknap Press of Harvard University Press**, Cambridge, 1974.

MIELKE, J. G.; TAGHIBIGLOU, C.; WANG, Y. T. Endogenous insulin signaling protects cultured neurons from oxygen–glucose deprivation-induced cell death. **Neuroscience**, Oxford, v. 143, n. 1, p. 165-173, 2006.

MILLER JR, J. H. et al. Electric field driven torque in ATP synthase. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e74978, 2013.

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 et al. Nutritionally driven differential gene expression leads to heterochronic brain development in honeybee castes. **PLoS one**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. e64815, 2013.

MÜLLER, V.; GRÜBER, G. ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, Basel, v. 60, n. 3, p. 474-494, 2003.

MUTTI, N. S. et al. IRS and TOR nutrient-signaling pathways act via juvenile hormone to influence honey bee caste fate. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 214, n. 23, p. 3977-3984, 2011.

MYSORE, K. et al. Caste and sex specific olfactory glomerular organization and brain architecture in two sympatric ant species *Camponotus sericeus* and *Camponotus compressus* (Fabricius, 1798). **Arthropod Structure & Development**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 485-497, 2009.

NÄSSEL, D. R.; BROECK, J. V. Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Switzerland, v. 73, n. 2, p. 271-290, 2016.

NÄSSEL, D. R.; LIU, Y.; LUO, J.. Insulin/IGF signaling and its regulation in *Drosophila*. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 221, p. 255-266, 2015.

NG, D. et al. Neto1 is a novel CUB-domain NMDA receptor-interacting protein required for synaptic plasticity and learning. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e1000041, 2009.

NG, Shi-Yan et al. The long noncoding RNA RMST interacts with SOX2 to regulate neurogenesis. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 51, n. 3, p. 349-359, 2013.

NG, Shi-Yan; JOHNSON, R.; STANTON, L. W. Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors. **The EMBO Journal**, London, v. 31, n. 3, p. 522-533, 2012.

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

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.

O'CONNOR, K. J.; BAXTER, D. The demonstration of insulin-like material in the honey bee, *Apis mellifera*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Great Britain v. 81, n. 3, p. 755-760, 1985.

O'DONNELL, S.; DONLAN, N. A.; JONES, T. A. Mushroom body structural change is associated with division of labor in eusocial wasp workers (*Polybia aequatorialis*, Hymenoptera: Vespidae). **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 356, n. 3, p. 159-162, 2004.

OLIVEIRA, M. T. Transcrição diferencial e morfogênese do cérebro adulto de castas de abelhas *Apis mellifera*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Alfenas, 2014.

PAGE JR, R. E.; PENG, C. Y. S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Experimental Gerontology**, Oxford, v. 36, n. 4-6, p. 695-711, 2001.

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.

PATEL, A. et al. The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. **PloS One**, San Francisco, v. 2, n. 6, p. e509, 2007.

PAUMARD, P. et al. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. **The EMBO journal**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 221-230, 2002.

PFAFF, E.; KLINGENBERG, M. Adenine nucleotide translocation of mitochondria. **The FEBS Journal**, Berlin, v. 6, n. 1, p. 66-79, 1968.

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

PINTO, L. Z. et al. Ecdysteroids titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. **Journal of insect Physiology**, v. 48, p.783-790, 2002.

PLACAIS, P. Y. et al. Upregulated energy metabolism in the *Drosophila* mushroom body is the trigger for long-term memory. **Nature communications**, London, v. 8, p. 15510, 2017.

POOPATHI, S. et al. Hexamerin a novel protein associated with *Bacillus sphaericus* resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 172, n. 5, p. 2299-2307, 2014.

RAABE, T. et al. Identification of mushroom body miniature, a zinc-finger protein implicated in brain development of *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 39, p. 14276-14281, 2004.

RACHINSKY, A. et al. Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 79, n. 1, p. 31-38, 1990.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

REIMAND et al. g: Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 44, n. W1, p. W83-W89, 2016.

REMBOLD, H. Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. **Insect Biochemistry**, Great Britain, v. 17, n. 7, p. 1003-1006, 1987.

RIEHLE, M. A. et al. Molecular characterization of insulin-like peptides in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: expression, cellular localization, and phylogeny. **Peptides**, New York, v. 27, n. 11, p. 2547-2560, 2006.

ROAT, T. C.; LANDIM, C.C. Mitosis and cell death in the optic lobes of workers, queens and drones of the honey bee (*Apis mellifera*) during metamorphosis. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 35, n. 3, p. 415-425, 2010b.

ROAT, T. C.; CRUZ-LANDIM, 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**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 1171-1178, 2008.

ROAT, T. C.; DA CRUZ LANDIM, C. Differences in mushroom bodies morphogenesis in workers, queens and drones of *Apis mellifera*: Neuroblasts proliferation and death. **Micron**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 382-389, 2010a.

ROGERS, L. J.; VALLORTIGARA, G. From antenna to antenna: lateral shift of olfactory memory recall by honeybees. **PLoS One**, San Francisco v. 3, n. 6, p. e2340, 2008.

RONAI, I.; OLDROYD, B. P.; VERGOZ, V. Queen pheromone regulates programmed cell death in the honey bee worker ovary. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 646-652, 2016.

SANTOS, D. E.; ALBERICI, L. C.; HARTFELDER, K.. Mitochondrial structure and dynamics as critical factors in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 73, p. 1-11, 2016.

SAVCHENKO, R. G.; ODINOKOV, V. N. Hydrogenation of ecdysteroids. **Steroids**, San Francisco, v. 77, n. 14, p. 1523-1529, 2012.

SCHUBIGER, M. et al. Isoform specific control of gene activity in vivo by the Drosophila ecdysone receptor. **Mechanisms of Development**, Shannon, v. 120, n. 8, p. 909-918, 2003.

SCHWEDES, C.; TULSIANI, S.; CARNEY, G. E. Ecdysone receptor expression and activity in adult Drosophila melanogaster. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 57, n. 7, p. 899-907, 2011.

SEELEY, T. D. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, Berlin, v. 11, n. 4, p. 287-293, 1982.

SHALINI, S. et al. Old, new and emerging functions of caspases. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 22, n. 4, p. 526, 2015.

SHEARWIN-WHYATT, L. M.; KUMAR, Sharad. Caspases in developmental cell death. **IUBMB life**, London, v. 48, n. 2, p. 143-150, 1999.

SNIGDHA, S. et al. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. **Neuroscience Bulletin**, Beijing, China, v. 28, n. 1, p. 14-24, 2012.

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

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

SONG, W. et al. Isolation of Human and Murine Homologues of the *Drosophila Minibrain* Gene: Human Homologue Maps to 21q22. 2 in the Down Syndrome “Critical Region”. **Genomics**, San Diego, v. 38, n. 3, p. 331-339, 1996.

SOPPA, U.; BECKER, W.. DYRK protein kinases. **Current Biology**, London, v. 25, n. 12, p. R488-R489, 2015.

SPINDLER, Klaus-Dieter et al. Ecdysteroid hormone action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 66, n. 24, p. 3837-3850, 2009.

STEPANICHEV, M. Y. et al. Central administration of a caspase inhibitor impairs shuttle-box performance in rats. **Neuroscience**, Oxford, v. 136, n. 2, p. 579-591, 2005.

STOCK, D.; LESLIE, A. G. W; WALKER, J. E. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. **Science**, New York, v. 286, n. 5445, p. 1700-1705, 1999.

STRAßBURGER, K. et al. Insulin/IGF signaling drives cell proliferation in part via Yorkie/YAP. **Developmental Biology**, New York, v. 367, n. 2, p. 187-196, 2012.

STRAUSFELD, N. J. et al. Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. **Learning & Memory**, New York, v. 5, n. 1, p. 11-37, 1998.

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

TEJEDOR, F. et al. *minibrain*: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. **Neuron**, Cambridge, v. 14, n. 2, p. 287-301, 1995.

TEJEDOR, J.; HÄMMERLE, B. MNB/DYRK1A as a multiple regulator of neuronal development. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 278, n. 2, p. 223-235, 2011.

TELFER, W. H.; KUNKEL, J. G. The function and evolution of insect storage hexamers. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 205-228, 1991.

TIBÉRIO, G. J. Análise funcional do gene *Incov-1* (Group11.31, o primeiro RNA não-codificador longo em *Apis mellifera*, no desenvolvimento casta-específico do ovário. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2013.

TRUMAN, J. W. et al. Ecdysone receptor expression in the CNS correlates with stage-specific responses to ecdysteroids during *Drosophila* and *Manduca* development. **Development**, Cambridge, v. 120, n. 1, p. 219-234, 1994.

TRUMAN, J. W. Steroid receptors and nervous system metamorphosis in insects. **Developmental Neuroscience**, Basel, v. 18, n. 1-2, p. 87-101, 1996.

VALLORTIGARA, G.; CHIANDETTI, C.; SOVRANO, V. A. Brain asymmetry (animal). **Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science**, Cambridge, v. 2, n. 2, p. 146-157, 2011.

VAN DE PUTTE, T. et al. Mice with a homozygous gene trap vector insertion in *mgcRacGAP* die during pre-implantation development. **Mechanisms of Development**, Shannon, v. 102, n. 1-2, p. 33-44, 2001.

VLEURINCK, C. et al. Linking genes and brain development of honeybee workers: a whole-transcriptome approach. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 8, p. e0157980, 2016.

VON BALLMOOS, C.; WIEDENMANN, A.; DIMROTH, P. Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 78, p. 649-672, 2009.

WANG, E. et al. Amylin treatment reduces neuroinflammation and ameliorates abnormal patterns of gene expression in the cerebral cortex of an Alzheimer's disease mouse model. **Journal of Alzheimer's Disease**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 47-61, 2017.

WANG, Y. et al. Insulin-like peptides (AmILP1 and AmILP2) differentially affect female caste development in the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Journal of Experimental Biology**, London, v. 216, n. 23, p. 4347-4357, 2013.

WATANABE, T.; TAKEUCHI, H.; KUBO, T. Structural diversity and evolution of the N-terminal isoform-specific region of ecdysone receptor-A and-B1 isoforms in insects. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 40, 2010.

WEGENER, J. et al. New insights into the roles of juvenile hormone and ecdysteroids in honey bee reproduction. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 59, n. 7, p. 655-661, 2013.

WHEATON, W. W. et al. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. **Elife**, Cambridge, v. 3, 2014.

WHEELER, D. E.; BUCK, N.; EVANS, J. D. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. **Insect Molecular Biology**, London, v. 15, n. 5, p. 597-602, 2006.

WILLIAMS, D. W. et al. Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. **Nature Neuroscience**, New York, v. 9, n. 10, p. 1234, 2006.

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

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

WINSTON, M. L. The biology of honey bee. **Harvard University Press**, 1987.

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

WU, Y. et al. Programmed cell death in the honey bee (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae) worker brain induced by imidacloprid. **Journal of Economic Entomology**, England, v. 108, n. 4, p. 1486-1494, 2015.

YOON, M. The role of mammalian target of rapamycin (mTOR) in insulin signaling. **Nutrients**, Korea, v. 9, n. 11, p. 1176, 2017.

YOSHIDA, M.; MUNHEYUKI, E.; HISABORI, T. ATP synthase—a marvellous rotary engine of the cell. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 2, n. 9, p. 669, 2001.

YOUNG, R. S. et al. Identification and properties of 1,119 candidate lincRNA loci in the *Drosophila melanogaster* genome. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 427-442, 2012.

ZAVORTINK, M. et al. Tum RacGAP50C provides a critical link between anaphase microtubules and the assembly of the contractile ring in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 5381-5392, 2005.

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**, Cambridge, v. 134, n. 3, p. 601-610, 2007.

ZHU, K. et al. Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 13, n. 8, p. e1006946, 2017.

ANEXOS

Quadro 1: Lista dos 229 DGEs de Oliveira (2014) que apresentam ortólogos em *D. melanogaster*.

GB	Ortólogo	GB	Ortólogo	GB	Ortólogo
GB48005	5-HT1A	GB54181	GBETA13F	GB49313	PORIN
GB48005	5-HT1B	GB44365	GCE	GB49313	PORIN2
GB41233	ADE3	GB40973	GLURIA	GB40946	PP2A-29B
GB47886	ADH	GB40973	GLURIB	GB51600	PR
GB46367	ADHR	GB40980	GLUT1	GB46775	PSR
GB52107	ALPHATUB84B	GB42835	GLYP	GB55364	PTP99A
GB52107	ALPHATUB84D	GB41867	GP93	GB51045	PUM
GB48684	AMON	GB49545	GSTS1	GB55408	PVF1
GB41301	ANXB9	GB52953	GYCBETA100B	GB52975	PX
GB47998	AP-2MU	GB49117	HSC70-3	GB51725	RABEX-5
GB48454	APPL	GB40866	HSC70-4	GB47768	RACGAP84C
GB46481	ARF79F	GB42297	HSC70-5	GB46209	RDX
GB54446	ARGK	GB54372	HSP60A	GB55596	RETN
GB41063	ARI-1	GB54372	HSP60B	GB54272	RIM
GB42054	ATPALPHA	GB54372	HSP60C	GB45017	RLUA-1
GB52736	ATPSYNBETAL	GB54372	HSP60D	GB45017	RLUA-2
GB40457	ATPSYNC	GB51125	INOS	GB47313	RM62
GB50601	ATPSYNE	GB47095	ITP	GB46503	RPB10
GB49306	ATPSYNGAMMA	GB40339	IYD	GB40653	RPL24
GB54538	AXO	GB49588	JUPITER	GB51359	RPL27A
GB45051	AXUD1	GB44515	KAT60	GB40576	RPLP0
GB46727	BALL	GB52109	KLAR	GB41207	RPN11
GB47925	BETACOP	GB47112	KOI	GB54573	RPN3
GB51700	BETAGGT-II	GB51042	L(1)G0255	GB52675	RPN5
GB45181	BI-1	GB41294	LARP7	GB54747	RPN6
GB41028	BLW	GB54843	LEURS	GB49337	RPN9
GB49806	BX	GB53406	LIN-52	GB47904	RPT1
GB40089	CA-BETA	GB51698	LSP1ALPHA	GB51586	RPT4

GB40461	CALR	GB51698	LSP1BETA	GB49047	RPT5
GB43786	CALS	GB51698	LSP1GAMMA	GB53014	SANTA-MARIA
GB45189	CALYPSO	GB51698	LSP2	GB47839	SCF
GB44903	CANB2	GB50257	M	GB49651	SEC6
GB53859	CENB1A	GB48552	MANF	GB54127	SEI
GB41740	CHB	GB40750	ME31B	GB46091	SEMA2A
GB50357	CHC	GB44365	MET	GB46091	SEMA2B
GB44994	CHCHD2	GB49702	MFRN	GB42422	SESB
GB40389	CHIC	GB54940	MICS1	GB50370	set/01
GB43161	CIB	GB49936	MICU1	GB47803	SGLL
GB41198	CISD2	GB44907	MLF	GB46982	SHAB
GB52656	CLECT27	GB53062	MNB	GB53719	SHEP
GB54331	CP1	GB44079	MNN1	GB53305	SIF
GB50453	CPR100A	GB54687	MPCP1	GB47138	SLO
GB50064	CPX	GB54687	MPCP2	GB45433	SMB
GB53190	CWC25	GB46986	MRPL46	GB48423	SMF
GB49026	CYCT	GB51134	MSN	GB50850	SNR1
GB47617	CYP1	GB44679	MTA1-LIKE	GB43302	SPARC
GB48784	CYT-C-P	GB50960	MTF-1	GB43180	SPP
GB50411	DAD	GB45128	MTPALPHA	GB42317	SRL
GB55961	DAD1	GB45368	MTS	GB54827	SYT1
GB46720	DHIT	GB53915	MTTFB1	GB43089	SYX1A
GB49042	DOR	GB41143	ND-39	GB48103	SYX7
GB44541	DPPIII	GB51330	ND-AGGG	GB40779	TALDO
GB55465	DREP1	GB47886	ND-B14.5A	GB40563	THRRS
GB55465	DREP3	GB47886	ND-B14.5AL	GB54998	TOU
GB48589	DYRK2	GB55625	NDFIP	GB46338	TSP68C
GB53002	EAAT2	GB41659	NEP3	GB51578	TTM2
GB48687	EATER	GB45015	NESD	GB51578	TTM3
GB42786	EB1	GB42942	NHE2	GB51578	TTM50
GB42862	EEF1DELTA	GB40578	NHE3	GB47768	TUM

GB47886	EH	GB42918	NIPSNAP	GB53012	TUTL
GB48304	EIF2BETA	GB54987	NLG2	GB41441	UBL3
GB49943	EIF3D1	GB49559	NOMPB	GB41715	UQCR-C2
GB49943	EIF3D2	GB41545	NPC2G	GB52468	UQCR-Q
GB51710	EIF4A	GB41545	NPC2H	GB45131	USH
GB50048	EIP93F	GB40868	NUCB1	GB46344	USP8
GB54042	ELG1	GB50024	ORC1	GB40978	VAP33
GB41629	EPH	GB47114	OSTDELTA	GB53360	VHA36-1
GB47462	ERP60	GB54590	PABP	GB53360	VHA36-3
GB51904	EXD	GB55970	PCNA2	GB49497	VHA55
GB40883	EXP	GB50902	PDH	GB47441	VHAPPA1-1
GB49757	FABP	GB47788	PDM3	GB45415	VHASFD
GB46367	FBP2	GB53014	PES	GB49953	VPS45
GB45562	FK506-BP2	GB40302	PGK	GB45951	YELLOW-C
GB40746	FKBP59	GB55493	PIG-T	GB54355	YPS
GB49223	FUTSCH	GB43836	PINK1	GB52211	ZN72D
GB50902	GAPDH1	GB51489	POLYPH	GB55413	ZNT49B
GB50902	GAPDH2				

Quadro 2: Funções enriquecidas nos termos de componentes celulares no grupo de genes revelados pelas análises de *microarray* realizadas por Oliveira (2014).

Identificador	Descrição	Nº de genes	p-valor
GO:0005811	lipid particle	27	3.87E-11
GO:0005875	microtubule associated complex	24	2.80E-08
GO:0005838	proteasome regulatory particle	8	1.04E-07
GO:0048471	perinuclear region of cytoplasm	12	1.36E-07
GO:0005743	mitochondrial inner membrane	12	1.49E-05
GO:0005616	larval serum protein complex	4	3.08E-05
GO:0008541	proteasome regulatory particle, lid subcomplex	5	6.71E-05
GO:0031595	nuclear proteasome complex	4	8.46E-04
GO:0008021	synaptic vesicle	7	0.001815485

GO:0008021	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)	3	0.002313756
GO:0045261	plasma membrane proton-transporting V-type ATPase complex	4	0.004325743
GO:0005737	cytoplasm	46	0.005254601
GO:0005881	cytoplasmic microtubule	3	0.005633651
GO:0005739	mitochondrion	19	0.006956316
GO:0000275	mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)	3	0.007783917
GO:0000502	proteasome complex	5	0.010331126
GO:0000221	vacuolar proton-transporting V-type ATPase, V1 domain	3	0.012997798
GO:0031597	cytosolic proteasome complex	3	0.012997798
GO:0012505	endomembrane system	10	0.022230056
GO:0008076	voltage-gated potassium channel complex	3	0.026727096
GO:0008540	proteasome regulatory particle, base subcomplex	3	0.03077831
GO:0045169	fusome	4	0.03957311
GO:0030054	cell junction	5	0.044497043
GO:0043195	terminal bouton	4	0.045037483
GO:0071013	catalytic step 2 spliceosome	7	0.045644735

Nota: Foram considerados significativos enriquecimentos com $p < 0,05$ e número de genes maior que 2.

Quadro 3: Funções enriquecidas nos termos de funções biológicas no grupo de genes revelados pelas análises de *microarray* realizadas por Oliveira (2014).

Identificador	Descrição	Nº de genes	p-valor
GO:0007268	chemical synaptic transmission	11	2.75E-07
GO:0015991	ATP hydrolysis coupled proton transport	9	7.23E-07
GO:0007269	neurotransmitter secretion	11	4.62E-06
GO:0015992	proton transport	7	5.71E-06
GO:0043161	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	9	1.93E-04
GO:0015986	ATP synthesis coupled proton transport	5	8.48E-04

GO:0010906	regulation of glucose metabolic process	11	0.001461391
GO:0006909	phagocytosis	12	0.001519862
GO:0016192	vesicle-mediated transport	9	0.001537342
GO:0007006	mitochondrial membrane organization	3	0.00317496
GO:0006457	protein folding	8	0.003515302
GO:0008582	regulation of synaptic growth at neuromuscular junction	5	0.004833298
GO:0006458	de novo' protein folding	3	0.006509079
GO:0043069	negative regulation of programmed cell death	3	0.006509079
GO:0016079	synaptic vesicle exocytosis	4	0.00905369
GO:0006470	protein dephosphorylation	7	0.009288603
GO:0007005	mitochondrion organization	5	0.009548366
GO:0045899	positive regulation of RNA polymerase II transcriptional preinitiation complex assembly	3	0.010894208
GO:0051225	spindle assembly	4	0.011325457
GO:0007017	microtubule-based process	5	0.011887083
GO:0006813	potassium ion transport	4	0.012573318
GO:0042026	protein refolding	3	0.013455933
GO:0045807	positive regulation of endocytosis	3	0.013455933
GO:1901215	negative regulation of neuron death	3	0.016250994
GO:0007015	actin filament organization	6	0.018358875
GO:0007097	nuclear migration	3	0.022504389
GO:0045944	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	10	0.023533947
GO:0006812	cation transport	4	0.025314033
GO:0007525	somatic muscle development	4	0.029272466
GO:0061077	chaperone-mediated protein folding	3	0.029583449
GO:0007274	neuromuscular synaptic transmission	5	0.031914683
GO:0006122	mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	3	0.033411506
GO:0006839	mitochondrial transport	3	0.033411506
GO:0008340	determination of adult lifespan	8	0.035607844
GO:0051124	synaptic growth at neuromuscular junction	4	0.035786297

GO:0044070	regulation of anion transport	2	0.036047669
GO:0007208	phospholipase C-activating serotonin receptor signaling pathway	2	0.036047669
GO:0016486	peptide hormone processing	2	0.036047669
GO:0007198	adenylate cyclase-inhibiting serotonin receptor signaling pathway	2	0.036047669
GO:0055085	transmembrane transport	11	0.039255324
GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process	5	0.040153776
GO:0008360	regulation of cell shape	6	0.042496341
GO:0008285	negative regulation of cell proliferation	4	0.042981549
GO:0006886	intracellular protein transport	6	0.043969015
GO:0030433	ER-associated ubiquitin-dependent protein catabolic process	3	0.045954124
GO:0051298	centrosome duplication	6	0.047005467

Nota: Foram considerados significativos enriquecimentos com $p < 0,05$ e número de genes maior que 2.

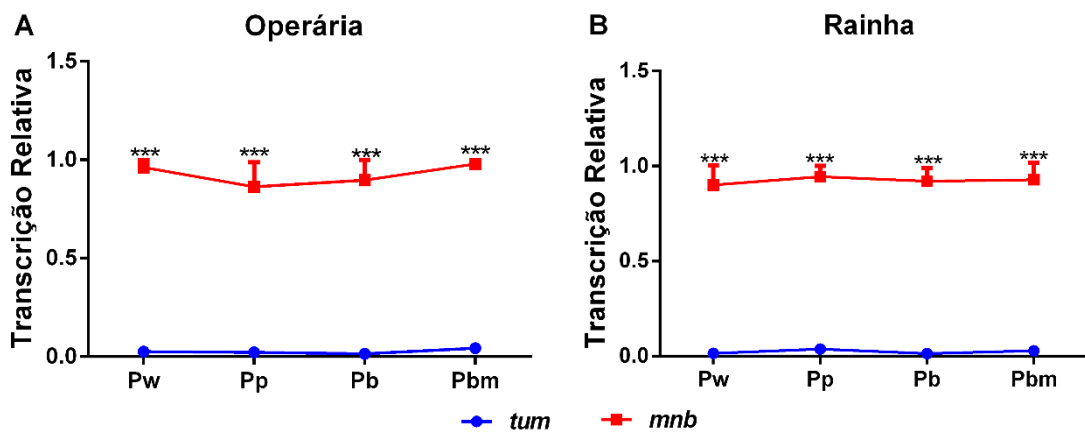
Quadro 4: Funções enriquecidas nos termos de funções moleculares no grupo de genes revelados pelas análises de *microarray* realizadas por Oliveira (2014).

Identificador	Descrição	Nº de genes	p-valor
GO:0045735	nutrient reservoir activity	5	8.54E-07
GO:0046961	proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism	8	1.74E-05
GO:0004022	alcohol dehydrogenase (NAD) activity	4	2.82E-04
GO:0046933	proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	5	4.24E-04
GO:0005515	protein binding	27	7.40E-04
GO:0000149	SNARE binding	5	0.003536244
GO:0005524	ATP binding	27	0.005862351
GO:0036402	proteasome-activating ATPase activity	3	0.013782324
GO:0004721	phosphoprotein phosphatase activity	5	0.017892354
GO:0051082	unfolded protein binding	5	0.023218273
GO:0008134	transcription factor binding	6	0.033317955
GO:0017025	TBP-class protein binding	3	0.037081819
GO:0005198	structural molecule activity	4	0.037235497

GO:0003785	actin monomer binding	2	0.040724979
GO:000158	Gi/o-coupled serotonin receptor activity	2	0.040724979
GO:0004880	juvenile hormone receptor activity	2	0.040724979

Nota: Foram considerados significativos enriquecimentos com $p < 0,05$ e número de genes maior que 2.

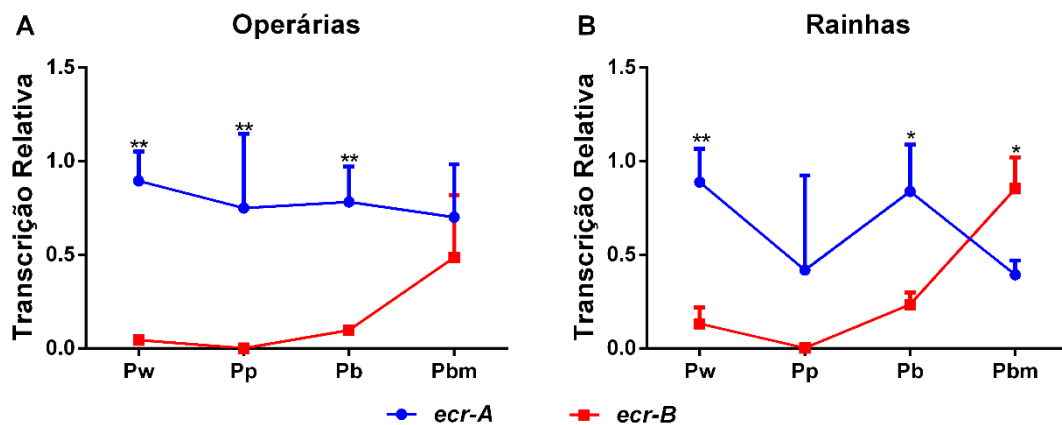
Figura 1 - Comparação dos níveis de transcrição entre os genes neurogênicos *tum* e *mnb* em cérebros de rainhas e operárias de *A. mellifera* durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.



Fonte: Do autor.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com rainhas.

Figura 2. Comparação dos níveis de transcrição entre os genes neurogênicos *EcR-A* e *EcR-B* em cérebros de rainhas e operárias de *A. mellifera* durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.



Fonte: Do autor.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com rainhas.

APÊNDICE

The ontogenetic saga of a social brain

Angel Roberto Barchuk, Gabriele David dos Santos, Ricardo Dias Caneschi, Delcio Eustaquio de Paula Junior & Livia Maria Rosatto Moda

Apidologie

Official journal of the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Deutschen Imkerbundes e.V. (D.I.B.)

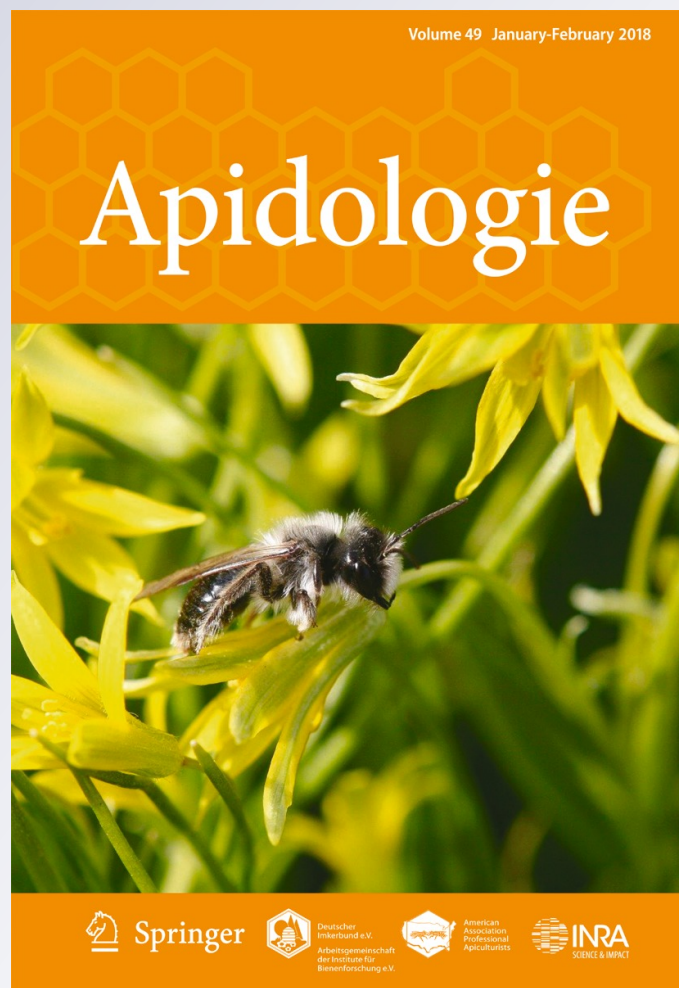
ISSN 0044-8435

Volume 49

Number 1

Apidologie (2018) 49:32-48

DOI 10.1007/s13592-017-0540-4



Your article is published under the Creative Commons Attribution license which allows users to read, copy, distribute and make derivative works, as long as the author of the original work is cited. You may self-archive this article on your own website, an institutional repository or funder's repository and make it publicly available immediately.

The ontogenetic saga of a social brain

Angel Roberto BARCHUK, Gabriele David dos SANTOS, Ricardo DIAS CANESCHI,
Delcio Eustaquio de PAULA JUNIOR, Livia Maria Rosatto MODA

Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Campus Sede, Rua Gabriel Monteiro Silva 700, Alfenas, Minas Gerais CEP 37130-000, Brazil

Received 4 April 2017 – Revised 20 July 2017 – Accepted 16 August 2017

Abstract – Queen and worker honeybees differ in a number of life-history traits, including the size of certain brain regions, such as the mushroom bodies (MBs), which are larger in workers. However, during the larval period, the differential feeding offered to queens promotes faster brain development. As a result, members of this caste have larger brains than workers. This developmental process is accompanied by the higher expression of several neurogenic genes. Nonetheless, a caste-specific shift in relative brain growth occurs during the next developmental stage. The suggested molecular underpinnings of this phenomenon are variations in hormonal environments, which may mediate higher cell death rates in the queen's brain than in the workers'. The brain development of this highly eusocial bee is thus a paradoxical case that may represent an evolutionary by-product of the reproductive division of labour in species with female size diphenism.

Apis mellifera / honey bee / development / caste / phenotypic plasticity

1. INTRODUCTION

Adult honeybee queens are easily distinguished from workers based on their external morphology. The queens are rotund creatures that move slowly, whereas workers are comparatively smaller and exhibit constant, agile movements. This first impression might suggest that queens have large organs, of which the ovaries are fair representatives. In fact, queens do develop a large body with a large reproductive system, which is the anatomical representation of their primary task within a colony, i.e. reproduction. Workers, on the other hand, develop a specific morphological character set that allows them to perform the innumerable tasks associated with maintaining the colony, such as foraging, nursing the brood, nest cleaning, nestmate recognition, and guarding.

The morphogenetic fields governing caste-specific systems and organ development have been the focus of research in recent decades. In developmental biology, morphogenetic fields are discrete regions of developing organisms that function as the major units of development (Levin 2012; Gilbert and Barresi 2016). Since the general fate of their cells is genetically determined, changes in these fields bring about evolutionary changes. One morphogenetic field that has attracted attention since the early work of Erber (1975) is that of the honeybee brain. Studies on the ontogenetic development of the brain diphenism found in adult honeybees have revealed an interesting phenomenon. The differential nutritional inputs received by developing larvae boost the development of the “bipotential” brain found in embryos and the initial phases of larval development (primarily L1-2) into that of presumptive queens thus resulting in a bigger brain compared to that of presumptive workers (Moda et al. 2013). This picture, nevertheless, shifts during subsequent developmental stages

Corresponding author: A. Barchuk, barchuk@unifal-mg.edu.br

Manuscript editor: Klaus Hartfelder

before adult emergence. Specifically, morphogenetic reorganisations occur so that the brain, which is larger in queen larvae, is relatively smaller than that of workers in the pharate-adult stage (Figure 1). Lastly, development assures that the brains of newly emerged bees of both castes are alike in size and, as the queen is larger, adult workers feature a proportionally larger brain than adult queens. This developmental phenomenon does not have a straightforward biological explanation, and we will discuss some of its morphological and molecular underpinnings in the following sections.

2. HONEYBEE DIPHENISM AND CASTE DIFFERENTIATION

The genus *Apis* differs from the extremely rich group of bees based on their evolutionary trait of highly eusocial organisation, a feature shared with the stingless bees (Meliponini). These highly eusocial bees show caste morphology in addition to

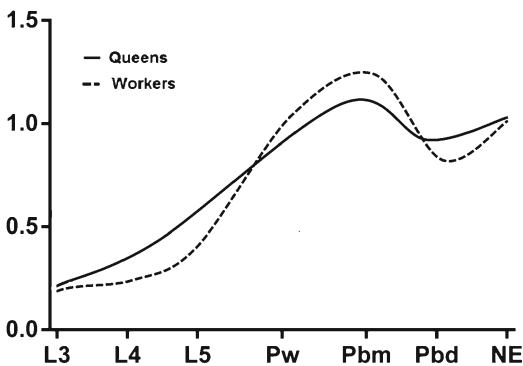


Figure 1. The brain size shift between developing *Apis mellifera* queens and workers. The queen's brain during the larval stage develops more rapidly than the worker's. This pattern shifts during the next stage (pupal/pharate-adult), with the end result being that newly emerged queens and workers feature equal-sized brains, although the brain/body ratio favours workers. L3: third larval instar; L4: fourth larval instar; L5: fifth larval instar; Pw: white-eyed pupa, unpigmented cuticle; Pbm: brown-eyed pupa, intermediary pigmented cuticle; Pbd: brown-eyed pupa, dark pigmented cuticle; NE: newly emerged adult. Values on the y-axis are arbitrary units only to demonstrate the relative developmental trend (modified from Moda et al. 2013; see also Section 6. Honeybee brain development during the pupal and pharate-adult stages).

cooperative brood care, reproductive division of labour and overlap of generations (Wilson 1971). These complex traits have molecular underpinnings that may have evolved from solitary-living bee species. In this context and as an evolutionary-developmental hypothesis, the existence of evolutionarily conserved molecular pathways (“genetic toolkits”) has been suggested. Such pathways would play a role in controlling the feeding behaviour and reproduction of both solitary and highly eusocial insects and thus would underlie the evolution of such complex traits (Toth and Robinson 2007). Genomic evidence, however, supports that the only molecular characteristic that plays a role in the evolution of sociality is the increasing complexity of gene expression networks, rather than the existence of a gene-set for sociality. The transition from solitary to social living seems to have required an increase in gene regulatory system capabilities, including a higher number of genes regulated by DNA methylation and gains in transcription factor-binding sites. Many of such changes constitute targets of regulatory factors that act to control brain gene expression and neurogenesis (Kapheim et al. 2015). Interestingly, the nervous system size is a morphological trait that develops differentially between honeybee castes. Honeybee workers have double the relative antennal surface area compared to queens, have more chemoreceptive plates per antenna, and exhibit a higher number of facets of their compound eyes (Michener 1974). Accordingly, workers have larger antennal lobes and mushroom bodies (MBs), altogether constituting a sensory armamentarium for workers to cope with the broad range of duties they need to perform in a colony (Menzel 2014). Workers also have special, “tool-like” organs that allow them to perform these duties, such as a pollen press and a corbicula, a long proboscis, large hypopharyngeal and mandibular glands, wax glands, Nasanov's gland, and a straight and barbed sting. On the other hand, queens feature the complete morphophysiological set of a reproductive machine, with large ovaries and spermatheca and developed secretory glands for scents that control workers' behaviour (Snodgrass 1910; Michener 1974; Pankiw et al. 1998, Hoover et al. 2003; see also in Miklos and Maleszka 2011).

The first working model of the developmental processes that lead to caste differentiation in honeybees was published after an effort to synthesise DNA microarray hybridization results and data from the literature (Barchuk et al. 2007). The model states that the quality and amount of food that the bipotential female larvae receive determine the developmental trajectories they follow, ultimately giving rise to morphologically distinct queens and workers. Specifically, differential feeding would differentially activate the nutrient-sensing pathway Tor (Target of Rapamycin), which would then differentially induce the synthesis of juvenile hormone (JH) in the *corpora allata*. This signalling pathway and that of Insulin/ILPs, as well as the differential availability of nutrients in the haemolymph (systemic level response), would lead to the differential development of specific organs and systems (morphogenetic fields level response, i.e. brain, ovaries, legs, etc.). This developmental process would require the participation of molecular effectors (e.g. gene expression cascades), some of which would be regulated epigenetically by differential gene methylation. High signalling levels would allow the prospective queens' body to grow and guarantee the development of large ovaries, as well as repress the development of worker specific organs (leg structures, etc.) (Barchuk et al. 2007). This model has proven to be useful, and virtually, all interactions have been supported experimentally (Patel et al. 2007; Kucharski et al. 2008; Maestro et al. 2009; Mutti et al. 2011). All, that is, except for the confounding data on nervous system development that have been obtained from microarray experiments using whole body samples.

The observed split in the developmental trajectories was suggested to occur early in larval life (Cameron et al. 2013), very likely due to significant differences in the nutrient constituents of worker and royal jellies (Leimar et al. 2012). Pioneering work had already suggested the influence of early acting food components in caste differentiation in the honeybee (Asencot and Lensky 1976), and this view recently received support by the identification of small key molecules in honeybee larval food, namely, microRNAs (Guo et al. 2013; see also Ashby et al. 2016). Small hydrophilic molecules (e.g.

microRNAs in royal jelly), which are also present in the heads of nurse bees, were suggested to drive queen development (queen determinant) many years ago (Rembold and Hanser 1964; Weaver 1966; see also Rembold et al. 1974). Another suggested promoter of caste differentiation is a member of the major royal jelly proteins, royalactin, although the activities of this protein have not been comprehensively integrated into the model outlined above (Kamakura 2011). Royalactin has been suggested to promote queen development via the activity of the epidermal growth factor receptor. There is, however, a vigorous debate regarding the role of this signalling pathway in honeybee caste development (Kucharski et al. 2015; see also Buttstedt et al. 2016 and Kamakura 2016).

Studies focusing on the morphogenetic fields of honeybee castes have primarily considered the reproductive system, especially the development of the ovaries, which are very large in queens (approximately 200 ovarioles) compared to those of workers (approximately 12 ovarioles) (Snodgrass 1910; Michener 1974). This ovarian diphenism develops during the larval stage, in which queen ovaries respond to the larval overloading of royal jelly by undertaking marked ovariole development under the molecular protection of juvenile hormone. This hormone was shown to prevent cell death in queen ovaries. Worker ovaries, on the other hand, in response to a different nutritional input and low levels of JH, undergo extensive cell death, leading to differential ovary development between honeybee castes (Capella and Hartfelder 1998; Schmidt Capella and Hartfelder 2002; Antonialli and Cruz-Landim 2006; Lago et al. 2016). The molecular underpinnings of another morphogenetic field, that of the hind leg structures, have recently been revealed. Bomtorin et al. (2012) showed that the development of the "shaved tibia" used by workers to carry pollen (pollen basket) depends upon *ultrabithorax* expression during prepupal and early pupal phases. This finding was then confirmed by Medved et al. (2014) using gene expression interference by RNAi.

The honeybee brain, a third morphogenetic field, has also attracted a good deal of scientific attention. In the animal kingdom, eusociality is

phylogenetically considered an unusual trait, since it is nearly confined to insects (ants, wasps, termites, and bees; Wilson 1971), in addition to occur in some crustaceans (Emmet et al. 2000) and mammals [mole-rats (Burda et al. 2000) and humans (Foster and Ratnieks 2005)]. Eusocial insects are capable of executing complex, cooperative, and altruistic tasks in a colony environment. The capacity of honeybees to learn how to reach food sources and communicate that knowledge to conspecifics makes them powerful models to understand the basis of cognition (Chittka and Niven 2009; Menzel 2012). Moreover, their small, plastic, and versatile brain allows researchers to trace the routes of memory formation at cellular and molecular levels (Menzel 2014; Cristino et al. 2014; Haberkern and Jayaraman 2016). Thus, it is worth noting here some of the general aspects of honeybee brain biology. We will subsequently present and discuss the morphological and molecular aspects that underlie the ontogenetic saga of the honeybee brain.

3. THE ADULT HONEYBEE BRAIN

The honeybee nervous system consists of a large cephalic ganglion, the brain, which is connected to a series of segmental ganglia along the ventral nerve chord (Snodgrass 1935). The honeybee brain is a small organ consisting of 1 million neurons with their neuropils, structures that are composed of axons, dendrites and glial cell processes that form a dense region of synapses. The neuropils comprise three regions of the brain: the protocerebrum, deutocerebrum, and tritocerebrum. The deutocerebrum essentially contains the antennal lobes, where 60,000 odorant receptor cells are concentrated. The tritocerebrum consists of two bilateral small lobes that innervate the labrum and the digestive tract. Lastly, the protocerebrum is characterised by two optic lobes, which are responsible for the conduction of visual image information to higher centres; the central body, a neuropil that controls locomotor behaviour; and a pair of MBs, which are critical elements responsible for learning (Snodgrass 1935; Strauss and Heisenberg 1993; Menzel 2012). The MBs are higher-order processing centres that integrate stimuli from the optic lobes and antennal lobes. The mushroom

bodies are composed of two calyces, each with three concentric regions: the lip, where olfactory information is received; the collar, which receives visual information; and the layered basal ring, where visual and olfactory inputs converge. Because of their architecture, the calyces are also known as “cup-like” neuropils, which contain hundreds of Kenyon cells (KCs). The KCs are divided into three subpopulations according to the input sensory stimulus: visual, olfactory and mechanosensory. The KCs dendritic arborizations spread to the calyces, and their axonal projections form the peduncles, which are divided into alpha (vertical) and beta (median) branches, also termed the alpha and beta lobes (Mobbs 1982; Kenyon 1896; Farris et al. 1999; Strausfeld 2002).

Because of their physiological plasticity, the honeybee MBs have been extensively studied throughout the entire development of adult behaviour in workers. There is a decrease in KC volume and an increase in MB volume associated with foraging (Withers et al. 1993). No neurogenesis has been observed in adult brains, and studies using Golgi impregnation showed that intrinsic MB dendrites of older workers were typically more spread out and longer than those of young bees. These characteristics apparently reflect the effects of learning and memory in terms of dendritic growth of intrinsic neurons and neuropil volume (Farris et al. 2001; Fahrbach et al. 1995a; Withers et al. 1993). In comparison, the architecture of a queen's brain changes during adulthood (from 1 day to 5 months old). Specifically, the population of KCs decreases by approximately 30%, and the MB volume increases between 25 and 50%. In this context, an important feature shared by both castes is exposure to high levels of JH prior to neuropil development, suggesting that anatomical changes in KCs and MBs are under endocrine control (Robinson 1992; Fahrbach et al. 1995b).

4. EMBRYOLOGICAL ORIGIN OF THE HONEYBEE BRAIN

In 1915, J.A. Nelson published a monograph of 282 pages and 95 figures that represented and described various aspects of honeybee development. Depending on temperature, development

from oviposition to larval eclosion takes 70–76 h, and this period is divided into 15 stages based on morphological characteristics (Nelson 1915). Some years later, Du Praw refined Nelson's work using innovative techniques and established 10 stages of honeybee embryogenesis (Du Praw 1967). Later, using scanning electron microscopy, Fleig and Sanger (1986) observed that honeybee nervous system development begins 44 h after fertilisation, at Du Praw's stage 9. Two longitudinal thickenings or ridges extending along the ventral side of the embryonic germ band go on to form the ventral nerve cord. Cephalically, a proliferative area in the head ectoderm gives rise to three prominences, the protocerebrum, deutocerebrum and tritocerebrum (Nelson 1915; Du Praw 1967; Fleig and Sanger 1986). These swellings compose the brain neuropils, the architecture of which is composed of neurons, their processes, and glial cells.

Using grasshopper embryos as a model, Wheeler (1891) studied the histogenesis of neurogenic tissues and identified the progenitors of neurons and glia, which are termed neuroblasts (NBs). Wheeler observed that after gastrulation, the ventral ectoderm (or neuroectoderm), consists of two kinds of cells, NBs and dermatoblasts, which will form the integumentary system. The NBs start to bud off smaller cells, the ganglion cells, by mitotic division. Other researchers have reported the same observations in Orthoptera, Dermaptera, the mason bee and beetles (Wheeler 1891; Nelson 1915). Since this time, experiments performed with *Drosophila melanogaster* have elucidated many of the molecular and cellular mechanisms related to nervous system development, with a focus on NB specification, differentiation and segregation (Knust and Campos-Ortega 1989; Campos-Ortega and Hartenstein 1997; Doe 1992; Urbach and Technau 2003). Signalling mechanisms that are governed by specific families of genes that include pre-patterning, proneural, and neurogenic genes, orchestrate the delamination of NBs from the neuroectoderm (Knust and Campos-Ortega 1989; Campos-Ortega and Hartenstein 1997; Hartenstein and Wodarz 2013). There are two types of NBs, type I and type II. Type I NBs divide asymmetrically and give rise to both another NB—in a process

termed self-renewal—as well as a smaller cell referred to as a ganglion mother cell (GMC). The GMC is committed to differentiate into a neuron and glial cell. Type II NBs can also self-renew or can form intermediate neural progenitors (INPs), which give rise to GMCs (Boone and Doe 2008; Homem et al. 2015; Altenhein 2015; Koniszewski et al. 2016).

Some aspects of nervous system development are conserved in hemi- and holometabolous insects. The spatial arrangement, timing of delamination, and molecular network that specifies the NBs are strongly conserved between species (Urbach and Technau 2003; Koniszewski et al. 2016). On the other hand, NBs that form specific neuropil structures, such as the MBs, differ between species in number, arrangement, and proliferation behaviour. In *A. mellifera*, a compact group of 40–45 NBs per hemisphere forms the MBs, whereas 2–6 NBs are found in Diptera, Hemiptera, and Neuropteroidea (Malun 1998; Farris et al. 1999; Ito and Hotta 1992; Cayre et al. 1996). In the following section, we discuss their participation in the development of the larval honeybee brain.

5. HONEYBEE BRAIN DEVELOPMENT DURING THE LARVAL STAGE

The brain of a recently hatched honeybee larva is similar to that of other insects and does not seem to exhibit morphological differences between the castes much before the fourth larval instar, L4 (Nelson 1924; Moda et al. 2013). This lack of observed differences, however, might be due to methodological limitations and the challenge involved in dissecting such small organs. During the early larval development, the honeybee brain almost completely fills the head capsule and consists of two symmetrical proliferating halves with a central mass of nerve fibres, all surrounded by a neurilemma (Nelson 1915, 1924; Farris et al. 1999). The most prominent part of each hemisphere is the ontogenetic derivative of the protocerebrum, with its conspicuous optic lobe. The halves of the protocerebrum are joined by nerve fibres, forming the supraoesophageal commissure. The deutocerebrum and tritocerebrum derivatives seen during this period are very small

and become organised below the protocerebrum, representing the precursors of the antennal lobes and, together with the suboesophageal commissure, form a ring that surrounds the oesophagus (Nelson 1924).

Comprehensive studies on postembryonic brain development in *A. mellifera* were published by Malun (1998) and Farris et al. (1999). These authors used basic histological analyses combined with BrdU incorporation and immunolocalization of a MB neuropil marker (cAMP-dependent protein kinase type II) and myocyte enhancer factor 2, a marker of noncompact KCs. Using these techniques, the morphological developmental dynamics of worker MBs was described from the first instar larva to adult eclosion. These studies showed that the brain in L1 and L2 (see Table 1) features two clear NB clusters (proliferation centres for KCs) per hemisphere, a small medial cluster with approximately 16 cells and a large lateral cluster with approximately 45 cells (Malun 1998; Farris et al. 1999; see also Urbach and Technau 2003). Both clusters are delimited from the rest of the brain mass by a thin layer of early GMCs (see also Hähnlein and Bicker 1997). There are no calyces, lobes, or pedunculi observed at these developmental phases. From the third larval instar to metamorphosis, the NB clusters undergo a steady increase in both volume and the number of cells, including some scattered GMCs. These two types of proliferating cells are responsible for giving rise to the organisation of the brain. A NB divides asymmetrically to give rise to another NB and a smaller GMC, the latter of which divides symmetrically into two KCs (Farris et al. 1999). Thus, at the third larval instar, it is possible to identify the first manifestation of peduncular neuropile ramifications, indicating the differentiation of the first KCs (future outer compact cells, originated by mitoses of GMCs migrating from the NB cluster). This is clearly seen from the fourth larval stage onward, when these cells come to surround the NB clusters and form a thin sheath of small cells that extend axons and form the primordia of the branching pedunculi (Farris et al. 1999). All of these structures continue to increase in size and thickness, and by the spinning phase of the fifth instar (L5S), a distinct layer of GMCs becomes apparent between the NB cluster

Table 1. Developmental phases of *A. mellifera* considered in this work (for details see Rembold et al. 1980 and Michellete and Soares 1993)

Abbreviation	Developmental phase
E	Embryo
L1	First instar larva
L2	Second instar larva
L3	Third instar larva
L4	Fourth instar larva
L5F1	Fifth instar larva, feeding phase 1
L5F2	Fifth instar larva, feeding phase 2
L5F3	Fifth instar larva, feeding phase 3
L5S1	Fifth instar larva, cocoon-spinning phase 1
L5S2	Fifth instar larva, cocoon-spinning phase 2
L5S3	Fifth instar larva, cocoon-spinning phase 3
PP1	Fifth instar larva, prepupa 1
PP2	Fifth instar larva, prepupa 2
PP3	Fifth instar larva, prepupa 3
Pw	White-eyed pupa, unpigmented cuticle
Pp	Pink-eyed/pharate-adult transition, unpigmented cuticle
Pdp	Dark pink-eyed pharate-adult, unpigmented cuticle
Pb	Brown-eyed pharate-adult, unpigmented cuticle
Pbl	Brown-eyed pharate-adult, light pigmented cuticle
Pbm	Brown-eyed pharate-adult, intermediary pigmented cuticle
Pbd	Brown-eyed pharate-adult, dark pigmented cuticle
NE	Newly emerged adult

and the surrounding sheath of KCs. In addition, the pedunculi that originate from the base of each cluster during the preceding fifth instar feeding phase (L5F) become more evident (Farris et al. 1999). The morphogenetic field of the MBs is thus formed by concentric layers of proliferative cells. Knowledge of the development of the MBs and other honeybee brain regions such as the optic lobes (Marco Antônio and Hartfelder 2016) has broad scientific interest given that, for example, pesticides used in agriculture to control insects target the brains of larval bees (Tomé et al. 2012; Tavares et al. 2015).

Using phalloidin and DAPI staining of whole-mount brains, Moda et al. (2013) showed clear peduncular organisation in worker larvae in the L5F phase. In contrast, this organisation was already observed to the end of L3 in queen larvae (Figure 2a). Moreover, these authors reported that MB calyces first appear at the beginning of the L5S phase in workers and slightly earlier in queens (L5F). This neuropil differential morphogenesis is also accompanied by a marked difference in MB cell proliferation. Cell proliferation rates, as assessed by EdU staining, increasingly differ between castes from L4 until L5S, difference that favours queen larvae (Moda et al. 2013). Higher levels of brain neuron proliferation in queen larvae were previously demonstrated by

Roat and Cruz Landim (2008). These authors, by measuring conventional histological sections, showed that the brain of queen L5 larvae features an approximately 45% larger NB area than the brain of worker larvae, and this difference was seen to persist until the middle of the pharate-adult developmental period. During the prepupal stage in workers, the number of NBs per cluster of the brain peaks at approximately 500; a significant number of KCs are generated and located externally to the cluster (non-compact cells), and the calycal neuropil appears along with the almost completely grown α and β lobes (Malun 1998; Farris et al. 1999). Information on general aspects of honeybee larval development and metamorphosis can be obtained from Cruz-Landim (2009).

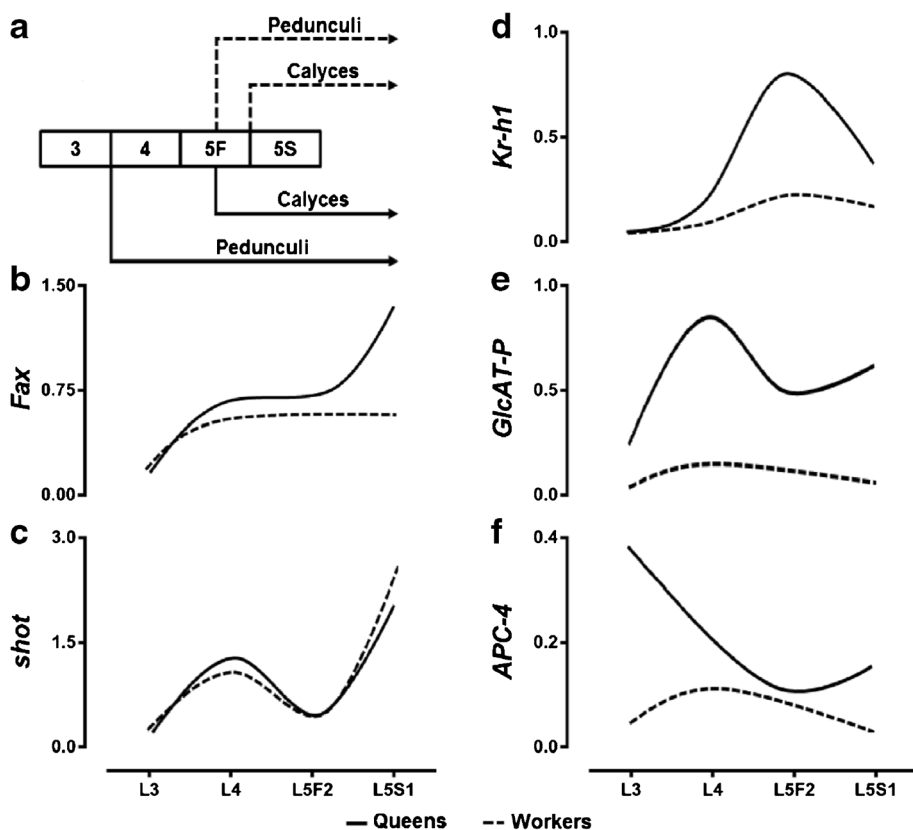


Figure 2. The developmental dynamics of the larval brain favour the queen honeybee caste. **a** Summary of the timing of morphological differentiation in queen and worker larval MB structures. Continuous lines, queens. Discontinuous lines, workers. **b–f** General transcription profiles of key genes in the larval differential brain development between honeybee castes. **b** *failed axon connection*, **c** *short stop*, **d** *krüppel homologue -1*, **e** *galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase P*, **f** *anaphase promoting complex 4*. Modified from Moda et al. (2013).

The morphological dynamics of differential brain development observed between queen and worker larvae may be conceived as a natural experiment and, accordingly, the fate of the respective morphogenetic fields should be molecularly established by the differential expression of specific genes. The first genes suggested to play a role in differential neurogenesis between honeybee castes were reported by Barchuk et al. (2007). Nonetheless, as these genes were identified using genome-wide analyses of whole-body RNA samples, they may not reflect the actual biology of a small organ like the brain, whose contribution of differentially expressed genes is likely to be minimal. With this limitation in mind, Moda et al. (2013) carried out genome-wide analyses on RNA samples taken from L4 brains of queens and workers, identifying 16 differentially expressed genes. RT-qPCR assays were used to pinpoint five genes whose expression may be responsible for the differential brain development between castes during the larval phases, with all five being more highly expressed in queens (Figure 2b–f): *failed axon connection (fax)*, *krüppel homologue-1 (kr-h1)*, *galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase P (GlcAT-P)*, *anaphase-promoting complex 4 (APC-4)*, and *short stop (shot)*. The differential expression of these genes was confirmed by immunolocalization (Moda et al. 2013). Fax, GlcAT-P, and shot proteins are known to participate in fasciculation processes, usually leading to the development of neuropils in the brain and in the peripheral nervous system (Liebl et al. 2000; Pandey et al. 2011; Reuter et al. 2003; see also Farris and Sinakevitch 2003 for data on *dachshund* gene regulatory function in brain development). *kr-h1*, on the other hand, is a JH immediate response gene that also acts to integrate the ecdysteroid pathway and is known to have functions associated with neurogenesis (Shi et al. 2007; Jindra et al. 2013). APC, combined with the coactivators Cdh1 and Cdc20, has functions beyond its classical mitotic role. For example, APC regulates neurogenesis, glial differentiation and migration, neuronal morphogenesis, survival and metabolism, synapse formation and plasticity, as well as learning and memory (Huang and Bonni 2016). Other neurogenic genes have also been

studied in the context of compound eye development in honeybee workers and drones (Marco Antônio and Hartfelder 2016).

Taken together, the available morphological and molecular evidence indicates that the differential neurogenesis favouring the brain development of the honeybee queens is due to early differences in nutritional signalling between queen and worker larvae. These differences promote the establishment of caste-specific hormonal environments, which in turn drive the expression of different groups of effector genes (Ulrich and Rembold 1983; Hartfelder and Engels 1998; Barchuk et al. 2007; Maestro et al. 2009; Mutti et al. 2011; Moda et al. 2013). These may be considered to be the molecular responsible for the development of the initially larger brain seen in queen larvae. Hence, this diphenism can be interpreted as representing a heterochronic effect of differential larval feeding regimes, which after morphological reorganisations leads to the development of distinct nervous systems proper of adult honeybee female castes.

6. HONEYBEE BRAIN DEVELOPMENT DURING THE PUPAL AND PHARATE-ADULT STAGES

Brain structures and the distinct lip and collar regions of the MBs continue developing and increasing in size during the pharate-adult period of development, ultimately reaching final adult organisation and size. On the other hand, the number of NBs and the volume of the NB clusters start decreasing from the prepupal/pupal stages, both in queens and workers (Malun 1998; Farris et al. 1999; Roat and Cruz Landim 2008, 2010a, b). KCs continue proliferating, and by the beginning of pharate-adult development (Pb-Pbl), a third type of cells appears and forms the inner compact cell layer. At this time, the morphogenetic field of the MB is formed by clusters of a few NBs “capped” by active GMCs, all surrounded by layers of various types of KCs. During the next developmental phases of the pharate-adult period, the morphogenetic field starts to be interiorly remodelled by cell death events suffered by the remaining proliferative cells (Malun 1998; Farris et al. 1999; Roat and Cruz Landim 2008, 2010a,

b). The cell death events within NB clusters start immediately following an abrupt cessation of cell proliferation (Ganeshina et al. 2000). Using BrdU incorporation and TUNEL assays, these authors showed that both events are sequentially coupled and coincide temporally with a minor peak in ecdysteroid titres during the middle of the pharate-adult period of development (Pinto et al. 2002). The functional association between ecdysteroids and the triggering of cell death in the honeybee brain was further demonstrated by the manipulation of hormone levels. Using 20-hydroxyecdysone injections in live pharate-adult bees and squash preparations of the brains, Malun et al. (2003) demonstrated that this hormone acts by reducing mitotic activity in NB clusters. A similar action of ecdysteroids on nervous system reorganisation was demonstrated in the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*, where these steroid hormones regulate cell death and ventral nerve cord shortening (Pinto et al. 2003).

Interestingly, the observed differential neurogenesis and rate of cell death in pharate-adult brains following the cessation of cell proliferation are caste specific. The MBs of queens exhibit far more cell death than those of workers (Roat and Cruz Landim 2008, 2010a), and differential cell fates are also observed in other brain regions, such as the optic (Roat and Cruz Landim 2010b) and antennal lobes (Roat and Cruz Landim 2011). In all cases, these events favour the development of larger structures in the worker brain. This outcome has also been shown using immunostaining techniques with confocal fluorescence microscopy. Groh and Rössler (2008) reported that the glomerular volume (and the microglomeruli number in the MB-calyx lip) in newly emerged workers is slightly larger than in queens, even though the development of the olfactory synaptic neuropil of the antennal lobe and the MB is approximately 4 days faster in queens. Interestingly, the number of microglomeruli in the MB-calyx is under brood temperature control, such that any variation from the normal intracolony temperature promotes the development of smaller structures (Groh et al. 2004), thereby pushing the resulting brain phenotype to that of queens. This finding led the authors to propose that the observed accelerated development of the

queen olfactory pathway results in diminished olfactory wiring in members of this caste, which might have physiological implications regarding olfactory learning skills in adult bees.

The observed beginning of caste-specific brain development early in the pharate-adult stage might be under combinatorial hormonal control. Ecdysteroid titres are higher in queens than in workers during the entire larval stage and the pupal phase (Pw, see Rachinsky et al. 1990; Pinto et al. 2002) and seem to differ only slightly in their profile during the subsequent pharate-adult stage. JH titres are also higher in queens during the whole larval stage, reaching basal levels at the larval-pupal moult and remaining at this level until the end of pharate-adult development (Hartfelder and Engels 1998). It is possible that neurogenesis is favoured in queen larvae by a combination of high nutritional input in the presence of high levels of developmental hormones (ecdysteroids and JH), the production of which is thought to depend on nutrition. However, during the next developmental stage (larval-pupal moult and pupal-pharate-adult phases), the high ecdysteroid titres that characterise queens, but now in the absence of JH, push the cell death/proliferation ratio towards queens and now benefit worker brain development. The cell death-inducing effects of ecdysteroids and the protective effects of JH have been demonstrated to play a role in other insect model systems, including optic lobe development in *D. melanogaster* (Riddiford et al. 2010; see Monsma and Booker 1996; Rössler et al. 2000; Wu et al. 2006; Parthasarathy and Palli 2007, for examples in other model systems).

By applying comparative morphometric analyses of histological sections, we found that brain development favouring workers begins as early as the white-eyed, unpigmented cuticle pupa phase (Pw), immediately following the larval-pupal moult (Figure 3a–b). This caste-specific morphometry continues through pharate-adult development, with brains showing a progressively larger total area in both castes. However, the differential morphometry that favours pharate-adult workers vanishes at the end of this developmental period (Pbd-NE), when the brains of queens appear to be slightly larger than those of workers (see Table I for developmental staging).

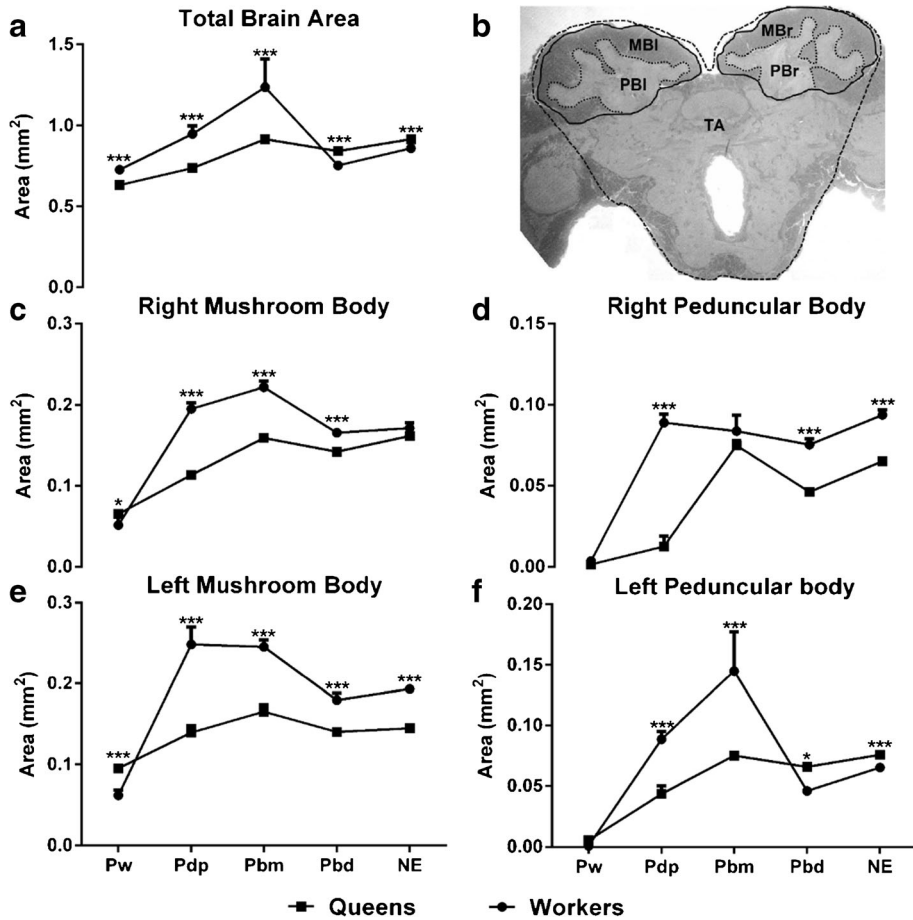


Figure 3. The development of the pupal and pharate-adult brain favours the worker caste. In **a** and **b**, the total brain area excludes that of the optic lobes (delimited by the outermost discontinuous line shown in **b**). Brains ($n=5$ per phase per caste) were dissected in 4% paraformaldehyde, dehydrated and embedded in Leica Histo-resin. The brains were carefully sectioned (3 μm) in series, the largest slices (6–7, corresponding to the medium part of the brain) glued to a slide and the slice with the largest width of the brain was always used for measurements. The sections were stained with basic fuchsin and methylene blue, and the images were captured using a Zeiss Axio Lab microscope equipped with Zeiss Axio Vision software. The areas were measured using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>). All measurements (different brain regions) were performed with the same bee samples. Pw, white-eyed, unpigmented cuticle; Pdp, dark pink-eyed pharate-adult, unpigmented cuticle; Pbm, brown-eyed pharate-adult, intermediary pigmented cuticle; MBI and MBr, left and right MBs, respectively; PBI and PBr, left and right peduncular bodies, respectively; TA= total brain area. Means \pm SE; two-way ANOVA followed by Bonferroni test, $*p > 0.05$; $***p > 0.001$.

MBs as a whole are pretty similar in size in both castes at the Pw phase (actually, calices are still a bit larger in queens, Figure 3e) and favour workers during the following developmental phases. This rule holds with the exception of the left peduncular bodies, which experience a shift at Pbm-Pbd, favouring queen brains (see Peduncular

Body in Figure 3d, f). Furthermore, right-side calices are quite similar in size in NE bees (Figure 3c). As there is no very clear size difference in MBs regions between queens and workers in Pw, the observed difference in total brain area favouring the worker in Pw is likely due to differences in the antennal lobe and suboesophageal

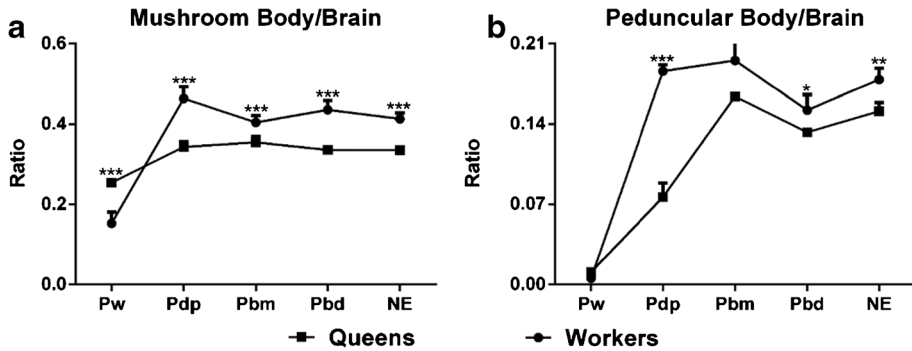


Figure 4. Mushroom body and peduncular body/brain ratios of Pw and pharate-adult queen and worker honeybees. **a** MB/brain ratios. **b** Peduncular body/brain ratios. For details on the histological analysis and description of the developmental stages, see Figure 3. Means \pm SE; two-way ANOVA followed by Bonferroni test, * $p > 0.05$; ** $p > 0.01$; *** $p > 0.001$.

ganglionic areas (Figure 3). A similar, though opposite explanation, can be applied to the variation in total brain area favouring queens in Pbd-NE. This hypothesis is in agreement with the classic view, which describes adult worker MBs as being larger than those of queens (see Michener 1974; Miklos and Maleszka 2011).

Morphometric data thus support the abovementioned findings regarding hormone action on cell proliferation/death in pharate-adult brains. The clear pattern of brain size diminution after the Pbm phase in both castes coincides with the previous ecdysteroid peaks that are typical of this developmental stage (Pinto et al. 2002). It is possible that a molecular cascade promoted by differential variation in ecdysteroid levels leads to differential brain cell death and survival between the castes, causing worker brains to become transiently larger than those of queens. Taken together, the morphometric data support the classic notion of adult worker brains being proportionally larger than those of queens (brain size/body size) and show that MBs per se are larger in workers than in queens (Figures 3 and 4), with all of these differences appearing from the beginning of the pharate-adult developmental stage (Pdp). As MBs are the integrative centre of the brain, the observed difference in size that favours workers clearly fits with the demands of the broad behavioural repertoire of this caste. A similar morpho-behavioural correlation was found in other social insects, such as ants. In these insects, workers with the broadest task repertoire and behavioural plasticity have the largest MBs, and those with the highest

degree of task specialisation have the smallest MBs (Feinerman and Traniello 2016). This trade-off has evolutionary significance and aligns well with the brain diphenism seen in honeybees.

The observed morphological differentiation in the developing brain of queens and workers during the pharate-adult stage is currently under molecular investigation. Using a transcriptomic approach, Vleurinck et al. (2016) detected 1760 differentially expressed genes (DEGs) in the brain tissue of queens and workers at Pdp phase. Of these genes, 902 were upregulated in workers and 858 were upregulated in queens. These DEGs were found to be associated with several molecular processes, such as cell surface receptor signalling, RNA metabolism, DNA-templated transcription, phosphorus metabolic processes, and nucleotide binding. Interestingly, almost all of the DEGs (1623) were protein-coding genes, with only 43 being found to transcribe non-coding RNAs. Of the total number of DEGs, approximately 40% appear to be differentially spliced, with most of these being protein-coding genes (Vleurinck et al. 2016). Recently, our group also used a genome-wide approach (microarray hybridization) to identify more than 300 DEGs in the brain of queens and workers at the beginning of the pharate-adult stage (Pp), many of them related to neurogenic processes and cell death prevention (unpublished). Additional studies are necessary to pinpoint the extent to which each of these genes participates in the differential neurogenesis between pharate-adult honeybee castes.

7. CONCLUDING REMARKS

The saga of the female honeybee brain begins with differential development that favours queens during the larval stage, likely in response to differential nutritional input. This pattern shifts with the larval-pupal moult. During the first part of the pharate-adult developmental period, workers develop larger brains than queens, possibly in response to differences in hormonal environments between the castes. Our working hypothesis is that the observed differences in ecdysteroid levels, in the absence of JH during pupal and most of pharate-adult development, are translated into differential gene expression profiles in the brain. These effects lead to differential cell proliferation/death in the brains of the two castes. The hormonal environment would thus constitute the physiological link between the nutritionally based differential neurogenesis in the larval stage and the neurogenic processes taking place during the pupal/pharate-adult stage. Hormones are also likely the causal factors that transform a rapidly growing tissue during the larval stage into one that experiences far more cell death in the subsequent developmental stage. This relatively long-lasting effect of high nutritional availability in the presence of high titres of ecdysteroids (but the absence of JH) resembles a physiological process found in other systems. It has been shown that high levels of TOR activity in the absence of growth factors promote cell death by excess nutrients (Panieri et al. 2010). Similarly, nutrient excess may induce apoptosis through the action of high levels of the insulin/insulin receptor pathway (Tachibana et al. 2015). In the honeybee brain, the “survival” factor would be JH, the titres of which remain at basal levels until the final phases of the pharate-adult stage (Rembold 1987; Hartfelder and Engels 1998). Thus, it seems that a high nutritional input during larval development may subsequently result in diminished neurogenesis, likely due to lower cell survival. This hypothesis is currently being tested in our laboratory.

Another pending issue in the saga of brain development is that of the absolute MB size and the brain volume/body volume ratio, which favour newly emerged workers. Does this phenomenon accompany the evolution of sociality in bees?

There are data supporting the notion that size differences between female bees increase along with the level of sociality. Hallmark examples, as presented by Michener (1974), are the increasing trend in mean size variation among unfertilized workers and bees with enlarged ovaries in *Augochloropsis sparsilis* (Augochlorini, a semisocial species). This state is followed by the size dimorphism found in *Lasioglossum malachurum* (Halictini, a primitively eusocial species) and in *Lasioglossum imitatum*, which features an additional sociobiological relevant characteristic. Specifically, female size diphenism in this species is accompanied by a proportional allometry regarding ovary development (activated by oogenesis), including ovariole number (as in *L. laevisimum*, Packer 1992). Within Allodapini, the Australian bee *Exoneura variabilis* shows size differentiation between workers and egg-layers, a difference that is also accompanied by differential ovary activation. In addition, there are certain species of the genus *Bombus* (also primitively eusocial) with remarkable differences in female size as well as in physiology, behaviour, and even coloration. The final stage is represented by highly eusocial bees (e.g. the genus *Apis*, Apini, and the stingless bees, Meliponini; see Sakagami 1982). As in honeybees, there are differences in caste size that are reflected in brain size differences, and there is a general trend in increasing caste size differences with increasing levels of sociality. Brain development in the highly eusocial honeybee might thus be a paradoxical case that represents a by-product of the evolution of reproductive division of labour in species with female size diphenism. Therefore, *A. mellifera* castes fit the social brain model, which states that interactions with conspecifics represent cognitive challenges to animals and that any increase in social complexity favours the development of larger brains (Dunbar and Shultz 2007). Thus, it may be that evolutionary caste differences in bees were promoted by developmental morphophysiological trade-offs in which the caste specialising in reproduction invested in ovary development and function, and the non-reproductive multi-task caste invested in brain development (and the other behavioural facilitating structures, such as the corbicula). To test if the evolution of this phenomenon occurred in bees and thus agrees with the social

brain hypothesis (wasps, for example, seem to follow an opposite pattern, O'Donnell et al. 2015), studies must be performed on the allometric relationships between body regions in bees of different sociality levels, as well as on the conservation of the gene expression networks that mediate honeybee caste brain diphenism.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Paulo EF Alvarenga (UNIFAL-MG), Marcela Laure, and Luiz Aguiar (FMRP-USP) for technical assistance in sampling brains, as well as Zilá LP Simões, Marcia Bitondi and Erica Tanaka for helpful discussions. We also thank Zilá LP Simões and Klaus Hartfelder for critically reading a previous version of the MS.

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ-02134-14) and FINEP/PROINFRA 01/2008. ARB is supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Proc. 307426/2014-9). We also thank Lisete M. Rosa (Sítio das Rosas) and Prof. Antônio M. Siqueira (Fazenda da Lagoa) for generously allowing the installation of our experimental apiary.

AUTHORS' CONTRIBUTION

ARB conceived this research and designed experiments; LMRM participated in the design and interpretation of the data; GDS, RDC and DEPJ performed experiments and analysis; ARB and LMRM wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

OPEN ACCESS

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Ontogénese d'un cerveau social

Apis mellifera / abeille / développement / caste / plasticité phénotypique

Die Ontogenese eines sozialen Gehirns

Apis mellifera / Honigbiene / Entwicklung / Kaste / phänotypische Plastizität

REFERENCES

- Altenhein B. (2015) Glial cell progenitors in the *Drosophila* embryo. Wiley Online Library 63:1291–1302. <https://doi.org/10.1002/glia.22820>
- Antoniali W.F. Jr, Cruz-Landim C. (2006) Effect of topical application of juvenile hormone on the occurrence of cell death in the larvae of honeybee (*Apis mellifera*). Braz. J. Morphol. Sci. 23:377–383
- Asencot M., Lensky Y. (1976) The effect of sugars and juvenile hormone on the differentiation of the female honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) to queens. Life Sci. 18:693–700. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(76\)90180-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(76)90180-6)
- Ashby R, Forêt S, Searle I, Maleszka R (2016) MicroRNAs in honey bee caste determination. Sci. Rep. 6, 18794. <https://doi.org/10.1038/srep18794>
- Barchuk A.R., Cristino A.S., Kucharski R., Costa L.F., Simões Z.L.P., et al. (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. BMC Dev. Biol. 7:70. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-70>
- Bomtorin AD, Barchuk AR, Moda LM, Simões ZLP (2012) Hox gene expression leads to differential hind leg development between honeybee castes. PLoS ONE 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040111>
- Boone JQ, Doe CQ (2008) Identification of *Drosophila* type II neuro-blast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. Dev Neurobiol 68:1185–1195. <https://doi.org/10.1002/dneu.20648>
- Burda H, Honeycutt RL, Begall S, Locker-Grutjen O, Scharff A (2000). Are naked and common mole-rats eusocial and if so, why? Behav Ecol Sociobiol 47:293–303. <https://doi.org/10.1007/s002650050669>
- Buttstedt A., Ihling C.H., Pietzsch M.P., Moritz R.F.A. (2016) Royalactin is not a royal making of a queen. Nature 537:E10-E12
- Cameron RC, Duncan EJ, Dearden PK (2013) Biased gene expression in early honeybee larval development. BMC Genomics 14:903. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-903>
- Campos-Ortega J.A., Hartenstein V. (1997) The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, New York
- Capella I.C.S., Hartfelder K. (1998) Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. J. Insect Physiol. 44:385–391. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00027-4)
- Cayre M, Strambi C, Charpin P, Augier R, Meyer MR, et al. (1996) Neurogenesis in adult insect mushroom bodies. J Comp Neurol 371: 300–310

- Chittka L, Niven J (2009) Are bigger brains better? *Curr Biol* 21:995–1008. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.023>
- Cristino AS, Barchuk AR, Freitas FCP, Narayanan RK, Biergans SD, et al. (2014) Neuroligin-associated microRNA-932 targets actin and regulates memory in the honeybee. *Nat Commun* 5:5529. <https://doi.org/10.1038/ncomms6529>
- Cruz-Landim C (2009) Abelhas: morfologia e função de sistemas. Unesp Press, 408p. <https://doi.org/10.7476/9788539304301>
- Doe CQ (1992) Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 116: 855–863
- Du Praw EJ (1967) The honeybee embryo. Crowell, New York
- Dunbar RIM, Shultz S (2007) Evolution in the social brain. *Science* 317:1344–1347
- Emmett DJ, Morrison CL, Rios R (2000). Multiple origins of eusociality among sponge-dwelling shrimps (*Synalpheus*). *Evolution* 54:503–516. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00053.x>
- Erber J (1975) The dynamics of learning in the honey bee (*Apis mellifica carnica*) II. Principles of information processing. *J Comp Physiol* 99:243–255
- Fahrbach SE, Giray T, Robinson GE (1995a). Volume changes in the mushroom bodies of adult honeybee queens. *Neurol learn mem.* 63(2):181–91. <https://doi.org/10.1006/nlme.1995.1019>
- Fahrbach SE, Strande JL, Robinson GE (1995b) Neurogenesis is absent in the brains of adult honey bees and does not explain behavioral neuroplasticity. *Neurosci Lett* 2:145–148. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11913-H](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11913-H)
- Farris SM, Sinakevitch I (2003) Development and evolution of the insect mushroom bodies: towards the understanding of conserved developmental mechanisms in a higher brain center. *Arthropod Struct Dev* 32:79–101. [https://doi.org/10.1016/S1467-8039\(03\)00009-4](https://doi.org/10.1016/S1467-8039(03)00009-4)
- Farris SM, Robinson GE, Davis RL, Fahrbach SE (1999) Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol* 414:97–113
- Farris SM, Robinson GE, Fahrbach SE (2001) Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. *J Neurosci* 21:6395–6404
- Feinerman O, Traniello JFA (2016) Social complexity, diet, and brain evolution: modeling the effects of colony size, worker size, brain size, and foraging behavior on colony fitness in ants. *Behav Ecol Sociobiol* 70:1063–1074. <https://doi.org/10.1007/s00265-015-2035-5>
- Fleig R, Sander K (1986) Embryogenesis of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): an SEM study. *J Insect Morphol Embryol* 15:449–462
- Foster KR and Ratnieks FLW (2005) A new eusocial vertebrate? *Trends Ecol Evol* 20:363–364. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.05.005>
- Ganeshina O, Schafer S, Malun D (2000) Proliferation and programmed cell death of neuronal precursors in the mushroom bodies of the honeybee. *J Comp Neurol* 417:349–365. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000214\)417:3<349::AID-CNE8>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000214)417:3<349::AID-CNE8>3.0.CO;2-E)
- Gilbert SF and Barresi MJ (2016) Developmental biology. Sunderland: Sinauer Associates
- Groh C, Rossler W (2008) Caste-specific postembryonic development of primary and secondary olfactory centers in the female honeybee brain. *Arthropod Struct Dev* 37:459–468. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2008.04.001>
- Groh C, Tautz J, Rossler W (2004) Synaptic organization in the adult honey bee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development. *Proc Nat Acad Sci USA* 101:4268–4273. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400773101>
- Guo X, Su S, Skogerboe G, Dai S, Li W, et al. (2013) Recipe for a busy bee: MicroRNAs in honey bee caste determination. *PLoS ONE* 8(12): e81661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081666>
- Haberkm H, Jayaraman V (2016) Studying small brains to understand the building blocks of cognition. *Curr Opin Neurobiol* 37:59–65. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.01.007>
- Hähnlein I, Bicker G (1997) Glial patterning during postembryonic development of central neuropiles in the brain of the honeybee. *Dev Genes Evol* 207:29–41. <https://doi.org/10.1007/s004270050089>
- Hartenstein V, Wodarz A (2013) Initial neurogenesis in *Drosophila*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2:701–721. <https://doi.org/10.1002/wdev.111>
- Hartfelder K, Engels W (1998) Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr Top Dev Biol* 40:45–77. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60364-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60364-6)
- Homem C, Repic M, Knoblich, JA (2015) Proliferation control in neural stem and progenitor cells. *Nat. Rev.* 16: 647–659. <https://doi.org/10.1038/nrn4021>
- Hoover SE, Keeling CI, Winston ML, Slessor KN (2003) The effect of queen pheromones on worker honey bee ovary development. *Naturwissenschaften* 90:477. <https://doi.org/10.1007/s00114-003-0462-z>
- Huang J, Bonni A (2016) A decade of the anaphase-promoting complex in the nervous system. *Genes Dev.* 30:622–638. <https://doi.org/10.1101/gad.274324.115>
- Ito K, Hota Y (1992) Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 149:134–148
- Jindra M, Palli SR, Riddiford LM (2013) The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu. Rev. Entomol.* 58:181–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153700>
- Kamakura M (2011) Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* 12:994–1003. <https://doi.org/10.1038/nature10093>

- Kamakura M (2016) Replies to: Buttstedt A, Ihling CH, Pietzsch MP, Moritz RFA. Royalactin is not a royal making of a queen. *Nature* 537:E13
- Kapheim KM, Pan H, Li C, Salzberg SL, Puiu D, et al. (2015) Social evolution. Genomic signatures of evolutionary transitions from solitary to group living. *Science* 348:1139–1143
- Kenyon FC (1896) The brain of the bee. *J. Comp Neurol.* 6:133–210
- Knust E, Campos-Ortega JA (1989) The molecular genetics of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* 4:95–100. <https://doi.org/10.1002/bies.950110405>
- Koniszewski NDB, Kollmann M, Bigham M, Farnworth M, He B, et al. (2016) The insect central complex as model for heterochronic brain development—background, concepts, and tools. *Dev. Genes Evol.* 3:209–219. <https://doi.org/10.1007/s00427-016-0542-7>
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R (2008) Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319:1827. <https://doi.org/10.1126/Science.1153069>
- Kucharski R, Foret S, Maleszka R (2015) EGFR gene methylation is not involved in Royalactin controlled phenotypic polymorphism in honey bees. *Sci. Rep.* 5:14070. <https://doi.org/10.1038/srep14070>
- Lago DC, Humann FC, Barchuk AR, Abraham KJ, Hartfelder K (2016) Differential gene expression underlying ovarian phenotype determination in honey bee, *Apis mellifera* L., caste development. *Insect Biochem Mol Biol* 79:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.10.001>
- Leimar O, Hartfelder K, Laubichler MD, Page Jr, RE (2012) Development and evolution of caste dimorphism in honeybees—a modeling approach. *Ecol. Evol.* 2:3098–3109. <https://doi.org/10.1002/ece3.414>
- Levin M (2012) Morphogenetic fields in embryogenesis, regeneration, and cancer: non-local control of complex patterning. *Biosystems* 109:243–261. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2012.04.005>
- Liebl EC, Forsthoefel DJ, Franco LS, Sample SH, Hess JE, et al (2000) Dosage-sensitive, reciprocal genetic interactions between the Abl tyrosine kinase and the putative GEF trio reveal trio's role in axon pathfinding. *Neuron* 26:107–118. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81142-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81142-3)
- Maestro JL, Cobo J, Bellés X (2009) Target of Rapamycin (TOR) mediates the transduction of nutritional signals into juvenile hormone production. *J Biol Chem* 284:5506–5513. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807042200>
- Malun D (1998) Early development of mushroom bodies in the brain of the honeybee *Apis mellifera* as revealed by BrdU incorporation and ablation experiments. *Learn Mem* 1:90–101. <https://doi.org/10.1101/lm.5.1.90>
- Malun D, Moseleit AD, Grünwald B (2003) 20-hydroxyecdysone inhibits the mitotic activity of neuronal precursors in the developing mushroom bodies of the honeybee *Apis mellifera*. *J. Neurobiol.* 57:1–14. <https://doi.org/10.1002/neu.10251>
- Marco Antônio DS, Hartfelder K (2016) Toward an understanding of divergent compound eye development in drones and workers of the honeybee (*Apis mellifera* L.): A correlative analysis of morphology and gene expression. *J. Exp. Zool. B Mol Dev Evol* 00B:1–18. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22696>
- Medved V, Huang ZY, Popadic A (2014) Ubx promotes corbicular development in *Apis mellifera*. *Biol. Lett.* 10:20131021. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.1021>
- Menzel R (2012) The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. *Nat Rev. Neurosci.* 11:758–768. <https://doi.org/10.1038/nrn3357>
- Menzel R (2014) The insect mushroom body, an experience-dependent recoding device. *J. Physiol. Paris* 108:84–95. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.07.004>
- Michelette ERF, Soares AEE (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 24:431–440
- Michener CD (1974) The social behavior of the bees: a comparative study. Harvard University Press, Cambridge
- Miklos GLG, Maleszka R (2011) Epigenomic communication systems in humans and honey bees: from molecules to behavior. *Horm. Behav.* 59:399–406. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.05.016>
- Mobbs PG (1982) The brain of the honeybee *Apis mellifera*. I. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 298:309–354
- Moda LM, Vieira J, Freire ANC, Bonatti V, Bomtorin AD, Barchuk AR, et al. (2013) Nutritionally driven differential gene expression leads to heterochronic brain development in honeybee castes. *PLOS ONE.* 8(5): e64815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064815>
- Monsma SA, Booker R (1996) Genesis of the adult retina and outer optic lobes of the moth, *Manduca sexta*. II. Effects of deafferentation and developmental hormone manipulation. *J Comp Neurol* 367:21–35
- Mutti NS, Dolezal AG, Wolschin F, Mutti JS, Gill KS, et al. (2011) IRS and TOR nutrient-signaling pathways act via juvenile hormone to influence honey bee caste fate. *J. Exp. Biol.* 214:3977–3984. <https://doi.org/10.1242/jeb.061499>
- Nelson JA (1915) The embryology of the honeybee. Princeton, New York
- Nelson JA (1924) Morphology of the honeybee larva. *J. Agric. Res.* 28:1167–1213
- O'Donnell S, Bulova SJ, DeLeon S, Khodak P, Miller S, et al. (2015) Distributed cognition and social brains: reductions in mushroom body investment accompanied the origins of sociality in wasps (Hymenoptera: Vespidae). *Proc. R. Soc. B* 282:20150791. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0791>

- Packer L (1992) The social organisation of *Lasioglossum* (*Dialictus*) *laevissimum* (Smith) in southern Alberta. *Can J. Zool* 70:1767–1774
- Pandey R, Blanco J, Udolph G (2011) The Glucuronyltransferase GlcAT-P is required for stretch growth of peripheral nerves in *Drosophila*. *PLoS ONE* 6 (11): e28106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028106>
- Panieri E, Toietta G, Mele M, Labate V, Ranieri SC, et al (2010) Nutrient withdrawal rescues growth factor-deprived cells from mTOR-dependent damage. *Aging* 2:487–503.
- Pankiw T, Huang Z-Y, Winston ML, Robinson GE (1998) Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers. *J. Insect Physiol.* 44:685–692
- Parthasarathy R, Palli SR (2007) Stage- and cell-specific expression of ecdysone receptors and ecdysone-induced transcription factors during midgut remodeling in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol* 53:216–229
- Patel A, Fondrk MK, Kaftanoglu O, Emore C, Hunt G, et al (2007) The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. *PLoS ONE*, 2:1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000509>
- Pinto LZ, Hartfelder K, Bitondi MMG, Simões ZLP (2002) Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J. Insect Physiol* 48:783–790. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00103-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00103-8)
- Pinto LZ, Laure MAFB, Bitondi MMG, Hartfelder K, Simões ZLP (2003) Ventral nerve cord remodeling in a stingless bee (*Melipona quadrfasciata anthidioides*, Hymenoptera, Apidae) depends on ecdysteroid fluctuation and programmed cell death. *Int. J. Dev. Biol.* 47:385–388
- Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K (1990) Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of Juvenile Hormone and Ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79:3138
- Rembold H (1987) Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* 17:1003–1006
- Rembold H, Hanser G (1964) Über den Weiselfuttersaft der Honigbiene, VIII. Nachweis des determinierenden Prinzips im Futersaft der Königinnenlarven. *Hoppe Syler's Z Physiol Chent* 339:251–254
- Rembold H, Czoppelt C, Rao PJ (1974) Effect of juvenile-hormone treatment on caste differentiation in honey-bee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol* 7:1193–1202. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(74\)90225-X](https://doi.org/10.1016/0022-1910(74)90225-X)
- Rembold H, Kremer J-P, Ulrich GM (1980) Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 11:29–38
- Ress C, Holtmann M, Maas U, Sofsky J, Dorn A (2000) 20-Hydroxyecdysone-induced differentiation and apoptosis in the *Drosophila* cell line, l(2)mbn. *Tissue Cell* 32:464–477
- Reuter JE, Nardine TM, Penton A, Billuart P, Scott EK, et al (2003) A mosaic genetic screen for genes necessary for *Drosophila* mushroom body neuronal morphogenesis. *Development* 130:1203–13. <https://doi.org/10.1242/dev.00319>
- Riddiford LM, Truman JW, Mirth CK, Shen Y (2010) A role for juvenile hormone in the prepupal development of *Drosophila melanogaster*. *Development* 137:1117–1126
- Roat TC, Cruz Landim C (2008) 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* 39: 1171–1178. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.05.004>
- Roat TC, Cruz Landim C (2010a) Differences in mushroom bodies morphogenesis in workers, queens and drones of *Apis mellifera*: neuroblasts proliferation and death. *Micron* 41:382–389. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.01.003>
- Roat TC, Cruz Landim C (2010b) Mitosis and cell death in the optic lobes of workers, queens and drones of the honey bee (*Apis mellifera*) during metamorphosis. *J. Biosci.* 35:415–425
- Roat TC, Cruz-Landim C (2011) Differentiation of the honey bee (*Apis mellifera* L.) antennal lobes during metamorphosis: a comparative study among castes and sexes. *Anim. Biol.* 61:153–161. <https://doi.org/10.1163/157075511X566489>
- Robinson GE (1992) Regulation of division of labor in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.* 37:637–665. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.003225>
- Sakagami SF (1982) Stingless bees. In: Hermann HR (ed) *Social Insects*, Academic Press, 3rd. New York, pp. 361–423
- Schmidt Capella IC, Hartfelder K (2002) Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honey bee ovary. *Cell Tissue Res.* 307:265–272. <https://doi.org/10.1007/s00441-001-0490-y>
- Shi B, Liang J, Yang X, Wang Y, Zhao Y, et al. (2007) Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 27:5105–5119. <https://doi.org/10.1128/MCB.00162-07>
- Snodgrass RE (1910) *The anatomy of the honey bee*. Government Printing Office, Washington
- Snodgrass RE (1935) *Principles of insect morphology*. Cornell, Michigan
- Strausfeld NJ (2002) Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. *J. Comp. Neurol.* 1:4–33. <https://doi.org/10.1002/cne.10285>
- Strauss R, Heisenberg M (1993) A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J. Neurosci.* 5:1852–1861
- Tachibana K, Sakurai K, Yokoh H, Ishibashi T, Ishikawa K, et al. (2015) Mutation in insulin receptor attenuates oxidative stress and apoptosis in pancreatic beta-cells

- induced by nutrition excess: reduced insulin signaling and ROS. *Horm Metab Res* 47:176–183. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1389990>
- Tavares DA, Roat TC, Carvalho SM, Silva-Zacarin ECM, Malaspina O (2015) In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere* 135:370–378
- Tomé HVV, Martins GF, Lima MAP, Campos LAO, Guedes RNC (2012) Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS ONE* 7:1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038406>
- Toth AL, Robinson GE (2007) Evo-devo and the evolution of social behavior. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.05.001>
- Ulrich GM, Rembold H (1983) Caste-specific maturation of the endocrine system in the female honey bee larva. *Cell Tiss. Res.* 230:49–55. <https://doi.org/10.1007/BF00216026>
- Urbach R, Technau GM (2003) Early steps in building the insect brain: neuroblast formation and segmental patterning in the developing brain of different insect species. *Arthropod Struct. Dev.* 32:103–123. [https://doi.org/10.1016/S1467-8039\(03\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S1467-8039(03)00042-2)
- Vleurinck C, Raub S, Sturgill D, Oliver B, Beye M (2016) Linking genes and brain development of honeybee workers: A Whole-Transcriptome approach. *PLoS ONE* 11:1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157980>
- Weaver N (1966) Physiology of caste determination. *Annu Rev Entomol* 11:79–102. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.11.010166.000455>
- Wheeler WM (1891) Neuroblasts in the arthropod embryo. *J. Morph* 4:337–343
- Wilson EO (1971) The insect societies. Harvard University Press, Cambridge
- Withers GS, Fahrbach SE, Robinson GE (1993) Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature* 364:238–240. <https://doi.org/10.1038/364238a0>
- Wu Y, Parthasarathy R, Bai H, Palli SR (2006) Mechanisms of midgut remodeling: Juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mech. Dev.* 123:530–547.