**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Identificação e validação das interações miRNA-mRNA na metamorfose
de *Apis mellifera***

NATÁLIA HELENA HERNANDES

**RIBEIRÃO PRETO, SP
- 2016 -**

NATÁLIA HELENA HERNANDES

**Identificação e validação das interações miRNA-mRNA na metamorfose
de *Apis mellifera***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: GENÉTICA

Orientadora: Profª. Dra. Zilá Luz Paulino
Simões

RIBEIRÃO PRETO, SP
- 2016 -

AUTORIZO A REPRODUÇÃO OU DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Hernandes, Natália Helena

Identificação e validação das interações miRNA-mRNA na metamorfose de
Apis mellifera – Ribeirão Preto, 2016. 90p.: il. 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Simões, Zilá Luz Paulino

1. *Apis mellifera* 2. Metamorfose 3. Interação miRNA-mRNAs 4. Ensaio da
luciferase 5. Redes de interação gênica

Apoio financeiro:

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Programa de Pós-graduação em Genética FMRP-USP, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 2014/18091-5.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Natália Helena Hernandez

Título da Dissertação: Identificação e validação das interações miRNA-mRNA na metamorfose de *Apis mellifera*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Genética.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 2016.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões pelo apoio incondicional, pelas orientações, por cada conversa ser um aprendizado contínuo e por sempre ser tão atenciosa com todos ao seu redor. E principalmente, por participar da minha formação pessoal e científica desde a graduação.

À minha co-orientadora, Dra. Flávia Cristina de Paula Freitas, por toda ajuda, pela paciência por ensinar as técnicas computacionais e também de bancada, pela leitura da dissertação, contribuindo enormemente com a realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Silvana Giuliatti, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Genética, por todo o suporte e investimento fornecidos.

À Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi, ao Prof. Dr. Klaus Hartfelder e à Dra. Karina Rosa Guidugli Lazzarini pelas contribuições importantes ao longo do trabalho.

À nossa querida técnica Vera Lúcia Figueiredo por todo auxílio e dedicação prestado ao laboratório, pelas incontáveis conversas e pelos momentos de carinho e amizade.

Aos apicultores Luiz Aguiar, Jairo de Souza e Rogério Pereira pelo manejo das nossas queridas abelhas, sem os quais não haveria meios de realizar esse trabalho.

Ao Prof. Dr. David De Jong pela gentileza na revisão dos textos em inglês produzidos ao longo do trabalho.

À Profa. Dra. Maria Luisa Paçó-Larson e à Mariana Santos de Queiroz pelo fornecimento de material e das células de *Drosophila* que foram fundamentais para o início do desenvolvimento do projeto.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Fontes, ao Frederico Gomes e à Ana Carolina Coelho pelo fornecimento das células HEK293T.

Ao Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado, à Flavia Donaires e ao Rafael Rossi, pela ajuda com protocolos e material fornecido para as células humanas em cultivo.

À Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo, ao técnico Luiz Augusto César Junior, à Giovana Leandro, à Ana Paula, à Verônica Santana por todo suporte do estoque das células, ajuda com protocolos e material fornecido para cultivo das células humanas.

Ao Prof. Dr. Thiago Mattar e ao Rangel Leal por ter permitido o uso do aparelho luminômetro para leitura das células, sem o qual não seria possível realizar o ensaio de luciferase.

Aos queridos abelhudos, companheiros de laboratório, Camilla, Fabiano, Michelle, Felipe, Tiago, Érica, Flávia, Aline Lucchetta, Lucas, Franciene e Juliana. E a todo pessoal do Apilab, principalmente Clau, Vanis e Aline Turcatto. Obrigada pelos momentos de descontração e por ajuda e orientação dentro do laboratório. Agradecimento especial à Camilla, ao Fabiano e à Michelle pela grande amizade, pela paciência, pelo carinho e pelas conversas que animavam os dias mais difíceis.

À toda minha família, principalmente aos meus pais, Mauro e Rita, que são meu grande exemplo de vida, por tudo que fizeram por mim e por estarem sempre ao meu lado. Aos meus irmãos, Tato, Rô e Ju por alegrar a minha vida e por me ajudar a crescer a cada dia.

Ao meu marido e companheiro, Felipe, pela ajuda científica dentro do laboratório, pela leitura e contribuições essenciais na realização desse trabalho e principalmente pelo apoio incondicional nas horas mais difíceis. Obrigada por essa pessoa incrível que me ajuda a crescer tanto a cada dia.

À agência financiadora FAPESP, CAPES e CNPq, pelo financiamento da pesquisa.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada a todos!

Repare o ritmo da própria vida, examine a receita e a despesa, suas ações e reações, seus modos e atitudes, seus compromissos e determinações, e reconhecerá que você tem a situação que procura e colhe exatamente o que semeia.

André Luiz

HERNANDES, N. H. **Função reguladora dos miRNAs na metamorfose de operárias de *Apis mellifera***. 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A metamorfose em insetos é um dos mais complexos e belos eventos biológicos conhecidos, dirigido por sucessivas alterações morfo-fisiológicas. Este intricado processo é coordenado por componentes moleculares como ecdisteroides (20E) e hormônio juvenil (HJ), fatores de transcrição e microRNAs (miRNAs). Os miRNAs regulam a expressão de genes-alvo, que por sua vez orquestram alterações fisiológicas e anatômicas necessárias para o completo desenvolvimento do organismo. Apesar do enorme esforço, os circuitos genéticos e endócrinos que regulam a metamorfose em insetos sociais, como a abelha *Apis mellifera*, estão longe de serem completamente esclarecidos. Os miRNAs são importantes componentes da maquinaria celular e parecem ser ubíquos no controle de processos biológicos. Desvendar novas interações miRNA-mRNAs alvo envolvidas com a metamorfose e a regulação das cascatas de 20E e HJ lançará uma luz sobre esse complexo evento. Em nosso estudo nós investigamos os papéis de miR-34, miR-281, miR-252a e miR-252b, conhecidos como reguladores da metamorfose em insetos, no modelo *A. mellifera*. Todos estes miRNAs revelaram alto grau de conservação filogenética, bem como responderam ao tratamento com 20E, sofrendo flutuações na abundância de transcritos. Usando as informações disponíveis e nossos bancos de dados, nós identificamos interações envolvendo estes miRNAs e genes participantes nas cascatas de HJ e 20E: *ultraspiracle (Usp)*, *fushi tarazu-transcription factor 1 (ftz-f1)*, *ecdysone receptor (EcR)*, *calponin (chd64)*, *insulin receptor 2 (inr2)*, e *Krüppel homolog 1 (Kr-h1)*. A predição das interações miRNA-mRNAs alvo revelou que os receptores de ecdisteroides *EcR* e *Usp*, bem como o fator de transcrição *ftz-f1* são alvos importantes dos miRNAs estudados, apresentando sítios para os quatro miRNAs investigados. Observamos também que os seis genes codificadores de proteína são putativamente alvejados por miR-34. Por meio do ensaio da luciferase, pudemos validar as interações entre miR-34 e os alvos *Kr-h1*, *chd64* e *inr2*; miR-252a e os alvos *ftz-f1* e *EcR*; miR-252b e os alvos *chd64* e *ftz-f1*; miR-281 e os alvos *ftz-f1*, *EcR* e *Usp*. A investigação dos perfis de expressão dos miRNAs ao longo do desenvolvimento larval (L3-PP3) e pupal (Pw), contrastados com os perfis de seus respectivos alvos, apontou muitos casos de relações positivas miRNA-mRNA. Estes resultados complementaram os resultados de validação, e expuseram a regulação exercida pelo miRNA sobre seus alvos. Juntos, os nossos resultados apontam para novas interações miRNA-mRNAs, envolvidas com a metamorfose em *A. mellifera*. As regulações por nós propostas e validadas bem como suas caracterizações e relações com os hormônios reguladores da metamorfose, são inéditas e acrescentam muito ao conhecimento sobre a regulação da metamorfose em *A. mellifera*. Nesse contexto, nossa pesquisa definitivamente contribui para uma melhor compreensão dos eventos moleculares envolvidos com a metamorfose de abelhas.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, Metamorfose, interação miRNA-mRNAs, Ensaio da luciferase, redes de interação gênica.

HERNANDES, N. H. **Identification and characterization of miRNA-target interactions in the metamorphosis of *Apis mellifera***, 2016. 90 f. Master's thesis - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Insect metamorphosis is one of the most complex and beautiful of known biological events; it consists of successive morphological and physiological alterations. This intricate process is coordinated by various molecular components, including ecdysteroids (20E), juvenile hormone (JH), transcription factors and microRNAs (miRNAs). The miRNAs regulate gene expression, which in turn orchestrates physiological and anatomical changes necessary for successful insect ontogeny. Despite enormous efforts, the endocrine and genetic circuits that regulate metamorphosis in social insects, such as honey bees (*Apis mellifera*), are far from being completely elucidated. The miRNAs are a substantial component of this molecular machinery and seem to be ubiquitously involved in the control of biological processes. Disclosing new miRNA-target interactions involved in metamorphosis and in the regulation of 20E and JH cascades can shed light on these poorly understood events. In this study, we provide new pieces to this puzzle. We investigated the roles of miR-34, miR-281, miR-252a and miR-252b, known to be important regulators of insect metamorphosis, in the *A. mellifera* model. All of these miRNAs revealed a high degree of phylogenetic conservation and responded to treatment with 20E, which altered transcript abundance. Using available information and our databases, we identified interactions involving these miRNAs and the component genes of JH and 20E pathways: ultraspiracle (*Usp*), fushi tarazu-transcription factor 1 (*ftz-f1*), ecdysone receptor (*EcR*), calponin (*chd64*), insulin receptor 2 (*inr2*), and Krüppel homolog 1 (*Kr-h1*). Prediction of miRNA-target interactions revealed that the ecdysteroid receptors *EcR* and *Usp* and the transcription factor *ftz-f1* are highly targeted by miRNAs involved in metamorphosis; they presented binding sites for all four miRNAs. We also observed that all six-protein coding genes are putatively targeted by miR-34. Using the luciferase assay, we were able to validate the interactions of miR-34 with the targets *Kr-h1*, *chd64* and *inr2*; miR-252a with the targets *ftz-f1* and *EcR*; miR-252b with the targets *chd64* and *ftz-f1*; and miR-281 with the targets *ftz-f1*, *EcR* and *Usp*. Investigation of miRNA expression profiles during larval (L3-PP3) and pupal (Pw) development, as a function of the profiles of their respective targets, demonstrated many cases of positive miRNA-mRNA relationships. These results complemented the validation results, showing how the miRNAs regulate their targets. In conclusion, we identified various previously unknown miRNA-mRNA interactions involved in the metamorphosis of *A. mellifera*. The regulatory pathways proposed and validated by us, as well as their characterizations and relationships with metamorphosis regulator hormones, are unique and add to the understanding of the regulation of metamorphosis in *A. mellifera*. In this context, our research contributes to a better understanding of the molecular events involved in honey bee metamorphosis.

Key words: *Apis mellifera*, Metamorphosis, miRNA-mRNAs interactions, Luciferase assay, Gene interaction network.

Figura 1: Desenvolvimento pós-embriológico em abelhas <i>Apis mellifera</i>	2
Figura 2: Via de ação de HJ e 20E na regulação da metamorfose	4
Figura 3: Condições experimentais para o ensaio da luciferase.....	24
Figura 4: Alinhamento múltiplo das sequências dos miR-34, miR- 252a, miR-252b, miR-281 em diferentes espécies de animais	28
Figura 5: Expressão relativa do miR-34 em operárias de <i>Apis mellifera</i> , submetidas a tratamento com hormônio juvenil (HJ) e com 20-hidroxiecdisona (20E).....	29
Figura 6: Expressão relativa do miR-252a em operárias de <i>Apis mellifera</i> , submetidas a tratamento com hormônio juvenil (HJ) e com 20-hidroxiecdisona (20E).....	30
Figura 7: Expressão relativa do miR-281 em operárias de <i>Apis mellifera</i> , submetidas a tratamento com hormônio juvenil (HJ) e com 20-hidroxiecdisona (20E).....	30
Figura 8: Expressão relativa do miR-252b em operárias de <i>Apis mellifera</i> , submetidas a tratamento com hormônio juvenil (HJ) e com 20-hidroxiecdisona (20E).....	31
Figura 9: Representação gráfica das interações preditas, miRNA-mRNA	32
Figura 10: Representação do sítio de ligação predito para o miR-34 na 3'UTR do gene <i>Kr-h1</i> de <i>Apis mellifera</i>	33
Figura 11: Representação dos sítios de ligação preditos para o miR-34, miR-252a e miR-252b na 3'UTR do gene <i>chd64</i> de <i>Apis mellifera</i>	34
Figura 12: Representação dos sítios de ligação preditos para o miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 na 3'UTR do gene <i>ftz-f1</i> de <i>Apis mellifera</i>	35
Figura 13: Representação dos sítios de ligação preditos para o miR-34 e miR-252a na 3'UTR do gene <i>EcR</i> de <i>Apis mellifera</i>	36
Figura 14: Representação dos sítios de ligação preditos para o miR-252b e miR-281 na 3'UTR do gene <i>EcR</i> de <i>Apis mellifera</i>	37
Figura 15: Representação dos sítios de ligação preditos para o miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 na 3'UTR do gene <i>Usp</i> de <i>Apis mellifera</i>	38
Figura 16: Representação dos sítios de ligação preditos para o miR-34 e miR-281 na 3'UTR do gene <i>inr2</i> de <i>Apis mellifera</i>	39
Figura 17: Validação dos sítios de ligação preditos para o miR-34.....	41
Figura 18: Validação dos sítios de ligação preditos para o miR-252a.....	42
Figura 19: Validação dos sítios de ligação preditos para o miR-252b.....	43
Figura 20: Validação dos sítios de ligação preditos para o miR-281	44
Figura 21: Expressão relativa do miR-34, miR-252a, miR-252b e do miR-281 durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 22: Expressão relativa do miR-34 e do gene <i>Kr-h1</i> durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	46
Figura 23: Expressão relativa do miR-34 e do gene <i>chd64</i> durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	46
Figura 24: Expressão relativa do miR-34 e do gene <i>ftz-f1</i> durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	47
Figura 25: Expressão relativa do miR-34 e do gene <i>inr2</i> durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	47
Figura 26: Expressão relativa do miR-34 e do gene <i>Usp</i> durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	48
Figura 27: Expressão relativa do miR-252a e do gene <i>ftz-f1</i> durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	48
Figura 28: Expressão relativa do miR-252a e do gene <i>Usp</i> durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	49
Figura 29: Expressão relativa do miR-252b e do gene <i>chd64</i> durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	49
Figura 30: Expressão relativa do miR-252b e do gene <i>ftz-f1</i> durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	50
Figura 31: Expressão relativa do miR-252b e do gene <i>Usp</i> durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	50
Figura 32: Expressão relativa do miR-281 e do gene <i>ftz-f1</i> durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	51
Figura 33: Expressão relativa do miR-281 e do gene <i>inr2</i> durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	51
Figura 34: Expressão relativa do miR-281 e do gene <i>Usp</i> durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	52
Figura 35: Rede de interações proteína-proteína.....	53
Figura 36: Termos enriquecidos em análise de Gene Ontology	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informações sobre os <i>primers</i> desenhados para o tratamento hormonal.....	15
Tabela 2: Critérios utilizados para classificar as fases do desenvolvimento larval e pupal de operárias de abelhas <i>Apis mellifera</i>	17
Tabela 3: Relação dos genes e de seus respectivos <i>primers</i> utilizados para amplificação das 3'UTRs de <i>Apis mellifera</i>	20
Tabela 4: Informações sobre os <i>primers</i> desenhados para esse estudo.	25

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O controle hormonal da metamorfose.....	1
1.2. As redes gênicas que orquestram a metamorfose	2
1.3. O papel dos miRNAs na regulação da metamorfose	5
1.4. Modelo para estudos sobre a genética da metamorfose.....	9
1.5. Justificativa	10
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo geral	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. Material e Métodos	12
3.1. Grau de conservação dos miRNAs potencialmente envolvidos na metamorfose	12
3.2. Avaliação dos efeitos do tratamento com os hormônios HJ e 20E sobre a expressão de miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281	12
3.2.1. Aplicação de 20-hidroxiecdisona (20E) em pré-pupas	12
3.2.2. Aplicação de Hormônio Juvenil (HJ III).....	12
3.2.3. Extração de RNA total	13
3.2.4. Síntese de cDNA para análise dos microRNAs	14
3.2.5. Análise de expressão gênica dos microRNAs.....	14
3.3. Predição das interações miRNA-mRNAs conservadas entre <i>A. mellifera</i> e <i>D. melanogaster</i> envolvidas na metamorfose.....	15
3.4. Validação das interações miRNA-mRNAs envolvidas na metamorfose de <i>A. mellifera</i> pelo ensaio da luciferase.....	16
3.4.1. Anotação da estrutura dos genes candidatos e desenho de <i>primers</i> específicos	16
3.4.2. Coleta de material biológico	16
3.4.3. Síntese de cDNA para gene codificador de proteínas	17
3.4.4. Inserção das regiões 3'UTRs dos genes candidatos no vetor PsiCHECK2 ..	18
3.4.5. Transfecção em células HEK293T em cultivo.....	22
3.5. Perfis de expressão dos miRNAs e genes codificadores durante o desenvolvimento	24
3.5.1. Análise de expressão gênica.....	24
3.6. Reconstrução de redes parciais de interações preditas, proteína-proteína, na metamorfose de <i>A. mellifera</i> e <i>D. melanogaster</i>	25
4. RESULTADOS	27

4.1. Grau de conservação dos miRNAs potencialmente envolvidos na metamorfose	27
4.2. Avaliação dos efeitos do tratamento com os hormônios HJ e 20E sobre a expressão de miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281.....	29
4.3. Predição das interações miRNA-mRNAs conservadas entre <i>A. mellifera</i> e <i>D. melanogaster</i> envolvidas na metamorfose.....	31
4.4. Validação das interações miRNA-mRNAs envolvidas na metamorfose de <i>A. mellifera</i> pelo ensaio da luciferase.....	32
4.4.1 Sítios de ligação preditos para os miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 nas 3'UTRs dos genes envolvidos na metamorfose de <i>A. mellifera</i>	32
4.4.2. miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 se ligam diretamente a genes envolvidos na metamorfose de <i>A. mellifera</i>	39
4.5 Perfis de expressão dos miRNAs e genes codificadores durante o desenvolvimento	45
4.6. Reconstrução de redes parciais de interações preditas, proteína-proteína, na metamorfose de <i>A. mellifera</i> e <i>D. melanogaster</i>	52
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. O controle hormonal da metamorfose

A metamorfose em insetos holometábolos é dirigida por sucessivas alterações morfológicas e fisiológicas e, apesar do grande esforço por parte dos pesquisadores, o completo esclarecimento dos circuitos genéticos que orquestram estas alterações ainda está longe de ser alcançado. O processo de muda e metamorfose dos insetos está sob o controle de dois hormônios: os ecdisteroides (como a ecdisona e a 20-hidroxiecdisona [20E]) e o hormônio juvenil (HJ) (Nijhout, 1994; revisado por Dubrovsky, 2005). A produção e liberação desses hormônios são realizadas pelo sistema glandular endócrino larval, composto por: *corpora allata*, *corpora cardiaca*, glândulas protorácicas e células neurosecretoras da *pars intermedia* do cérebro (Hartfelder, 1993; Simões *et al.*, 1997; Landin, 2009). Os *corpora allata* e *cardiaca* são órgãos endócrinos ligados ao cordão nervoso, próximos ao esôfago. Enquanto os *corpora allata*, que em *Apis mellifera* constituem um par de glândulas localizadas no complexo retrocerebral (revisado por Dubrovsky, 2005), são os únicos responsáveis pela produção de HJ, os *corpora cardiaca* são órgãos neurohemais que estocam e liberam o hormônio protoracicotrófico, ou PTTH, produzido por células neurosecretoras. O PTTH, por sua vez, estimula a produção de ecdisteroides pelas glândulas protorácicas, um par de glândulas localizadas no tórax que se degeneram após a muda metamórfica (Hartfelder, 1993; Simões *et al.*, 1997).

Os insetos podem sintetizar HJ *de novo* a partir de compostos simples, como acetil-CoA. Por outro lado, a produção de ecdisteroides requer a conversão de esteroides adquiridos pela alimentação. Essa conversão ocorre nas glândulas protorácicas das larvas e pupas, ou nos ovários dos adultos. Em abelhas *A. mellifera* os ecdisteroides predominantes na hemolinfa são o 20E e a *makisterona* A (Feldlaufer *et al.*, 1985; Feldlaufer *et al.*, 1986a; Feldlaufer *et al.*, 1986b; Rachinsky *et al.*, 1990). Durante o desenvolvimento larval o HJ é responsável por manter o estado imaturo e direcionar a ação dos ecdisteroides (Nijhout, 1994). Quando o animal, após sucessivas mudas, atinge o tamanho característico da espécie, os títulos de HJ caem permitindo que a metamorfose prossiga. Neste momento, as glândulas protorácicas liberam na hemolinfa ecdisteroides (fator indutor da muda) que atuam aumentando a síntese proteica e a formação de novas mitocôndrias e retículos endoplasmáticos, além de atuar na epiderme para iniciar a produção e secreção da nova cutícula (Randall *et al.*, 2002).

A queda do HJ e concomitante aumento nos títulos de ecdisteroides promovem a metamorfose que culmina no indivíduo adulto (Nijhout, 1994), na presença de HJ ocorre a inibição da metamorfose e manutenção do *status quo* do organismo; na sua ausência, os ecdisteroides promovem alterações na expressão de genes necessários para a metamorfose do estágio larval para o pupal e depois, do estágio pupal para a vida adulta (Riddiford *et al.*, 1999; Godlewski *et al.*, 2006; revisado por Dubrovsky, 2005) (Figura 1). A liberação desses hormônios é rigorosamente controlada, o que resulta em pulsos precisos ao longo do desenvolvimento (Thummel, 1995).

Figura 1: Desenvolvimento pós-embrionário em abelhas *Apis mellifera*. O esquema ilustra a ocorrência de quatro mudas larvais (L1-L2, L2-L3, L3-L4, L4-L5F) e uma muda metamórfica (L5S-PP-Pw), moduladas pelo balanço entre ecdisteroides (Ecd) e hormônio juvenil (HJ). A amplitude dos picos hormonais não está em escala, ou seja, não correspondem necessariamente aos seus títulos in vivo. L1 a L5 correspondem aos cinco estágios larvais; L5F – larva de 5º estágio em fase de alimentação; L5S – larva de 5º estágio em fase de tecelagem de casulo; PP – pré-pupa; Pw – pupa de olho branco. A parte da ilustração contendo as imagens de abelhas em desenvolvimento foi retirada de: <http://www.aginclassroom.org/html/Newsletter/fall2007.html>.

1.2. As redes gênicas que orquestram a metamorfose

As redes gênicas que controlam a atuação de HJ e 20E são mais complexas de serem entendidas do que a ação dos hormônios em si. Há evidências experimentais de que a proteína codificada pelo gene *methoprene-tolerant* (*Met*) atue como receptor de HJ em *Drosophila melanogaster* (Wilson & Fabian, 1986; Shemshedini & Wilson, 1990). Além disso, *Met* pode formar um heterodímero com seu parálogo *germ-cell expressed*

bHLH-PAS (*gce*) e essa interação Met-GCE diminui quando se adiciona HJ em cultivo de células, indicando, assim, que GCE também possa agir como receptor de HJ (Godlewski *et al.*, 2006). Durante as fases larvais, Met medeia a ação do HJ pela ativação de um alvo precoce, o *Krüppel homolog 1* (*Kr-h1*), cuja função é inibir a metamorfose prematura, como demonstrado em *D. melanogaster* (Minakuchi *et al.*, 2008) e *Tribolium castaneum* (Minakuchi *et al.*, 2009).

Os ecdisteroides agem sobre as células epidérmicas responsáveis por estimular os eventos bioquímicos e morfológicos do ciclo de muda (Riddiford *et al.*, 2001; Zitnan e Adams, 2005). A sinalização de 20E ocorre através da ligação a EcR, um membro da superfamília de receptores hormonais nucleares. EcR forma um dímero com o outro membro desta família: USP (*ultraspiracle*), homólogo ao receptor de ácido retinoico de vertebrados (RXR) (Fahrbach *et al.*, 2012; Hill *et al.*, 2013; Riddiford *et al.*, 2001). Ambos EcR e USP atuam como receptores de 20E, dando início à rede transcricional deste hormônio (Cherbas *et al.*, 1991; Fahrbach *et al.*, 2012; Hill *et al.*, 2013; Riddiford *et al.*, 2001).

Muitos dos genes participantes nas vias de HJ e 20E interagem entre si: HJ frequentemente modula a expressão de genes induzidos por 20E durante a muda e metamorfose (Hiruma & Riddiford, 2010; Riddiford, 1994; Riddiford, 2012). A relação entre os componentes da via de ação dos hormônios HJ e 20E está representada na Figura 2. Estudos de Li *et al.* (2007) sugerem que os genes *Met*, *EcR* e *Usp* estejam envolvidos na via de ação de 20E e do HJ, embora os papéis que exerçam nestas vias ainda não tenham sido esclarecidos. Assim, a interação dos receptores transdutores de sinais dos dois principais hormônios poderia mediar o *cross-talk* entre eles. O fator *fushi tarazu - transcription factor 1* (*ftz-f1*) é um outro exemplo, já que interage tanto com os receptores de 20E quanto com os de HJ (Dubrovsky *et al.*, 2011; Dubrovsky, 2005). Ftz-f1 é um fator de competência (Broadus *et al.*, 1999) expresso ao final de cada muda no desenvolvimento de *D. melanogaster* e *Manduca sexta*, em resposta ao fim do pulso de 20E (Hiruma & Riddiford, 2010; Murata *et al.*, 1996).

Outro gene importante neste *cross-talk* é o *calponin* (*chd64*), que contém um domínio Chd64, crucial para interação entre 20E e o HJ (Liu *et al.*, 2011). O silenciamento do gene *chd64* em larvas de *Helicoverpa armigera* causa o atraso do crescimento larval e muda anormal (Liu *et al.*, 2011), destacando seu papel na sinalização resultante da interação entre 20E e HJ. A transcrição de *chd64* é induzida por 20E e por HJ através da

via de EcR, Met, PKC (*Protein kinase C*) ou Br-C (*Broad Complex*) (Wang *et al.*, 2007; Lui *et al.*, 2011).

Figura 2: Via de ação de HJ e 20E na regulação da metamorfose. Em seu estado não fosforilado, chd64 (*Calponin*) não se liga a USP (*ultraspiracle*, [1]), permitindo a ligação de USP com EcR (receptor de ecdisona, [2]) formando complexo receptor de 20E que promove a metamorfose [3]. Em seu estado fosforilado, chd64 se liga a USP [4] e forma com Met (*Methoprene-tolerant*, [5]) o complexo receptor de HJ, que ativa Kr-h1 (*Krüppel homolog 1*, [6]), bloqueando a metamorfose [7]. Ftz-f1 (*fushi tarazu - transcription factor 1*) atua na via de ação tanto de 20E quanto de HJ, interagindo com os receptores de 20E [8] e do HJ [9]. Os níveis de HJ e 20E apresentam uma retromodulação negativa, na presença de JHE (*Juvenile Hormone Esterase*) os níveis de HJ decrescem e com isso sobem os de 20E; na ausência de JHE os níveis de HJ se mantêm altos e os de 20E baixos.

Outros estudos ainda evidenciaram um importante *cross-talk* entre as vias de sinalização hormonal e a via da insulina. Estudos envolvendo sinalização entre HJ e a proteína *Insulin-like Peptide* (ILP) surgiram a partir de estudos em *D. melanogaster*, mutantes para *insuline-like receptor* (*inr*) (revisado por Jindra *et al.*, 2013). A via da insulina atua no monitoramento do *status* nutricional, sendo responsável por controlar uma grande variedade de processos biológicos como crescimento, amadurecimento,

metabolismo (revisado por Russel & Kahn, 2007; Piper *et al.*, 2008). A insulina e os baixos níveis de 20E são necessários no último estágio larval para o crescimento normal dos discos imaginais de *Precis coenia* (Nijhout & Grunert, 2002) e *M. sexta* (Koyama *et al.*, 2008). Além disso, o INR é necessário para a expressão do gene que codifica a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase, uma enzima envolvida na biosíntese de HJ (Belgacem & Martin, 2007).

1.3. O papel dos miRNAs na regulação da metamorfose

A expressão dos genes que compõem as redes de regulação desencadeadas por ecdisteroides e HJ é também finamente modulada pela ação de pequenos RNAs: os microRNAs (miRNAs). MiRNAs são pequenas moléculas de RNA de fita simples não-codificadoras de proteínas que possuem em média de 19-21 nucleotídeos. Sua principal função é a regulação da expressão pós-transcricional de genes codificadores de proteínas impedindo o processo de tradução dos mRNAs alvo (Bartel, 2004; revisado por Asgari, 2013).

Nos animais, na maioria dos casos, os miRNAs reconhecem os seus mRNAs-alvo pelo pareamento da região *seed* (nucleotídeos 2-8 na porção 5') do miRNA (Lim *et al.*, 2003) com a região 3' não traduzida dos mRNAs (do inglês, *3' untranslated region*, 3'UTR). Contudo, esse pareamento pode ocorrer também na região 5'UTR (Jopling *et al.*, 2005; Lytle *et al.*, 2007; Orom *et al.*, 2008) ou na região codificadora (Tay *et al.*, 2008).

Sendo assim, a ocorrência da ligação miRNA-mRNA impede a tradução do mRNA, por causar sua degradação ou inibição. A degradação do mRNA ocorre por meio de clivagem endonucleotídica, quando a complementaridade miRNA-mRNA é perfeita ou quase perfeita (Zamore *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001; Llave *et al.*, 2002; Yekta *et al.*, 2004), processo efetuado pelas proteínas argonautas presentes no RISC, o Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (Hutvagner & Simard, 2008). Os produtos da clivagem do mRNA são extremamente susceptíveis ao ataque de exonucleases 5'-3' e 3'-5', o que leva rapidamente a degradação do mRNA, finalizando o processo que impede sua tradução (Orban & Izaurralde, 2005).

Embora ocorra em animais (Guo *et al.*, 2010), tal processo de degradação do mRNA por RISC é menos comum, devido a complementaridade imperfeita dos miRNAs (Yekta *et al.*, 2004). Dessa forma, em animais o impedimento da tradução por miRNAs se dá mais frequentemente pela inibição da tradução, por meio da remoção da cauda poli-

A (Giraldez *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006a). Essa remoção impede a interação da cauda poli-A com o CAP 5' na outra ponta do mRNA, evitando assim a circularização da molécula e bloqueando a tradução (Mishima *et al.*, 2006; Wakiyama *et al.*, 2007). Em alguns casos, a remoção da cauda poli(A), pode ainda, disparar a remoção da proteção 5' (CAP), tornando a extremidade 5' do mRNA suscetível à digestão enzimática por exonucleases (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2007). Além desses mecanismos, alguns trabalhos apontam ainda que os miRNAs podem inibir o início da tradução bloqueando o recrutamento dos ribossomos 80S para o mRNA (Mathonnet *et al.*, 2007; Thermann & Hentze, 2007; Wakiyama *et al.*, 2007), ou mesmo inibindo a elongação do polipeptídeo (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993; Olsen & Ambros, 1999). O fato de células animais possuírem mecanismos inibitórios da transcrição, mais frequentemente do que mecanismos de degradação, torna-se uma grande vantagem. Mecanismos inibitórios possuem alta flexibilidade uma vez que podem ser facilmente revertidos caso mudanças rápidas na expressão gênica sejam necessárias (revisado por Massirer & Pasquinelli, 2006).

Apesar dos miRNAs serem mais frequentemente reconhecidos por sua função de silenciar a expressão gênica, estas moléculas também podem atuar na ativação da tradução de alguns alvos (Wu & Belasco, 2008; Krol *et al.*, 2010). Em alguns casos miRNAs interagem com o motivo TATA-box, facilitando a montagem do complexo de iniciação da transcrição de certos genes (Zhang *et al.*, 2014). Além disso, a repressão de um miRNA, por si só, não necessariamente causa o aumento na abundância de seu alvo, o que denotaria uma relação negativa entre miRNA-mRNA alvo. Tal relação negativa só se torna verdadeira quando o miRNA participa de uma alça de retromodulação que inibe a transcrição de seu alvo. Relações positivas entre miRNA-mRNA alvo, situação em que a inibição de uma molécula promove a inibição da outra, podem ocorrer em condições em que ambas moléculas são simultaneamente reprimidas (Yeh *et al.*, 2014). Genes e miRNAs co-transcritos podem ser tanto positivamente quanto negativamente correlacionados (Tsang *et al.*, 2007). Yeh e colaboradores (2014) demonstraram que padrões muito distintos de regulação entre miRNA-mRNAs alvo podem ocorrer no início da metamorfose de *D. melanogaster* e que relações positivas são comuns de serem encontradas.

Estas características tornam os miRNAs moléculas chave da regulação da expressão gênica. Estas moléculas são altamente conservadas entre as espécies e mostram

distintos padrões de expressão temporal e espacial (Kloosterman & Plasterk, 2006). Sua presença é ubíqua na regulação gênica em eucariotos e, portanto, o controle de sua biogênese/degradação é imprescindível para a homeostase celular.

Para se compreender o efeito que um determinado miRNA exerce sobre um processo biológico é necessário identificar os genes por ele alvejados. O fato do pareamento entre miRNA e mRNA não ser perfeitamente complementar em animais torna árdua a tarefa de prever interações miRNA-mRNAs (Davis *et al.*, 2005; Yekta *et al.*, 2004). Inúmeros preditores de sítios de ligação para miRNAs foram desenvolvidos (Huang *et al.*, 2010). Estes programas buscam em bancos de dados mRNAs que apresentem sítios complementares à região *seed* dos miRNAs na sua 3'UTR, além de considerarem a conservação evolutiva dos sítios de ligação dos miRNAs, o valor de energia livre no pareamento miRNA-mRNA e a estrutura secundária do duplex miRNA-mRNA (Mayr *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2007; Duursma *et al.*, 2008). Contudo, todos os preditores encontram um grande número de interações falso-positivas. Assim, é imprescindível a validação destas interações miRNA-mRNA putativas por ensaios experimentais. Um dos experimentos mais utilizados na validação de sítios reguladores é o ensaio do gene-repórter.

O ensaio do gene-repórter utiliza um vetor cuja região 3'UTR (que contém o sítio putativo) é fusionada com a região codificadora de um gene repórter, como por exemplo, o da enzima luciferase, cuja reação produz luminescência. As células em cultura são co-transfectadas com este vetor quimérico e moléculas miméticas de miRNA. Um miRNA mimético é um pequeno duplex de RNA quimicamente sintetizado, cuja sequência nucleotídica é igual ao do miRNA endógeno (Khan *et al.*, 2015). Caso o sítio predito seja então reconhecido pelo miRNA mimético em estudo, este impedirá a tradução da sequência que codifica a proteína luciferase, o que ocasionará diminuição da luminescência em relação à condição controle (a qual possui um miRNA mimético controle que não se liga ao sítio putativo) (revisado por Nicolas, 2011).

Os miRNAs são reguladores da metamorfose de insetos hemimetábolos e holometábolos (Belles *et al.*, 2011). Em um estudo de Zhang e colaboradores (2009) com o bicho da seda *Bombyx mori*, foram identificados 354 microRNAs, 70% dos quais específicos da fase pupal ou larval, denotando sua importância na regulação da metamorfose e desenvolvimento. O miR-281, por exemplo, inibe a expressão da isoforma

B dos receptores de ecdisona em *B. mori*, regulando assim o desenvolvimento dos túbulos de Malpighi desta mariposa (Jiang *et al.*, 2013).

Yeh e colaboradores (2014) identificaram em *D. melanogaster*, por meio de plataformas de microarrays, 617 mRNAs alvejados por 43 miRNAs reguladores do desenvolvimento. O número de associações varia drasticamente entre os miRNAs, e do total de 617 mRNAs, 612 apresentam associações com o miR-34 (Yeh *et al.*, 2014). Além disso, a expressão do miR-34 é regulada negativamente durante a muda metamórfica de *D. melanogaster* (revisado por Luhur *et al.*, 2013). E experimento envolvendo mutantes *Ecdysonelles* (*ecd*), um gene necessário para biossíntese de ecdisteroides, ou no gene *Broad* (*Br*), gene de resposta primária ao 20E, causa um aumento na expressão do miR-34 (revisado por Luhur *et al.*, 2013).

Em *D. melanogaster* miR-34 também se relaciona a senescência, provavelmente por meio da via dos ecdisteroides (revisado por Luhur *et al.*, 2013). Há uma superexpressão de miR-34 em cérebros de indivíduos velhos, talvez reprimindo a morte neuronal (Liu *et al.*, 2012). Mutantes com perda de função de miR-34 apresentam deterioração prematura do cérebro, reduzido tempo de vida e suscetibilidade ao estresse (Liu *et al.*, 2012). Na ausência de miR-34 há aumento da expressão de *Eip74*, um fator de transcrição induzido por ecdisona, e morte neuronal (revisado por Luhur *et al.*, 2013). Estes fatos relacionam elevada expressão da via de ecdisteroides com neurodegeneração e morte prematura. No início do desenvolvimento, a produção de ecdisteroides também é controlada pela via da insulina (Colombani *et al.*, 2005; Francis *et al.*, 2010), notoriamente ligada ao controle do desenvolvimento e tempo de vida (revisado por Russel & Kahn, 2007), havendo a possibilidade de miR-34 fazer o *cross-talk* entre ambas vias hormonais (revisado por Luhur *et al.*, 2013; Garg & Cohen, 2014). Essa hipótese, contudo, precisa ainda ser testada.

MicroRNAs como os miR-34 e miR-281 e ainda outros como miR-252a e miR-252b são potencialmente envolvidos com a metamorfose e ainda pouco explorados no modelo *A. mellifera*. Estes miRNAs regulam genes das vias de ação dos hormônios 20E e HJ em várias espécies de insetos (Soni *et al.*, 2013; Rubio *et al.*, 2012) e, logo, são candidatos a desempenharem tal função nas abelhas. Desvendar os genes-alvo destes miRNAs é o primeiro passo para se entender o seu papel regulador sobre a metamorfose, o que é indispensável para se esclarecer a genética deste intrigante fenômeno biológico.

1.4. Modelo para estudos sobre a genética da metamorfose

A abelha *A. mellifera* é um excelente modelo para pesquisas genéticas sobre a regulação da metamorfose. Essa espécie tem um longo e bem sucedido histórico como organismo experimental, seu genoma já foi completamente sequenciado (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006; Elsäik *et al.*, 2014), sua biologia é amplamente estudada e suas atividades na colônia são facilmente observadas (Amdam & Page, 2005; Alaux *et al.*, 2011).

Nas colônias de *A. mellifera* vive uma única rainha, de 10 a 30 mil operárias estéreis e de zero a alguns milhares de zangões, dependendo da época do ano. *A. mellifera* é uma espécie eussocial, apresentando divisão de trabalho (as operárias cumprem diferentes tarefas na colônia), diferenciação de castas (rainha e operárias) e sobreposição de gerações (Winston, 1993). As operárias desempenham as tarefas não reprodutivas da colônia, como por exemplo: limpeza; remoção de abelhas mortas; ventilação e manutenção da temperatura; produção de cera; construção de favos; alimentação da rainha e crias; defesa; coleta, processamento e estocagem de pólen e néctar. Essas atividades são temporalmente reguladas, envolvendo a progressão de comportamentos sociais, num fenômeno chamado de polietismo etário (revisado por Robinson, 1992)

A rainha poliândrica (acasala com vários machos) controla as atividades da colmeia pela produção de feromônios (substâncias químicas que influenciam o comportamento e a fisiologia das operárias). Como fêmea reprodutora, a rainha cumpre a função de originar todos os indivíduos da colônia, pondo até 2000 ovos por dia. Os ovos eclodem em larvas, que se desenvolvem em pupas e estas últimas em adultos, apresentando, portanto, metamorfose completa, ou seja, são organismos holometábolos. Em condições excepcionais, os zangões podem ser produzidos pelas operárias.

Os machos (haploides) são originados partenogeneticamente a partir de ovos não fecundados (Winston, 1993). As castas diploides, de rainhas e operárias, se originam de ovos fecundados, suas larvas são submetidas a regimes alimentares distintos, que resultam em padrões específicos de regulação endócrina (Hartfelder & Engels, 1998) e expressão gênica (Evans & Wheeler, 1999; Evans & Wheeler, 2000). As larvas fêmeas que são alimentadas apenas com geleia real (secreções das glândulas hipofaríngeas das operárias) crescem e ganham peso em ritmo acelerado, desenvolvendo-se em rainhas. Larvas alimentadas com uma mistura de geleia real, pólen e mel, apresentam uma taxa de crescimento mais lento, pesam menos e se desenvolvem em operárias (Winston, 1993).

Os recursos alimentares de uma abelha adulta restringem-se basicamente a duas fontes: o néctar floral, que garante as suas necessidades energéticas pela riqueza em carboidratos; e o pólen, fonte de nutrientes para o desenvolvimento e crescimento como lipídeos, amido, fibras, vitaminas e minerais (Stanley & Linskens, 1974; Roulton & Cane, 2000), além de ser praticamente a única fonte disponível de proteínas (Haydak, 1970). Entre a primeira e a segunda semana de vida adulta, as operárias assumem a função de alimentar as larvas, comportamento que as caracterizam como nutridoras. Na semana seguinte as operárias processam e estocam alimentos. Por volta de duas a três semanas de idade, as operárias desempenham funções extra-nidais, forrageando em busca de água, resinas e, principalmente, pólen e néctar, período em que são chamadas de forrageiras (Winston, 1993; Page & Peng, 2001).

1.5. Justificativa

Por apresentarem uma metamorfose completa, acessibilidade e facilidade de manipulação, as abelhas constituem um excelente modelo de estudo. E hoje, com a disponibilidade de uma grande variedade de ferramentas genéticas viabilizadas pelo sequenciamento de seu genoma (*Honeybee Genome Sequencing Consortium*, 2006; Elisk *et al.*, 2014), podemos afirmar que *A. mellifera* é um excelente modelo para estudos que busquem desvendar as bases genéticas que regulam o desenvolvimento deste importante modelo biológico. Neste trabalho, nos propomos usar as interações preditas miRNA-mRNA de genes candidatos para reconstruir redes regulatórias que expliquem eventos da metamorfose e confirmar que os miRNAs miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 interagem com as regiões 3'UTR dos genes *chd64*, *Kr-h1*, *EcR*, *ftz-f1*, *inr2* e *Usp*, regulando processos que culminam na metamorfose de abelhas *A. mellifera*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar e caracterizar as interações moleculares preditas entre miRNA-mRNAs de genes candidatos a participarem do controle do processo de metamorfose de *A. mellifera*. Como suporte, desenvolver análises *in silico* e experimentos usando genes repórteres, tratamentos hormonais, análises de expressão por PCR quantitativa em tempo real e redes de interação gênica para validar nossas previsões.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Investigar o grau de conservação dos miRNAs miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 entre espécies de invertebrados e vertebrados;
- ✓ Analisar o efeito do tratamento hormonal com 20E e HJ sobre os perfis de expressão dos miRNAs miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 ao longo do desenvolvimento de *A. mellifera*.
- ✓ Predição de sítios de ligação para os miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 na 3' UTR dos genes *chd64*, *Kr-h1*, *EcR*, *ftz-f1*, *inr2* e *Usp* de *A. mellifera* e *D. melanogaster*;
- ✓ Validação das interações preditas miRNA-mRNAs alvo envolvidas na metamorfose de *A. mellifera* por meio do ensaio da luciferase em células em cultivo HEK293T;
- ✓ Investigar os perfis de expressão dos genes *chd64*, *Kr-h1*, *EcR*, *ftz-f1*, *inr2* e *Usp* e dos miRNAs miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 ao longo do desenvolvimento de *A. mellifera*;
- ✓ Elaboração da rede de interações proteína-proteína (PPI) para os genes *chd64*, *Kr-h1*, *EcR*, *ftz-f1*, *inr2* e *Usp*;

3. Material e Métodos

3.1. Grau de conservação dos miRNAs potencialmente envolvidos na metamorfose

Verificamos diferenças no grau de conservação dos miRNAs miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281. Assim, recuperamos do miRBase (versão 21) a sequência dos miRNAs maduros em diversas espécies e usamos o programa ClustalW (Larkin *et al.*, 2007; Goujon *et al.*, 2010; McWilliam *et al.*, 2013) para gerar o alinhamento múltiplo.

3.2. Avaliação dos efeitos do tratamento com os hormônios HJ e 20E sobre a expressão de miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281

Para os tratamentos hormonais, operárias no quinto estágio larval (L5S3) foram retiradas de favos de cria e mantidas em estufa a 34°C e 80% umidade relativa. Após 16 horas (correspondente ao 2º estágio de pré-pupa, PP2) essas abelhas receberam os tratamentos hormonais, conforme descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2. Os tratamentos foram feitos na fase PP2, para posteriormente serem coletadas em PP3, podendo assim analisar os efeitos do tratamento hormonal na muda metamórfica (PP3).

3.2.1. Aplicação de 20-hidroxiecdisona (20E) em pré-pupas

Para testar possíveis efeitos de 20E na expressão dos miRNAs miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281, este hormônio (Sigma) foi inicialmente diluído em etanol (MERCK) e a solução foi estocada na concentração de 20 µg/µL. Em seguida, a solução foi diluída em solução salina (NaCl 0,9%), obtendo-se uma solução de trabalho na concentração de 5 µg/µL. Um total de 25 pré-pupas (PP2) receberam injeção de 1 µL desta solução na região ventro-posterior. Como grupos controle, 23 PP2 foram injetadas com 1 µL de salina, enquanto 23 PP2 não receberam nenhum tratamento. As soluções foram cuidadosamente injetadas com auxílio de microinjetor. As abelhas foram mantidas em estufa a 34°C e 80% umidade relativa. Cinco indivíduos de cada grupo experimental (Controle sem tratamento, 20E, salina) foram coletados 24 horas após os tratamentos. As amostras foram homogeneizadas em 500 µL de reagente TRIzol® (Invitrogen), estocadas em freezer -80°C até o momento da extração do RNA total.

3.2.2. Aplicação de Hormônio Juvenil (HJ III)

Para testar possíveis efeitos de HJ na expressão dos miRNAs miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281, o hormônio juvenil tipo III (Sigma) foi inicialmente diluído em hexano (Synth), e estocadas na concentração de 20 µg/µL. Para soluções de trabalho, os

estoques foram novamente diluídos em hexano (o grupo que recebeu esse tratamento será chamado de HJ III) para a concentração de 5 µg/µL. Um total de 2 µL dessas soluções (10 µg/µL) foram aplicadas topicamente em 20 pré-pupas PP2. Como grupos controle, 20 larvas PP2 com 2 µL de hexano, enquanto 20 PP2 não receberam nenhum tratamento. As soluções foram cuidadosamente aplicadas com auxílio de um micropipetador de 0,5-2 µL. Após os tratamentos, as abelhas foram mantidas em estufa a 34°C e 80% umidade relativa. Cinco indivíduos de cada grupo experimental (Controle sem tratamento, HJ III, hexano) foram coletados 24 horas após os tratamentos. As amostras foram homogeneizadas em 500 µL de reagente TRIzol® (Invitrogen), estocadas em freezer -80°C até o momento da extração do RNA total

3.2.3. Extração de RNA total

As amostras (em tubos contendo 500 µL de TRIzol®) foram homogeneizadas com o auxílio de ponteiras plásticas. Os tubos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente para quebra de membranas e dissociação dos complexos nucleoproteicos. Em seguida, foram centrifugados a 12.000 x g, a 4°C, por 10 minutos para separação das carcaças. Os sobrenadantes de TRIzol® foram transferidos para tubos de centrifuga de 2 mL, adicionando-se 100 µL de clorofórmio. Após agitação manual por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos, as soluções foram centrifugadas a 12.000 x g a 4°C, por 15 minutos. Para retirar excessos de gordura, repetiu-se a etapa de adição de clorofórmio. Os sobrenadantes (fase transparente, aproximadamente 400 µL) foram transferidos para tubos de 1,5 mL acrescidos de 250 µL de isopropanol. Após 10 segundos em aparelho agitador de tubos (*vortex*), incubação das amostras por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000 x g a 4°C, por 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados. Os produtos precipitados (*pellets*) foram lavados com 500 µL de etanol 75% mediante agitação em *vortex* e novamente centrifugados a 7.500 x g a 4°C, por 5 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e os tubos colocados em termobloco *Digital Dry Bath Incubator* (Boekel) a 55°C, por 5 minutos, para evaporação de etanol residual. Para evitar degradação por RNases, os *pellets* foram ressuspendidos em 70 µL de água DEPC 0,1%. A pureza (estimada por meio da razão entre os valores da leitura a 260 e 280 nm) e concentração (dada em µg/ µL) da solução final de cada amostra foram obtidas por absorbância óptica a 260/280 nm, em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies).

3.2.4. Síntese de cDNA para análise dos microRNAs

A síntese de cDNA para análise dos microRNAs foi realizada usando o *kit NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis and qRT-PCR* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Em suma, 3 µg de RNA total foram primeiramente poliadenilados conforme se segue: os volumes contendo o RNA total foram completados com água DEPC 0,1% para 12,5 µL. Adicionou-se 2,5 µL de 5x *miRNA Reaction Buffer*, 1,25 µL de 25mM MnCl₂, 0,5 µL de ATP 10mM diluído 1:50 em Tris 1 mM (pH 8.0) e 0,25 µL de *Poly A Polimerase*. As reações foram incubadas em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) a 37°C, por 15 minutos. Em seguida, 4 µL do RNA poli-adenilado foram transferidos para novos tubos, adicionando-se 1 µL de *Annealing Buffer* e 3 µL de Universal RT Primer. Estas reações foram incubadas em termociclador a 65°C por 5 minutos e depois colocados no gelo por 1 minuto. Por fim, adicionou-se 10 µL de 2x *First-Strand Reaction Mix* e 2 µL de *SuperScript III/RNase OUT™* (Invitrogen), incubando-se a 50°C por 50 minutos seguido de 85°C por 5 minutos. Como controle negativo, foram preparadas reações sem a enzima *SuperScript III/RNase OUT™*.

3.2.5. Análise de expressão gênica dos microRNAs

Os efeitos do tratamento com HJ e com 20E na expressão dos miRNAs miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 foram analisados por meio de RT-qPCR. Para normalizar a expressão dos miRNAs, usou-se o U5 snRNA, um componente da maquinaria de ‘spliceossomo’, e indicado na literatura como tendo expressão constitutiva (Schmittgen *et al.*, 2004). A lista de *primers* utilizados encontra-se na Tabela 1.

Para amplificação por qPCR foi utilizado o protocolo do reagente *SYBR® Green* (Applied Biosystems). A reação final consistiu em: 10 µL de solução *SYBR® Green* (Applied Biosystems), 6,4 µL de água deionizada e autoclavada, 0,8 µL de cada primer (10 pmol/µL) e 2 µL da solução de cDNA (diluição 1:10). As reações foram montadas em triplicatas técnicas e processadas em aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos), seguidos por 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto). O ciclo de dissociação para todos os *primers* foi 95°C a 60°C (15 segundos em cada grau), 60°C (1 minuto), 60°C a 95°C (15 segundos em cada grau). A análise estatística foi feita utilizando-se o *Teste t de Student* (p<0,05), no software R (versão 3.2.3).

Tabela 1: Informações sobre os *primers* desenhados para análise do tratamento hormonal. O *primer* reverso dos miRNAs corresponde ao fornecido pelo kit NCode, com sequência não informada.

<i>Locus</i>	Código do <i>primer</i>	Sequência 5' -> 3'	Tamanho do fragmento amplificado
U5 snRNA	U5-F	CTCTGGTTTCCCTTCAAATC	74 pb
	U5-R	ATCAATTGTTCCCTCCACG	
miR-34	miR-34-F	TGGCAGTGTTGTTAGCTGGTTG	~ 45 pb
miR-252a	miR-252a-F	ATAAGTACTAGTGCCGCAGGAG	~ 45 pb
miR-252b	miR-252b-F	TTAAGTAGTAGTGTCGTAGATGA	~ 45 pb
miR-281	miR-281-F	TGTCATGGAGTTGCTCTCTTTGT	~ 45 pb

3.3. Predição das interações miRNA-mRNAs conservadas entre *A. mellifera* e *D. melanogaster* envolvidas na metamorfose

Na predição das interações miRNA-mRNAs em *A. mellifera* usamos o programa RNAhybrid (Rehmsmeier *et al.*, 2004; Kruger & Rehmsmeier, 2006) na busca por sítios de ligação para os miRNAs miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 nas regiões 3' não-traduzidas (3'UTRs) dos genes codificadores de proteína envolvidos na metamorfose (*chd64*, *Kr-h1*, *EcR*, *ftz-f1*, *inr2* e *Usp*). Foram consideradas as predições com energia livre ≤ -20 kcal/mol e p-valor $\leq 0,05$. A sequência dos miRNAs foram recuperadas da base de miRNAs miRBase (versão 21, Griffiths-Jones *et al.*, 2008; Kozomara & Griffiths-Jones, 2011). Recuperamos as regiões de 1000 nt a jusante (*downstream*) do códon de parada dos genes codificadores (versão 4.5; Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) para serem utilizadas como 3'UTRs. Destacamos que para usar este valor, de 1000 nt, consideramos, dados de *D. melanogaster* que registram uma média de 500 nt, uma vez que a anotação das regiões 3'UTRs ainda não foi finalizada no genoma de *A. mellifera*.

Para reduzir as interações falso-positivas preditas pelo RNAhybrid, buscamos por sítios de ligação para os mesmos miRNAs nas 3'UTRs dos genes *chd64*, *Kr-h1*, *EcR*, *ftz-f1*, *inr2* e *Usp* ortólogos de *D. melanogaster*. As interações miRNA-mRNA preditas conservadas em ambas as espécies foram consideradas nos passos seguintes. As interações miRNA-mRNA preditas foram representadas em uma rede construída utilizando-se a plataforma Cytoscape (<http://cytoscape.org/>).

Selecionamos os sítios preditos com base na energia livre da interação miRNA-mRNA alvo (energia livre ≤ -20 kcal/mol) e não com base na presença de *seed* (nucleotídeos de 2 a 8 da região 5' do miRNA) conservada, permitindo o pareamento G:U já que esse tipo de pareamento não prejudica as interações (Vella *et al.*, 2004; Didiano & Hobert, 2006; Didiano & Hobert, 2008). Optamos pela escolha dos sítios com base na energia livre, pois alguns sítios de ligação mesmo sem a presença de *seed* podem ser reconhecidos por miRNAs (Didiano & Hobert, 2006; Didiano & Hobert, 2008; Lal *et al.*, 2009; Fasanaro *et al.*, 2012).

3.4. Validação das interações miRNA-mRNAs envolvidas na metamorfose de *A. mellifera* pelo ensaio da luciferase

3.4.1. Anotação da estrutura dos genes candidatos e desenho de *primers* específicos

A estrutura de cada um dos genes candidatos foi anotada com base no arquivo gff disponível para a versão recente do genoma de abelhas (*Official Gene Set*, versão 3.2) através da plataforma UNIGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012). Os sítios de ligação preditos também foram anotados, permitindo assim o desenho de *primers* que flanqueiam os sítios preditos na 3'UTR com o auxílio do programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). A cada par de *primers* foi adicionado o sítio de restrição para a enzima Xho-I (*primer forward*) ou Not-I (*primer reverse*) e uma extensão (CAGTGACT) que permite o melhor ancoramento da enzima de restrição. Esses sítios de enzima de restrição serão utilizados para inserção do fragmento no vetor de clonagem.

3.4.2. Coleta de material biológico

No presente estudo foram utilizadas amostras de operárias da abelha africanizada *A. mellifera*, mantidas no apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). Para coleta das amostras com idades controladas, utilizamos os critérios estabelecidos por Michelette & Soares (1993) (Tabela 2). Cada indivíduo teve seu peso aferido e, em seguida, a região anterior (cabeça) foi descartada com auxílio de tesoura, sob estereomicroscópio. Cinco *pools* independentes para cada fase mostrada na Tabela 2, foram montados separadamente, em 500µL de reagente TRIzol® (Life Technologies), e estocados em freezer -80°C até o momento da extração do RNA total (de acordo com o item 3.2.3).

Tabela 2: Critérios utilizados para classificar as fases do desenvolvimento larval e pupal de operárias de abelhas *Apis mellifera* (modificado de Michelette e Soares, 1993).

	CARACTERIZAÇÃO	DURAÇÃO (horas)
L4	peso – 0,004 a 0,0248 g	55-80
L5F1	peso – 0,029 a 0,06 g	80-95
L5F2	peso – 0,06 a 0,11 g	95-105
L5F3	peso – 0,11 a 0,16 g (fim da alimentação)	105-115
L5S3	célula operculada, larva com intestino vazio	35-55
PP1	comprimento tíbia-tarso = 1,4 a 1,99 mm	145-160
PP3	comprimento tíbia-tarso > 2,6 mm	180-190
Pw	Pupa de olho branco	190-230

3.4.3. Síntese de cDNA para gene codificador de proteínas

Volumes de RNA total, com massas correspondentes a 3 µg, foram completados com água DEPC 0,1% para 9 uL. Adicionou-se 0,5 µL 10x DNase I Reaction Buffer (Invitrogen) e 0,5 µL de DNase I (Invitrogen) para remoção de possível contaminação por resíduos de DNA, a 15 minutos na temperatura ambiente. Adicionou-se 1 µL de 25mM EDTA incubando-se em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) a 65°C, por 10 minutos para inativação da enzima. O RNA total tratado com DNase foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA, em volume final de 20 µL, utilizando-se, por amostra, o seguinte protocolo: 1 µL de oligo(dT)12-18 (500 ng/mL), 1 µL de uma mistura de dNTPs (10 mM), com incubação em termociclador a 65°C por 5 minutos; 4 µL de tampão 5x First Strand Buffer (Invitrogen), 2 µL de ditriotretitol 0,1 M (DDT, Invitrogen), 1 µL de inibidor de RNase (RNase OUTTM, 40 U/ µL, Invitrogen), com incubação a 42°C por 2 minutos; 0,5 µL de água DEPC 0,1% e 0,5 µL da enzima SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (200 U/mL, Invitrogen), com incubação a 42°C por 50 minutos, com posterior ciclo de inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. Como controle negativo, foram preparadas reações sem a enzima SuperScriptTM II.

3.4.4. Inserção das regiões 3'UTRs dos genes candidatos no vetor PsiCHECK2

O vetor PSICHECK2 foi utilizado para realização do ensaio com a luciferase. O vetor psiCHECK2 (Promega) contém a região codificadora da luciferase do vaga-lume (*Photinus pyralis*, Arthropoda, Insecta) e da luciferase da Renilla (*Renilla reniformis*, Cnidaria, Anthozoa). Esta última contém uma região com múltiplos sítios de restrição na sua extremidade 3', o que permite a inserção dos fragmentos de interesse que serão clonados.

Inicialmente, *primers* foram usados na amplificação das regiões que continham os sítios de ligação de miRNA em uma reação de RT-PCR semiquantitativa, utilizando-se um *pool* de cDNAs de larvas e pupas de abelhas operárias como molde (descrito no item 3.3). A lista de *primers* utilizados encontra-se na Tabela 3. Fragmentos que continham os sítios preditos da 3'UTRs dos genes candidatos foram amplificados por PCR utilizando-se 25 µL de solução *Master Mix* (2X, Eppendorf), 16 µL de água milli-Q autoclavada, 2 µL de cada *primer* (10pmol/µL), e 5 µL de cDNA (diluição 1:3). As reações foram feitas no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*), e a temperatura inicial de pareamento dos *primers* e o número inicial de ciclos foram, respectivamente, 60°C e 40. Além disso, desenhamos uma sequência controle (*primers forward e reverse*) que pareava perfeitamente com a sequência dos miRNAs investigados. Foram utilizados 30 µL de cada *primer* pareados com 60 µL de tampão de pareamento (100mM Tris HCl pH 7.5, 1M NaCl, 10M EDTA) por 40 min a 90°C, seguido de 2 horas a temperatura ambiente.

Após a amplificação por PCR os fragmentos foram purificados utilizando-se o *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*GE Healthcare*). A purificação do tampão de pareamento (sequência controle) foi feita pela adição de 120 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (proporção 25:24:1) (*Invitrogen*). Em seguida, a solução foi submetida a centrifugação a 12.000 x g a 4°C por 5 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de 2 mL, adicionando-se 12 µL de acetato de sódio, 220 µL de etanol 100% e 1 µL de glicogênio com incubação -80°C por 1 hora, seguido por centrifugação 12.000 x g a 4°C por 20 minutos. Os produtos precipitados (*pellets*) foram lavados com 1 mL de etanol 70% e novamente centrifugados a 7.500 x g a 4°C, por 20 minutos. Os *pellets* foram ressuspensos em 30 µL de *Elution Buffer* (*illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit - GE Healthcare*).

Ambos, o vetor PsiCHECK2 (2 µg) e o fragmento purificado (700 ng) foram digeridos por 1,5 µL da enzima Not-I HI-Fi (20.000U/mL; *New England Biolabs*) e 2,5 µL de Xho-I (5.000U/mL; *New England Biolabs*) em uma reação com 3,0 µL de *CutSmart Buffer* (*New England Biolabs*) e água milli-Q até completar o volume de 30 µL. As reações de digestão foram incubadas por 3 horas a 37°C, seguido de 30 min a 65°C para inativação das enzimas.

O vetor PsiCHECK2 digerido foi defosforilado por 3 µL da enzima *Alkaline Phosphatase* (Promega), 6 µL do tampão *Alkaline Phosphatase 10X Reaction Buffer* (Promega) e água milli-Q até completar o volume de 60 µL. A reação de defosforilação foi incubada por 2 horas a 37°C, e depois 15 min a 75°C para inativação da enzima. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão 1x TAE (diluído a partir de uma solução TAE 50x: 242 g de Tris Base, 57,1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de solução de EDTA dissódico, 0,5 M, pH 8) e corado e contendo 5 µL de SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (10.000x concentrado, Invitrogen) por 100 mL de gel. O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado com a migração do marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen). Os géis foram visualizados e fotografados com auxílio do aparelho Kodak EDAS 290. As bandas foram recortadas do gel de agarose e purificadas utilizando-se o *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*GE Healthcare*). A reação de ligação foi realizada com 2 µL T4 DNA Ligase (Promega), 10 µL 2X *Rapid Ligation Buffer*, T4 DNA Ligase (Promega), 150 ng dos fragmentos de 3'UTRs digeridos, 50 ng de vetor PsiCHECK2 digerido e defosforilado e água milli-Q até completar o volume de 20 µL. Após adicionar a solução de ligação, as amostras foram incubadas por 16 horas a 4°C.

Células quimicamente competentes (*Dh5-Alpha Competent E. coli*) foram misturadas a 20 µL da solução de ligação e deixadas por 30 minutos no gelo. Em seguida, as bactérias foram transfectadas com o vetor PsiCHECK2+3'UTR por choque térmico (42°C por 45 segundos, imediatamente seguido de dois minutos no gelo). Adicionamos 750 µL de meio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido às bactérias transformadas, as quais foram incubadas por uma hora a 37°C e 230 rpm. Bactérias transformadas foram espalhadas em placas de LB sólido contendo ampicilina (200 ng/µL) e incubadas por 16 horas a 37°C.

Tabela 3: Relação dos genes e de seus respectivos *primers* utilizados para amplificação das 3'UTRs de *A. mellifera*. Os trechos sublinhados correspondem à extensão para o ancoramento das enzimas de restrição (CAGTGACT) e aos sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas Xho-I (CTCGAG) e Not-I (GCGGCCGC).

Gene	Nome dos <i>primers</i>	Sequência 5′ → 3′	Fragmento Amplificado	Temp (°C)	nº de acesso <i>A.mellifera</i>	nº de acesso <i>D. melanogaster</i>
<i>Kr-h1</i>	kr- h1_3UTR_1_XhoI_F1 kr-h1_3UTR_1_NotI_R2	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /TGGTTGGTTCTCCTCGAGAT <u>CAGTGACT/GCGGCCGC</u> /CGTTTCCTTGGAGGGAGAAT	448 pb	60	GB45427	CG45074
<i>chd64</i>	chd64_3UTR_1_XhoI_F1 chd64_3UTR_1_NotI_R2	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /GGTGCTAATCAGAGTGGCATT <u>CAGTGACT/GCGGCCGC</u> /AAAATGAGTTTTGTGCACCATT	207 pb	60	GB51551	CG14996
	chd64_3UTR_2_XhoI_F3 chd64_3UTR_2_NotI_R4	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /CCTTTTTAAAGAAATGAATAATCTCAA <u>CAGTGACT/GCGGCCGC</u> /GTCTTACGCGCAACACGAAT	350 pb	61		
<i>ftz-fl</i>	ftz-fl_3UTR_1_XhoI_F1 ftz-fl_3UTR_1_NotI_R2	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /TCATGGAAATGCTTCATGCT <u>CAGTGACT/GCGGCCGC</u> /CGTCTATACTTGATTGTTTTGCAT	225 pb	60	GB42142	CG4059
	ftz-fl_3UTR_2_XhoI_F3 ftz-fl_3UTR_2_NotI_R4	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /TGCAAACGAATCAAGTATAGACG <u>CAGTGACT/GCGGCCGC</u> /TACTGTCTTCCCTGCGCTTT	183 pb	60		
	ftz-fl_3UTR_3_XhoI_F5 ftz-fl_3UTR_3_NotI_R6	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /CATACCACTGAAGCCTTGCTC <u>CAGTGACT/GCGGCCGC</u> /GTTCTAAGGATGCCAGGTG	207 pb	60		
	ftz-fl_3UTR_4_XhoI_F7 ftz-fl_3UTR_4_NotI_R8	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /CAAGGGATTCAATGGGCATA <u>CAGTGACT/GCGGCCGC</u> /TTTTCCGCCACCTATTTGAA	380 pb	61		
<i>Usp</i>	usp_3UTR_1_XhoI_F1 usp_3UTR_1_NotI_R2	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /GACGTACCGATCGACGATTT <u>CAGTGACT/GCGGCCGC</u> /TCTTCAATGATGTTCTTTGCTTTT	206 pb	60	GB42692	CG4380
	usp_3UTR_2_XhoI_F3 usp_3UTR_2_NotI_R4	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /CGAATTTTCAAACCTCGCTGTT <u>CAGTGACT/GCGGCCGC</u> /TCCACATGATTTTAGGATGTGC	202 pb	60		
	usp_3UTR_3_XhoI_F5 usp_3UTR_3_NotI_R6	<u>CAGTGACT/CTCGAG</u> /TGATGATACAACCTCTTCGATCTCC <u>CAGTGACT/GCGGCCGC</u> /CGTATAATGCACACACGTGTAATA	217 pb	60		

<i>inr2</i>	inr2_3UTR_1_XhoI_F1	<u>CAGTGACT/CTCGAG/GAGAGGAAGGAGGCGTTGTC</u>	189 pb	61	GB55425	CG18402
	inr2_3UTR_1_NotI_R2	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/CTCGCTCAAACGTTCAAACA</u>				
	inr2_3UTR_2_XhoI_F3	<u>CAGTGACT/CTCGAG/GGTGCGTTTCTTTTTCATCC</u>	233 pb	59		
	inr2_3UTR_2_NotI_R4	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/TTTTCGTTGTTTCGTTCAATTTT</u>				
<i>EcR</i>	ecr_3UTR_1_XhoI_F1	<u>CAGTGACT/CTCGAG/TTCAAGCTGAACACCGAATG</u>	196 pb	60	GB48059	CG1765
	ecr_3UTR_1_NotI_R2	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/AGTGCGGAGAGAAGAAGGTG</u>				
	ecr_3UTR_2_XhoI_F3	<u>CAGTGACT/CTCGAG/TCTTCTCTCCGCACTTCACC</u>	287 pb	60		
	ecr_3UTR_2_NotI_R4	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/GGTAGGTAGGTAGCCAGGTAGAGA</u>				
	ecr_3UTR_3_XhoI_F5	<u>CAGTGACT/CTCGAG/GAGGAAGGAGGAAAGGCAGT</u>	231 pb	60		
	ecr_3UTR_3_NotI_R6	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/CCGCTACCTTATTAACATTACACG</u>				

Reações de PCR com *primers* específicos para o vetor PsiCHECK2 foram utilizadas para se identificar as colônias transfectadas com os vetores positivos para a inserção da 3'UTR. Dez microlitros de solução de PCR (5 µL de 2x *Master Mix*; 0,4 µL de 100 µM *primer forward*; 0,4 µL de 100 µM *primer reverse* e água milli-Q q.s.p. 10 µL) foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços. Com auxílio de uma ponteira as colônias de bactérias foram transferidas para uma nova placa LB. As mesmas ponteiras, contendo bactérias, foram então utilizadas para realização das reações de PCR, com intuito de se confirmar a inserção dos fragmentos. A amplificação por PCR foi realizada por 40 ciclos (95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, 72°C por 30 segundos) utilizando-se *primers* que flanqueiam a região multiclonal do vetor PsiCHECK2. As amostras foram aplicadas a gel de agarose 1% (2,5 g agarose, 250 mL Tampão TAE 1x) e visualizadas e fotografadas com auxílio do aparelho Kodak EDAS 290. Após 16 horas, as colônias positivas para o vetor PsiCHECK2+3'UTR foram tocadas com uma ponteira na placa e a ponteira foi colocada em um tubo falcon (15 mL) com 6 mL LB líquido + 6 µL Ampicilina (200 ng/µL) para o crescimento das bactérias. Os tubos falcons foram incubados por 16 horas, a 37°C, 230 rpm. Então, os vetores PsiCHECK2+3'UTR foram purificados utilizando-se o kit *illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare).

Para confirmar a sequência dos fragmentos clonados procederam-se reações de sequenciamento independentes nas duas direções (*sense* e *anti-sense*). Os vetores foram enviados à *facility* de sequenciamento instalada no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal) onde as amostras foram sequenciadas na plataforma HiScan^{TMSQ} (Illumina).

3.4.5. Transfecção em células HEK293T em cultivo

Para os experimentos de transfecção foram utilizadas as células HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293T cells*), derivadas dos rins de embrião humano (Thermo Fisher Scientific). As células HEK293T foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich), enriquecido com 10% soro bovino fetal (FBS, Invitrogen) inativado por aquecimento (30 minutos, a 56°C) e Penicilina/Estreptomicina (5000 U/mL e 5000 µg/mL, respectivamente), a 37°C e 5% CO₂.

No dia anterior à transfecção, as células HEK293T foram semeadas em placas de 24 poços (0,5x10⁵ células/poço). Então, as células HEK293T foram co-transfectadas com

200 ng/poço do vetor PsiCHECK2 (contendo ou não as 3'UTRs candidatas), 40 pmol/poço de miR-34 mimético ou sequência controle (outro miRNA mimético) usando 0,75 µL/poço de FuGENE® 6 Transfection Reagent (Promega) de acordo com instruções do fabricante. Para cada gene, três condições experimentais foram testadas: 1) apenas o vetor, contendo o fragmento a ser investigado, foi transfectado; 2) o vetor e o miRNA mimético; 3) o vetor e o miRNA controle (Figura 3). Após 24 horas, a solução de transfecção foi removida e passadas 48 h, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e lisadas em 300 µL Passive Lysis Buffer (Promega) em temperatura ambiente por 10 min, 200 rpm. Dez microlitros do lisado celular foram transferidos para placas de 96 poços (Perkin Elmer). A atividade das luciferases do vaga-lume e da Renilla foram medidas utilizando-se o *kit Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Foram adicionados 50 µL *luciferase assay reagent II* (LAR II) a cada poço e a atividade da luciferase do vaga-lume foi medida através do luminômetro *FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader*. Na sequência, 50 µL do reagente *Stop&Glo* foi aplicado a cada poço e a atividade da luciferase da Renilla foi obtida. Uma vez que a luciferase do vaga-lume não é perturbada pela inserção de fragmentos espera-se que sua luminescência seja constante independentemente da condição experimental. Assim, a expressão da luciferase do vaga-lume serviu de controle da transfecção do vetor. Por sua vez, a atividade da luciferase da Renilla é diretamente afetada pela regulação pós-transcricional do miRNA, uma vez que, este pode ou não alvejar a sequência 3'UTR do gene investigado transcrito juntamente com o gene da Renilla. A razão matemática entre as atividades das luciferase da Renilla e do vaga-lume (Renilla/vaga-lume) foi calculada para cada experimento. No caso, da razão se manter constante em todas as condições de experimento, o sítio de ligação testado não é real. No entanto, se a razão for menor na presença do miRNA investigado, conclui-se que houve ligação deste miRNA no sítio predito.

A análise estatística dos resultados do ensaio de luciferase foi feita sobre os valores da razão Renilla/vaga-lume utilizando-se o *Teste t de Student* ($p < 0,05$), no *software R* (versão 3.2.3) para identificar aqueles resultados que apresentam diferenças estatísticas.

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

3.5. Perfis de expressão dos miRNAs e genes codificadores durante o desenvolvimento

Para identificação dos perfis de expressão do gene *inr2* e do miRNA miR-34 utilizamos o mesmo cDNA usado para validação das interações miRNA-mRNA envolvidas na metamorfose de *A. mellifera* pelo ensaio da luciferase, como previamente explicados no item 3.4.2 e item 3.4.3.

3.5.1. Análise de expressão gênica

A análise de expressão do gene codificador de proteína *inr2* e do miRNA miR-34 foi realizadas por meio de RT-qPCR. O gene codificador da proteína ribossomal l32 (RpL32), cuja expressão é constitutiva ao longo do desenvolvimento (Scharlaken *et al.*, 2008), foi utilizado como normalizador das reações de qPCR para o gene *inr2*. Para normalizar a expressão do miR-34, usou-se o U5 snRNA, um componente da maquinaria de 'spliceossomo', e indicado na literatura como tendo expressão constitutiva (Schmittgen *et al.*, 2004). A lista de *primers* utilizados encontra-se na Tabela 4. Os perfis de expressão dos genes codificadores de *chd64*, *Kr-h1* e *ftz-f1* e dos miRNAs miR-252a, miR-252b e miR-281 nas fases L3 até Pw foram investigados em trabalhos anteriores (Hernandes, 2013) e o perfil de expressão de *Usp* realizado na tese de doutorado de Silva,

2012). Esses resultados foram retomados para que novas análises e comparações fossem feitas. O perfil de expressão de *EcR* ao longo do desenvolvimento de operárias *A. mellifera* não foi investigado nesse trabalho, uma vez que tais dados já são conhecidos da literatura (Mello *et al.*, 2014).

Tabela 4: Informações sobre os *primers* desenhados para esse estudo. O *primer* reverso dos miRNAs corresponde ao fornecido pelo kit NCode, com sequência não informada.

<i>Locus</i>	Código do <i>primer</i>	Sequência 5' -> 3'	Tamanho do fragmento amplificado
RpL32	RpL32-F	CGTCATATGTTGCCAACTGGT	150 pb
	RpL32-R	TTGAGCACGTTCAACAATGG	
U5 snRNA	U5-F	CTCTGGTTTCCCTTCAAATC	74 pb
	U5-R	ATCAATTGTTCCCCTCCACG	
<i>inr2</i>	<i>inr2</i> -F	GGGAAGAACATCGTGAAGGA	171 bp
	<i>inr2</i> -R	CATCACGAGCAGCGTGTACT	
miR-34	miR-34-F	TGGCAGTGTTGTTAGCTGGTTG	~ 45 pb
miR-252a	miR-252a-F	ATAAGTACTAGTGCCGCAGGAG	~ 45 pb
miR-252b	miR-252b-F	TTAAGTAGTAGTGTCGTAGATGA	~ 45 pb
miR-281	miR-281-F	TGTCATGGAGTTGCTCTCTTTGT	~ 45 pb

Para amplificação por qPCR foi utilizado o protocolo do reagente *SYBR® Green* (Applied Biosystems), conforme explicado no item 3.2.5. Os dados foram transferidos para planilhas eletrônicas do *Microsoft Excel* (*Microsoft Windows*), no qual foram feitos gráficos. O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) foi utilizado para as análises de expressão relativa.

3.6. Reconstrução de redes parciais de interações preditas, proteína-proteína, na metamorfose de *A. mellifera* e *D. melanogaster*

A informação sobre as interações proteína-proteína (PPIs) envolvendo Chd64, Kr-h1, *EcR*, ftz-f1, INR2, USP foi recuperada da base de dados BioGRID (v. 3.2.103, Stark *et al.*, 2011), que contém interações proteína-proteína validadas e preditas. As interações proteína-proteína envolvendo as proteínas de interesse foram utilizadas na construção de uma rede por meio da plataforma Cytoscape (<http://cytoscape.org/>), considerando apenas

proteínas conservadas em *D. melanogaster* e *A. mellifera*. A análise funcional da rede foi conduzida a partir da ferramenta ClueGO (Bindea et al., 2009), um aplicativo disponível na plataforma Cytoscape. Tal análise funcional identificou os termos de processos biológicos do Gene Ontology (GO) (<http://geneontology.org/>) significativos para as proteínas que compõem a rede.

4. RESULTADOS

4.1. Grau de conservação dos miRNAs potencialmente envolvidos na metamorfose

Objetivando-se investigar as relações de conservação entre os miRNAs de *A. mellifera*, selecionados neste trabalho (miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281), e os mesmos miRNAs em outros insetos, realizamos alinhamentos múltiplos de suas sequências. O alinhamento revelou alto grau de conservação dos miRNAs nas diferentes espécies (Figura 4). De forma geral, o alinhamento entre diferentes taxa nos mostrou que miR-34 apresenta-se altamente conservado em invertebrados e vertebrados, miR-252 é conservado em insetos e vermes, enquanto miR-281 parece ser específico de insetos. Destacamos também que miR-252, que apresenta duas formas (**a** e **b**) em *A. mellifera* apresenta apenas uma forma nos demais organismos, exceto por *T. castaneum* que também possui formas **a** e **b**.

Figura 4: Alinhamento múltiplo das sequências dos miR-34, miR- 252a, miR-252b, miR-281 em diferentes espécies de animais. As colunas em cinza representam o grau de conservação de cada base que compõe o miRNA nas diferentes espécies. As letras maiúsculas correspondem às bases que foram conservadas em todas as espécies analisadas (*). Legenda das espécies - aee: *Aedes aegypti*; ame: *Apis mellifera*; bmo: *Bombyx mori*; cel: *Caenorhabditis elegans*; dme: *Drosophila melanogaster*; dre: *Danio rerio*; hsa: *Homo sapiens*; mmu: *Mus musculus*; tca: *Tribolium castaneum*; xtr: *Xenopus tropicalis*.

4.2. Avaliação dos efeitos do tratamento com os hormônios HJ e 20E sobre a expressão de miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281

Os dados a seguir representam as médias de expressão para cada um dos miRNAs avaliados após o tratamento hormonal. O tratamento foi realizado na fase de PP2, e a expressão dos miRNAs foram avaliados 24h depois, o que corresponderia a fase PP3 (muda metamórfica). Os miRNAs miR-34 (Figura 5), miR-252a (Figura 6) e miR-281 (Figura 7) apresentaram um aumento significativo na abundância de seus transcritos frente ao tratamento com 20E, mas não frente ao tratamento com HJ (Figuras 5, 6 e 7, respectivamente). Assim como os outros miRNAs, o miR-252b apresentou um aumento significativo na abundância de seus transcritos em resposta ao tratamento com 20E. No entanto, diferentemente dos outros miRNAs, houve aumento significativo na expressão de miR-252b em resposta ao tratamento com HJ quando comparado com os níveis de transcritos observados no tratamento com hexano ($p\text{-value} = 0.02$); quando comparado com os níveis observados no controle sem tratamento, este aumento não é significativo ($p\text{-value} = 0.35$; Figura 8).

Dessa forma, todos os miRNAs estudados respondem ao tratamento com um dos hormônios mais importantes da metamorfose, o 20E, havendo também indícios da modulação de miR-252b frente ao tratamento com HJ.

Figura 5: Expressão relativa do miR-34 em operárias de *Apis mellifera* na fase de pré-pupa (PP3), submetidas a tratamento com hormônio juvenil (HJ) e com 20-hidroxiecdisona (20E). Abelhas sem tratamento (ST) e tratadas com hexano foram utilizadas como controles para o tratamento com HJ. E abelhas sem tratamento (ST) e tratadas com salina foram utilizadas como controles para o tratamento com 20E. A expressão foi mensurada 24 horas após os tratamentos. A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-34. Test-t, considerando $p < 0,05$.

Figura 6: Expressão relativa do miR-252a em operárias de *Apis mellifera* na fase de pré-pupa (PP3), submetidas a tratamento com hormônio juvenil (HJ) e com 20-hidroxiecdisona (20E). Abelhas sem tratamento (ST) e tratadas com hexano foram utilizadas como controles para o tratamento com HJ. E abelhas sem tratamento (ST) e tratadas com salina foram utilizadas como controles para o tratamento com 20E. A expressão foi mensurada 24 horas após os tratamentos. A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-252a. Test-t, considerando $p < 0,05$.

Figura 7: Expressão relativa do miR-281 em operárias de *Apis mellifera* na fase de pré-pupa (PP3), submetidas a tratamento com hormônio juvenil (HJ) e com 20-hidroxiecdisona (20E). Abelhas sem tratamento (ST) e tratadas com hexano foram utilizadas como controles para o tratamento com HJ. E abelhas sem tratamento (ST) e tratadas com salina foram utilizadas como controles para o tratamento com 20E. A expressão foi mensurada 24 horas após os tratamentos. A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-281. Test-t, considerando $p < 0,05$.

Figura 8: Expressão relativa do miR-252b em operárias de *Apis mellifera* na fase de pré-pupa (PP3), submetidas a tratamento com hormônio juvenil (HJ) e com 20-hidroxiecdisona (20E). Abelhas sem tratamento (ST) e tratadas com hexano foram utilizadas como controles para o tratamento com HJ. E abelhas sem tratamento (ST) e tratadas com salina foram utilizadas como controles para o tratamento com 20E. A expressão foi mensurada 24 horas após os tratamentos. A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-252b. Test-t, considerando $p < 0,05$.

4.3. Predição das interações miRNA-mRNAs conservadas entre *A. mellifera* e *D. melanogaster* envolvidas na metamorfose

Como ponto de partida, geramos uma rede de interações miRNA-mRNAs preditas em *A. mellifera* e *D. melanogaster* (Figura 9). A rede de interações putativas miRNA-mRNAs mostra que os receptores de ecdisteroides *EcR* e *Usp* e o fator de transcrição *ftz-fl*, envolvidos nas vias de ação dos hormônios 20E e HJ (Dubrovsky, 2005; revisado por Jindra *et al.*, 2013), são os principais alvos dos miRNAs selecionados, apresentando sítios de ligação para os quatro miRNAs estudados (miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281). Observamos ainda que todos os seis genes (*chd64*, *Kr-h1*, *ftz-fl*, *EcR*, *inr2* e *Usp*), presentes na rede são alvos do miR-34.

Figura 9: Representação gráfica das interações preditas, miRNA-mRNA. A busca pelos sítios de ligação dos miRNAs na 3'UTR dos genes codificadores de proteínas foi realizada usando o programa RNAHybrid (Rehmsmeier *et al.*, 2004; Kruger & Rehmsmeier, 2006). A sequência dos miRNAs foi extraída do miRBase (versão 21) e as sequências das 3'UTRs foram recuperadas da versão 3.2 do genoma de abelhas (Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006)). Os nós em azul representam os genes-alvo; os nós em vermelho representam os miRNAs investigados nesse trabalho; as arestas indicam interação entre o miRNA e seu alvo putativo.

4.4. Validação das interações miRNA-mRNAs envolvidas na metamorfose de *A. mellifera* pelo ensaio da luciferase

4.4.1 Sítios de ligação preditos para os miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 nas 3'UTRs dos genes envolvidos na metamorfose de *A. mellifera*

Para verificar se os miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 regulam os alvos preditos em nossa análise *in silico*, as regiões que contêm sítios de ligação putativos foram amplificadas e inseridas no vetor para uso no ensaio da luciferase. O fato de termos amplificado fragmentos da 3'UTR dos genes investigados por RT-PCR valida algumas das sequências 3'UTRs usadas nas predições de sítios de ligação para os miRNAs e os resultados da amplificação desses fragmentos estão destacados nas Figuras 10-16. Dentre as 3'UTRs avaliadas, encontramos vários sítios de ligação dos miRNAs miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281.

A predição de sítios de ligação para os miRNAs selecionados na 3'UTR do gene *Kr-h1* identificou apenas um sítio de ligação para o miR-34 (Figura 10). Para o gene

chd64, identificou-se dois sítios do miR-34 (sítio 2 apresenta uma *seed* conservada de 1-8 nt), um sítio de miRNAs miR-252a e um sítio de miR-252b (Figura 11). Por sua vez, encontrou-se para o gene *ftz-fl* três sítios preditos para o miR-34 (Figura 12), dentre os quais o sítio 1 que foi previamente validado em trabalhos anteriores desse mesmo grupo de pesquisa (Freitas, 2014). Ainda para o gene *ftz-fl* encontrou-se três sítios para o miR-252a, dois para o miR-252b (com *seed* conservada no sítio 1 de 1-14 nt) e dois para o miR-281 (com *seed* 3-9 nt e 1-6 nt, respectivamente para sítios 1 e 2) (Figura 13). Para o gene *Usp* encontrou-se dois sítios para o miR-34 com *seed* de 2-11 nt e 1-10 nt. Identificou-se dois sítios para o miR-252a (com *seed* no sítio 1 de 1-6 nt), dois sítios para o miR-252b e um para o miR-281, ambos sem *seed* conservada (Figura 13). O gene *EcR* é o que mais apresenta sítios preditos. Foram encontrados 5 sítios para o miR-34 (sítio 1 e o sítio 2 com *seed* de 3-10 nt e 2-8 nt, respectivamente) e três sítios sem *seed* conservada do miR-252a (Figura 14). Nesse mesmo gene, encontrou-se três sítios para o miR-252b (sítio 2 com *seed* de 1-6 nt) e três sítios para o miR-281 (sítio 3 com *seed* de 1-8 nt) (Figura 15). Finalmente, para o gene *inr2* identificou-se dois sítios preditos para o miR-34 e um sítio para o miR-281, ambos sem *seed* conservada (Figura 16).

Figura 10: Representação do sítio de ligação predito para o miR-34 na 3'UTR do gene *Kr-h1* de *A. mellifera* pelo programa RNAhybrid. A região codificadora do gene *Kr-h1* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para o miR-34 (quadrado preto menor), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. O fragmento amplificado por RT-PCR e o controle negativo estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura. Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

Destacamos que, o fragmento **B** da região 3'UTR do gene *chd64* (Figura 11), bem como o fragmento **A** da região 3'UTR do gene *EcR* (Figuras 13-14) tiveram insucesso no processo de clonagem e, portanto, não seguiram os passos subsequentes do ensaio da luciferase.

Figura 11: Representação dos sítios de ligação preditos para o miR-34, miR-252a e miR-252b na 3'UTR do gene *chd64* de *A. mellifera* pelo programa RNAhybrid. A região codificadora do gene *chd64* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para os miRNAs (quadrados pretos menores), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. Os dois fragmentos amplificados por RT-PCR e seus respectivos controles negativos estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura: A – corresponde ao fragmento de 207 nt; B – corresponde ao fragmento de 350 nt. Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

Figura 12: Representação dos sítios de ligação preditos para o miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 na 3'UTR do gene *ftz-f1* de *A. mellifera* pelo programa RNAhybrid. A região codificadora do gene *ftz-f1* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleótidos dos sítios de ligação para os miRNAs (quadrados pretos menores), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. Os quatros fragmentos amplificados por RT-PCR e seus respectivos controles negativo estão mostrados na

imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura: A – corresponde ao fragmento do primer de 225 nt; B – corresponde ao fragmento de 183 nt; C – corresponde ao fragmento de 207 nt; D – corresponde ao fragmento de 380 nt. O quadrado em cinza menor representa o miR-34 já validado (Freitas, 2014). Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

Figura 13: Representação dos sítios de ligação preditos para o miR-34 e miR-252a na 3'UTR do gene *EcR* de *A. mellifera* pelo programa RNAhybrid. A região codificadora do gene *EcR* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para os miRNAs (quadrados pretos menores), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. Os dois fragmentos amplificados por RT-PCR e seus respectivos controles negativo estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura: A – corresponde ao fragmento de 196 nt; B – corresponde ao

fragmento de 287 nt. Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

Figura 14: Representação dos sítios de ligação preditos para o miR-252b e miR-281 na 3'UTR do gene *EcR* de *A. mellifera* pelo programa RNAhybrid. A região codificadora do gene *EcR* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para os miRNAs (quadrados pretos menores), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. Os três fragmentos amplificados por RT-PCR e seus respectivos controles negativo estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura: A – corresponde ao fragmento de 196 nt; B – corresponde ao fragmento de 287 nt; C – corresponde ao fragmento de 231 nt. Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

Figura 15: Representação dos sítios de ligação preditos para o miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 na 3'UTR do gene *Usp* de *A. mellifera* pelo programa RNAhybrid. A região codificadora do gene *Usp* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para os miRNAs (quadrados pretos menores), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. Os três fragmentos amplificados por RT-PCR e seus respectivos controles negativo estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura: A – corresponde ao fragmento de 206 nt; B – corresponde ao fragmento de 202 nt; C – corresponde ao

fragmento de 217 nt. Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

Figura 16: Representação dos sítios de ligação preditos para o miR-34 e miR-281 na 3'UTR do gene *inr2* de *A. mellifera* pelo programa RNAhybrid. A região codificadora do gene *inr2* está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para os miRNAs (quadrados pretos menores), numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR. As setas indicam a porção da 3'UTR que foi amplificada por RT-PCR. Os dois fragmentos amplificados por RT-PCR e seus respectivos controles negativo estão mostrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura: A – corresponde ao fragmento de 189 nt; B – corresponde ao fragmento de 233 nt. Pareamentos Watson-Crick são representados por barras (|) e pareamento G:U por dois pontos (:).

4.4.2. miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 se ligam diretamente a genes envolvidos na metamorfose de *A. mellifera*

O ensaio da luciferase consistiu em transfectar células HEK293T com vetor PsiCHECK2 + 3'UTR e moléculas miméticas de miRNA. Na condição de o sítio de ligação para o miRNA ser verdadeiro, há menos síntese da proteína luciferase e, portanto, menor intensidade de luminescência. O bom funcionamento do sistema desenvolvido para o ensaio de luciferase foi verificado com o uso do vetor contendo a sequência controle (controle positivo). A sequência controle consistia em uma sequência

complementar aos respectivos miRNAs transfectados: miR-34 (Figura 17-A); miR-252a (Figura 18-A); miR-252b (Figura 19-A); miR-281 (Figura 20-A). As moléculas miméticas dos miRNAs foram capazes de reconhecer a sequência controle e causar a diminuição da síntese da proteína da atividade da luciferase e, consequentemente, a diminuição da intensidade da luminescência produzida: miR-34 (Figura 17-B); miR-252a (Figura 18-B); miR-252b (Figura 19-B); miR-281 (Figura 20-B). Uma vez verificada a eficácia das moléculas miméticas em reconhecerem um sítio de ligação perfeito, bem como o funcionamento do ensaio da luciferase, realizamos os experimentos com os vetores PsiCHECK2 contendo fragmentos da 3'UTR dos genes *chd64*, *Kr-h1*, *ftz-fl*, *EcR*, *inr2*, *Usp* (Figura 17 - 20).

Nossos resultados validaram os sítios preditos para miR-34 nas regiões 3'UTR dos genes *Kr-h1* (Figura 17-C), *chd64* sítio 1 (Figura 17-D) e *inr2* sítios 1 (Figura 17-G) e sítio 2 (Figuras 17-H). No entanto, os sítios preditos para os genes *ftz-fl* sítios 2 e 3 (Figura 17-E), *EcR* sítios 4 e 5 (Figura 17-F) e *Usp* sítio 1 (Figura 17-I) e sítio 2 (Figura 17-J) não responderam à presença do miR-34 mimético, sugerindo que esses sítios não sejam funcionais.

Validamos também os sítios preditos para miR-252a nas regiões 3'UTR dos genes *ftz-fl* sítio 1 (Figura 18-C) e *EcR* sítio 3 (Figura 18-F). Os sítios preditos para os genes *ftz-fl* sítio 2 (Figura 18-D) e sítio 3 (Figura 18-E), e o gene *Usp* sítio 1 (Figura 18-G) e sítio 2 (Figura 18-H) não responderam à presença do miR-252a mimético, sugerindo que esses sítios não sejam funcionais.

Também pudemos provar a ligação de miR-252b nos sítios preditos nas regiões 3'UTR dos genes *chd64* sítio 1 (Figura 16-C), *ftz-fl* sítio 1 (Figura 19-D) e *EcR* sítio 2 (Figura 19-F). Destacamos ainda que o sítio 2 do gene *ftz-fl* é, provavelmente, alvo do miR-252b (Figura 19-E). Neste caso, contudo constatamos também interação do fragmento com o miRNA controle, ocasionando uma queda na luminescência da luciferase. Quanto ao sítio 2 do gene *Usp*, este sofreu um aumento da luminescência ao invés de queda (Figura 19-I). Os sítios preditos para os genes *EcR* sítio 3 (Figura 19-G) e *Usp* sítio 1 (Figura 19-H) não responderam à presença do miR-252b mimético, sugerindo que esses sítios não sejam funcionais.

Figura 17: Validação dos sítios de ligação preditos para o miR-34 na 3'UTR pelo ensaio da luciferase. Mudanças na razão da atividade da luciferase quimérica da Renilla (Ren) e da luciferase do vaga-lume (VL). A luciferase quimérica Ren está ligada a 3'UTR dos genes-alvo que contém os sítios de ligação preditos para o miR-34. Representação esquemática do controle positivo, pareamento perfeito com a sequência do miR-34 (A). O controle positivo (B) e as 3'UTRs dos genes *Kr-h1* (C), *chd64* (D) e *inr2* (G, H) foram

diretamente reguladas pelo miR-34. A 3'UTR dos genes *ftz-f1* (E), *EcR* (F) e *Usp* (I, J) não foram reguladas pelo miR-34. Test-t, *: $p < 0,05$.

Figura 18: Validação dos sítios de ligação preditos para o miR-252a na 3'UTR pelo ensaio da luciferase. Mudanças na razão da atividade da luciferase quimérica da Renilla (Ren) e da luciferase do vaga-lume (VL). A luciferase quimérica Ren está ligada a 3'UTR dos genes-alvo que contém os sítios de ligação preditos para o miR-252a. Representação esquemática do controle positivo, pareamento perfeito com a sequência do miR-252a (A). O controle positivo (B) e as 3'UTRs dos genes *ftz-f1* (C) e *EcR* (F) foram diretamente reguladas pelo miR-34. A 3'UTR dos genes *ftz-f1* (D, E) e *Usp* (G, H) não foram reguladas pelo miR-252a. Test-t, *: $p < 0,05$.

Figura 19: Validação dos sítios de ligação preditos para o miR-252b na 3'UTR pelo ensaio da luciferase. Mudanças na razão da atividade da luciferase quimérica da Renilla (Ren) e da luciferase do vaga-lume (VL). A luciferase quimérica Ren está ligada a 3'UTR dos genes-alvo que contém os sítios de ligação preditos para o miR-252b. Representação esquemática do controle positivo, pareamento perfeito com a sequência do miR-252b (A). O controle positivo (B) e as 3'UTRs dos genes *chd64* (C), *ftz-f1* (D, E) e *EcR* (F) foram diretamente reguladas pelo miR-252b. A 3'UTR dos genes *EcR* (G) e *usp* (H, I) não foram reguladas pelo miR-252b. Test-t, *: $p < 0,05$, miRNA mimético disernem de ambos os controles, mas controles não disernem entre si; **: $p < 0,05$, todos os valores disernem entre si.

Por fim, confirmamos a existência dos sítios de miR-281 nas regiões 3'UTR do gene *ftz-f1* sítio 1 (Figura 20-C), *EcR* sítio 2 ou 3 (Figura 20-E) e *Usp* sítio 1 (Figura 20-G). No entanto, os sítios preditos para os genes *ftz-f1* sítio 2 (Figura 20-D) e *inr2* sítio 1

(Figura 20-F) não responderam à presença do miR-281 mimético, sugerindo que esses sítios não sejam funcionais.

Figura 20: Validação dos sítios de ligação preditos para o miR-281 na 3'UTR pelo ensaio da luciferase. Mudanças na razão da atividade da luciferase quimérica da Renilla (Ren) e da luciferase do vaga-lume (VL). A luciferase quimérica Ren está ligada a 3'UTR dos genes-alvo que contém os sítios de ligação preditos para o miR-281. Representação esquemática do controle positivo, pareamento perfeito com a sequência do miR-281 (A). O controle positivo (B) e as 3'UTRs dos genes *ftz-f1* (C), *EcR* (E) e *Usp* (G) foram diretamente reguladas pelo miR-281. A 3'UTR dos genes *ftz-f1* (D) e *inr2* (F) não foram reguladas pelo miR-281. Test-t, *: $p < 0,05$.

4.5 Perfis de expressão dos miRNAs e genes codificadores durante o desenvolvimento

Investigamos os perfis de expressão dos miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 e seus respectivos alvos. Apresentamos ainda, na Figura 21, o perfil de expressão desses quatro miRNAs ao longo do desenvolvimento de *A. mellifera* contrastados com títulos de HJ circulantes na hemolinfa. Podemos observar que os perfis de expressão flutuam de forma oposta aos títulos de HJ, dando maior destaque ao efeito na expressão dos miRNAs quando ocorre a queda no HJ nas fases larvais L5 e aumento na fase pré-pupa PP1.

Figura 21: Expressão relativa do miR-34, miR-252a, miR-252b e do miR-281 durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pré-pupa (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão dos microRNAs. A curva de hormônio juvenil (HJ) não está em escala, porém representa seu perfil no desenvolvimento de operárias (Hartfelder & Engels, 1998).

Destacamos a seguir os perfis de expressão dos miRNAs contrastados com seus respectivos genes alvo baseados na rede de interação putativa miRNA-mRNA, durante diferentes fases do desenvolvimento (L3-L4 a Pw). Como já relatado, os perfis de expressão dos genes *chd64*, *Kr-h1* e *ftz-f1* e dos miRNAs miR-252a, miR-252b e miR-281 nas fases L3 até Pw foram investigados em Hernandez (2013), o perfil de expressão de *Usp* em Silva (2012) e o perfil de expressão de *EcR* foram investigados em Mello e

colaboradores (2014). As Figuras 22 a 26 apresentam os perfis de expressão contrastados do miR-34 com gene *Kr-h1*, *chd64*, *ftz-f1*, *inr2* e *Usp*, respectivamente. As Figuras 27 e 28, por sua vez, apresentam os perfis de expressão contrastados do miR-252a com gene *ftz-f1* e *Usp*, respectivamente. As Figuras de 29 a 31 apresentam os perfis de expressão contrastados do miR-252b com gene *ftz-f1*, *inr2* e *Usp*, respectivamente. E as Figuras de 32 a 34 apresentam os perfis de expressão contrastados do miR-281 com gene *chd64*, *ftz-f1* e *Usp*, respectivamente.

Figura 22: Expressão relativa do miR-34 e do gene *Kr-h1* durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pré-pupa (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-34 e a expressão de *rlp32* foi utilizada como normalizador na expressão do gene *Kr-h1*.

Figura 23: Expressão relativa do miR-34 e do gene *chd64* durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3),

pré-pupa (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-34 e a expressão de *rlp32* foi utilizada como normalizador na expressão do gene *chd64*.

Figura 24: Expressão relativa do miR-34 e do gene *ftz-f1* durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pré-pupa (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-34 e a expressão de *rlp32* foi utilizada como normalizador na expressão do gene *ftz-f1*.

Figura 25: Expressão relativa do miR-34 e do gene *inr2* durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pré-pupa (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-34 e a expressão de *rlp32* foi utilizada como normalizador na expressão do gene *inr2*.

Figura 26: Expressão relativa do miR-34 e do gene *Usp* durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pré-pupa (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-34 e a expressão de *rlp32* foi utilizada como normalizador na expressão do gene *Usp*.

Figura 27: Expressão relativa do miR-252a e do gene *ftz-f1* durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pré-pupa (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-252a e a expressão de *rlp32* foi utilizada como normalizador na expressão do gene *ftz-f1*.

Figura 28: Expressão relativa do miR-252a e do gene *Usp* durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pré-pupa (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-252a e a expressão de *rlp32* foi utilizada como normalizador na expressão do gene *Usp*.

Figura 29: Expressão relativa do miR-252b e do gene *chd64* durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pré-pupa (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-252b e a expressão de *rlp32* foi utilizada como normalizador na expressão do gene *chd64*.

Figura 30: Expressão relativa do miR-252b e do gene *ftz-f1* durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pré-pupa (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-252b e a expressão de *rlp32* foi utilizada como normalizador na expressão do gene *ftz-f1*.

Figura 31: Expressão relativa do miR-252b e do gene *Usp* durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pré-pupa (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-252b e a expressão de *rlp32* foi utilizada como normalizador na expressão do gene *Usp*.

Figura 32: Expressão relativa do miR-281 e do gene *ftz-f1* durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pré-pupa (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-281 e a expressão de *rlp32* foi utilizada como normalizador na expressão do gene *ftz-f1*.

Figura 33: Expressão relativa do miR-281 e do gene *inr2* durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pré-pupa (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-281 e a expressão de *rlp32* foi utilizada como normalizador na expressão do gene *inr2*.

Figura 34: Expressão relativa do miR-281 e do gene *Usp* durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pré-pupa (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-281 e a expressão de *rlp32* foi utilizada como normalizador na expressão do gene *Usp*.

4.6. Reconstrução de redes parciais de interações preditas, proteína-proteína, na metamorfose de *A. mellifera* e *D. melanogaster*

Para melhor compreender como os produtos dos genes candidatos a reguladores da metamorfose se relacionam e com outras proteínas, foi gerada uma rede baseada em interações proteína-proteína (PPI) conservadas em *A. mellifera* e *D. melanogaster* (Figura 35). Nesta figura são apresentados as proteínas (em verde) codificadas pelos genes selecionados nesse trabalho (*ch64*, *EcR*, *Usp*, *ftz-f1* e *inr2*), destacando um grande número de interações com outras proteínas.

Figura 35: Rede de interações proteína-proteína relacionadas à metamorfose de *Apis mellifera* que apresentam ortólogos recíprocos no genoma de *Drosophila melanogaster*. Os nós em verde representam as proteínas envolvidas na metamorfose de abelhas e investigadas neste trabalho; os nós em azul representam as demais proteínas que interagem com as proteínas selecionadas.

Por meio da análise com a ferramenta ClueGO (disponível na plataforma Cytoscape), observamos que os termos *Gene Ontology* mais enriquecidos presentes em nossa rede são aqueles relacionados à resposta celular ao estímulo hormonal, regulação positiva de processos metabólicos, regulação da fosforilação, desenvolvimento do sistema nervoso periférico e regulação da morte celular programada (Figura 36). Quanto ao gene *Kr-h1*, a proteína por ele codificada não está presente na rede PPI por não apresentar interações diretas com as demais proteínas da rede.

Figura 36: Termos enriquecidos em análise de *Gene Ontology* (ClueGo ferramenta disponível na plataforma Cytoscape), realizada a partir da lista de proteínas presentes na rede de interação proteína-proteína para os genes relacionados à metamorfose de *Apis mellifera*.

5. DISCUSSÃO

Muito além de servirem como molde para síntese proteica, os RNAs desempenham uma grande variedade de papéis estruturais, catalíticos e regulatórios. Nos últimos anos estas moléculas têm se destacado por sua atuação em mecanismos regulatórios pós-transcricionais, de tal modo que RNAs de diferentes comprimentos são conhecidos por intermediar o silenciamento da expressão gênica (Garibay & Jarquin, 2014). A descoberta de tais mecanismos, ao mesmo tempo em que trouxe luz a muitas questões regulatórias, tornou o fenômeno da regulação gênica muito mais complexo e de difícil elucidação. Neste trabalho, buscamos validar interações putativas miRNA-mRNAs que apresentam fortes indícios de controlar um dos mais belos eventos biológicos conhecidos, a metamorfose em insetos holometábolos. Em nosso *design* experimental utilizamos larvas e pupas de abelhas operárias *A. mellifera* obtidas de colmeias em condições naturais. Nossa abordagem nos permitiu validar algumas das interações por nós sugeridas, bem como nos permitiu descartar outras interações propostas. Os resultados obtidos serão discutidos, em conjunto, nos parágrafos que se seguem.

Elaboramos uma rede putativa de interação entre genes codificadores de proteínas e miRNAs previamente estudados por nosso grupo de pesquisa e conhecidos na literatura por terem relação com o processo de metamorfose. Essa rede reflete as interações físicas previstas entre as moléculas dos miRNAs miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 e os transcritos dos genes *chd64*, *Kr-h1*, *ftz-f1*, *EcR*, *inr2* e *Usp*, interações, até então desconhecidas em *A. mellifera*.

Elaboramos ainda uma rede de interações proteína-proteína (PPI). Tal rede nos forneceu um amplo panorama de interações comprovadamente validadas entre as proteínas codificadas pelos seis genes por nós selecionados (*chd64*, *Kr-h1*, *ftz-f1*, *EcR*, *inr2* e *Usp*) e quaisquer outras proteínas conhecidas. As mudanças nos planos corporais provocadas pela metamorfose não são apenas um ajuste às necessidades do desenvolvimento, mas servem também como uma adaptação ambiental a novos hábitos e recursos alimentares (Truman & Riddiford, 1999). A metamorfose é, assim, um conjunto integrado de processos de desenvolvimento controlados por uma hierarquia de transcrição que coordena a ação de centenas de genes (White *et al.*, 1999). De uma perspectiva genética global, sobre o controle destes genes podemos destacar processos como: destruição de tecidos larvais por meio de morte celular programada (apoptose);

diferenciação e reestruturação celular/tecidual para formar os apêndices adultos; remodelamento neuronal do sistema nervoso; e controle hormonal que em última estância leva ao fenótipo adulto (White *et al.*, 1999; Goodisman *et al.*, 2005; Ou *et al.*, 2014).

Nossa rede PPI aponta uma complexa gama de interações, integrando uma grande quantidade de proteínas relacionadas a diferentes processos biológicos. A análise de *Gene Ontology* não surpreendentemente nos apontou o enriquecimento de termos ligados a: resposta celular ao estímulo hormonal, regulação positiva de processos metabólicos, regulação da fosforilação, desenvolvimento do sistema nervoso periférico e regulação da morte celular programada. Tais processos, são portanto, fortemente relacionados à metamorfose (White *et al.*, 1999; Goodisman *et al.*, 2005; Ou *et al.*, 2014) e, logo, dão suporte a nossa escolha dos genes para investigação nesse trabalho. Quanto a rede PPI gerada, nos cabe ainda ressaltar que a proteína codificada pelo gene *Kr-h1* não se conectou à rede principal aqui apresentada. Este fato pode ter se dado pela real ausência de interações entre estas proteínas, contudo, o mais provável é que as proteínas e/ou interações que fazem a ponte entre uma rede e outra não sejam ainda conhecidas. Isto demonstra a importância de estudos que busquem desvendar os passos moleculares da metamorfose.

Buscamos também conhecer melhor a estrutura e conservação dos miRNAs selecionados neste trabalho. O alinhamento múltiplo das sequências de miRNAs nos trouxe informações sobre a evolução e importância destas moléculas em especial. *A. mellifera* apresenta apenas um membro da família do miR-34 e os vertebrados apresentam três membros (miR-34a, miR-34b, miR-34c), sendo o miR-34a ortólogo ao miR-34 de abelhas. O alinhamento dos ortólogos do miR-34 de *A. mellifera* revelou um elevado grau de conservação nas espécies analisadas, sendo as regiões de 2 a 9 e 12 a 20 do miRNA idênticas entre as espécies. O grau de conservação desse miRNA estende-se além de hexápodos, estando conservado em vermes como *Caenorhabditis elegans* e vertebrados como *Xenopus tropicalis*, *Danio rerio*, *Mus musculus* e *Homo sapiens*. A conservação filogenética dessa sequência assinala para a importância biológica dessa molécula em eventos ligados a progressão do desenvolvimento (Axtell, 2008). O miR-252-5p, por sua vez, apresenta duas isoformas: miR-252a-5p e miR-252b-5p. Tal miRNA foi identificado não apenas em insetos, mas também no verme *C. elegans*. Finalmente, dentre as espécies investigadas apenas insetos possuem miR-281-3p. O maior grau de conservação desse miRNA dentro do grupo de insetos pode denotar a importância dessa sequência em

cumprir processos biológicos conservados, tal conclusão necessita, contudo de mais investigações.

Ainda em relação aos miRNAs selecionados em nosso trabalho, investigamos os seus perfis de expressão ao longo do desenvolvimento de operárias *A. mellifera*. Os miRNAs miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 apresentaram perfis de expressão semelhantes entre si. Apresentam uma baixa expressão nas fases larvais iniciais, e um aumento no 5º estágio larval (L5). Seus níveis, então, diminuem na pré-pupa (PP1), mas voltam a aumentar durante da muda metamórfica (PP3). Um mesmo pico do miR-252 durante a muda metamórfica foi encontrado por Liu *et al.* (2010) no corpo gorduroso de *B. mori*. Comparativamente, esses miRNAs apresentam um padrão oposto aos títulos de HJ circulantes na hemolinfa, indicando um possível mecanismo regulatório em *A. mellifera*. Entraremos agora mais a fundo na discussão do perfil de cada miRNA juntamente com a discussão dos resultados validados pelo ensaio da luciferase, utilizado como abordagem metodológica para verificarmos quais interações preditas eram reais.

É por meio da produção de proteínas e das interações entre elas estabelecidas que os fenótipos são efetivamente produzidos (Griffiths *et al.*, 2000). Dessa forma, a confirmação das interações miRNA-mRNA é importante para a melhor compreensão da regulação da tradução e consequentemente de sistemas biológicos (Lucas & Raikhel, 2013), ou ainda para aplicações práticas como no melhor conhecimento de doenças. Casos em que, por exemplo, entender a regulação de uma proteína carcinogênica por um miRNA é importante para se entender como um câncer pode se desenvolver (Li *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Em nosso estudo, pudemos validar por meio do ensaio da luciferase, interações até então não exploradas entre miRNAs e mRNA possivelmente relacionadas à metamorfose de *A. mellifera*.

Em nosso trabalho, propusemos interações entre o gene do receptor *inr2* e os miR-34 e miR-281. No entanto, validamos apenas dois sítios na 3'UTR do gene *inr2*, ambos para miR-34. Dois receptores do tipo insulina são anotados no genoma de *A. mellifera*, *inr1* e *inr2*, bem como dois peptídeos do tipo insulina, *ilp1* e *ilp2* (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006; Elsik *et al.*, 2014). A expressão dos dois receptores é altamente correlacionada e sofre importantes modulações durante a transição comportamental de *A. mellifera* (Nilsen *et al.*, 2011). A via da insulina/ fator 1 de crescimento do tipo insulina (IGF1), referida como via IIS, é uma via neuroendócrina conservada evolutivamente em todo o reino animal, responsável por controlar uma grande

variedade de processos biológicos como crescimento, amadurecimento, metabolismo energético, reprodução, resistência ao estresse e o tempo de vida (revisado por Russel e Kahn, 2007; Piper *et al.*, 2008). Muitos trabalhos têm focado no papel desta via e seus receptores sobre a diferenciação de castas rainhas e operárias (Azevedo & Hartfelder, 2008) ou sobre os efeitos sobre o polietismo etário (Ament *et al.*, 2008; Ament *et al.*, 2010; Ament *et al.*, 2011; Nilsen *et al.*, 2011) em *A. mellifera*, contudo, poucos trabalhos se propuseram a investigar o papel desta via na metamorfose e mais ainda seu envolvimento com miRNAs dentro desta temática.

MiR-34 apresenta um papel na reprogramação celular (Liu *et al.*, 2012), e também acredita-se ter um papel na metamorfose, uma vez que, sofre alterações temporais durante a transição larva-pupa apresentando redução da sua expressão em *D. melanogaster* (Sempere *et al.*, 2003). Em nosso trabalho, a comparação entre os perfis expressionais de *inr2* e miR-34 ao longo do desenvolvimento parecem demonstrar uma regulação exercida pelo miR-34. De forma que, quedas na abundância deste miRNA contrastam com o aumento de transcritos de *inr2*, como nas fases L4 e L5F1 e também PP1 e PP3. Os perfis indicam também algumas flutuações nos transcritos de *inr2* que não parecem ser reguladas por miR-34, indicando a existência de outros mecanismos regulatórios. Em *Drosophila*, a regulação do crescimento no último estágio larval é extremamente dependente da via IIS (Huang *et al.*, 2011; Mirth & Riddiford, 2007; Mirth & Shingleton, 2012) e HJ (Riddiford *et al.*, 2010). O *cross-talk* entre HJ e peptídeo do tipo insulina (ILP) foi inicialmente proposto por Tatar e colaboradores (2001). Experimentos em *D. melanogaster*, envolvendo mutantes do receptor de insulina (InR) causaram um retardo no desenvolvimento e diminuição dos títulos de HJ, sugerindo que a sinalização por ILP pode regular a síntese de HJ (Tatar *et al.*, 2001). Um ILP pode agir como um hormônio promotor da metamorfose em discos imaginais durante o último estágio larval, por ter um efeito contrário ao do HJ. Assim, o processo de metamorfose é dependente de IIS (Mirth & Riddiford, 2007), não se entende, contudo, como essas interações ocorrem (revisado por Jindra *et al.*, 2013). Pelo nosso conhecimento, é a primeira vez que a regulação do gene *inr2* pelo miR-34 é provada e também sugerida como reguladora da metamorfose em *A. mellifera*.

Nossos resultados confirmaram ainda que a região 3'UTR do gene *Kr-h1* possui um sítio de ligação para o miR-34. Em *D. melanogaster* (Minakuchi *et al.*, 2008), *T. castaneum* (Minakuchi *et al.*, 2009), *Pyrrhocori apterus* (Konopova *et al.*, 2011), *Blatella*

germanica (Lozano & Belles 2011) e *B. mori* (Kayukawa *et al.*, 2012), *Kr-h1* possui um papel na metamorfose. O perfil transcricional desse gene acompanha os títulos de HJ até a ocorrência da metamorfose, sugerindo um mecanismo regulatório (Jindra *et al.*, 2013). Konopova e colaboradores (2011) descobriram que, em insetos hemimetábolos e holometábolos, a ausência de *Kr-h1* causa metamorfose precoce, e a sua expressão deve ser reprimida para ocorrência correta da metamorfose, uma vez que a não diminuição mantém o indivíduo na fase larval. Kayukawa e colaboradores (2014) observaram que os ecdisteroides em conjunto com HJ atuam de forma a induzir a expressão de *Kr-h1*. No entanto, esses mesmos autores mostraram que com o silenciamento de *Kr-h1* a expressão de genes induzidos por 20E (*E74*, *E75* e *Broad*) não é afetada. Dessa forma, acredita-se que *Kr-h1* impeça a metamorfose, mas não diretamente pela inibição da via de 20E (Kayukawa *et al.*, 2014). A comparação entre os perfis expressionais de *Kr-h1* e mir-34 ao longo do desenvolvimento de *A. mellifera* indicam que de L4 a Pw a abundância dessas moléculas flutuam de forma oposta, evidenciando a regulação exercida por este miRNA. Pelo nosso conhecimento, é a primeira vez que a regulação do gene *Kr-h1* pelo miR-34 é provada e também sugerida como reguladora da metamorfose em *A. mellifera*.

Em nosso trabalho, propusemos também interações entre o gene *Usp* e os quatro miRNAs estudados (miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281). No entanto, o ensaio da luciferase comprovou apenas um sítio de ligação na região 3'UTR desse gene para o miRNA miR-281. O gene *Usp* pertence à superfamília de receptores nucleares de hormônios, responsáveis por controlar a diferenciação, crescimento e desenvolvimento (Grad *et al.*, 2002; Patrick *et al.*, 2001). USP, para se tornar ativo, dimeriza com o receptor de ecdisona (EcR), essencial na via dos ecdisteroides, controlando o desenvolvimento, reprodução, muda e a metamorfose (Yao *et al.*, 1993; Sasorith *et al.*, 2002). Barchuk e colaboradores (2008) demonstraram que *Usp* participa nos mecanismos que regulam a progressão do desenvolvimento pupal em *A. mellifera*. O silenciamento deste gene demonstrou influências sobre a expressão de *ftz-fl* e *jhe* (esterase do hormônio juvenil) (Barchuk *et al.*, 2008). *Usp* pode ainda ser um receptor de HJ (Jones & Sharp, 1997; Jones *et al.*, 2001; Iwena *et al.*, 2007), uma vez que tratamento com esse hormônio aumenta sua expressão (Xu *et al.*, 2002; Barchuk *et al.*, 2004). Como já mencionado, o miR-281 é um microRNA conservado e encontrado apenas em invertebrados. Em *B. mori* miR-281 é expresso em vários tecidos durante a metamorfose (Liu *et al.*, 2010), no entanto, a sua função ainda não foi determinada. Em nosso trabalho pudemos observar que entre as fases

L5S3 e Pw as flutuações no perfil de *Usp* parecem seguir uma regulação exercida por miR-281, de forma que uma queda acentuada deste miRNA de L5S3 a PP1 é acompanhada por um aumento da abundância de *Usp* das fases PP1 a PP3. O gene *Usp* é um possível candidato no *cross-talk* entre 20E e HJ (Jindra *et al.*, 2013), portanto, estas novas informações sobre a ação desse gene são muito vantajosas para se entender os mecanismos moleculares responsáveis pela ocorrência da metamorfose.

Também encontramos sítios de ligação para os miRNAs miR-34, miR-252a e miR-252b na região 3'UTR do gene *chd64*. No entanto, apenas o sítio do miR-34 e um dos sítios preditos para miR-252b puderam ser testados no ensaio da luciferase e os resultados apontaram que estes sítios são ligados por estes miRNAs. O gene *chd64* medeia o *cross-talk* entre as vias de HJ e 20E pela interação com EcR, USP ou Met em *H. armigera* (Liu *et al.*, 2011) e em *D. melanogaster* (Li *et al.*, 2007). Mais do que isso, nestes dois organismos modelos a expressão de *chd64* é induzida por HJ e por 20E (Li *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011). Liu e colaboradores (2011) constataram que a proteína Chd64 na forma não fosforilada interage com USP+Met na via do HJ. E durante a metamorfose, quando os níveis de 20E estão altos, Chd64 é fosforilado, não se liga a USP, o que permite USP se ligue a EcR formando o receptor de ecdisteroides (Liu *et al.*, 2011). Segundo o modelo de Ament e colaboradores (2012), a proteína Chd64 interage fisicamente com os fatores de transcrição USP, Met, EcR, e FKBP39, modulando a ação do HJ em operárias adultas *A. mellifera*. O miR-252 também parece ter um papel importante na metamorfose de *B. mori*, uma vez que sua expressão é basal durante as primeiras fases larvais e ocorre um aumento durante a fase de tecelagem de casulo, permanecendo alta até a metamorfose (Jagadeeswaran *et al.*, 2010). A comparação entre os perfis expressionais de *chd64* e miR-34 ao longo do desenvolvimento também parece corroborar a regulação exercida por este miRNA, sobretudo nas fases L5S3 a PP1 em que a queda brusca nos transcritos de miR-34 são acompanhados pelo aumento exponencial dos transcritos de *chd64* de L5S3 a PP3. O pico de *chd64* na fase PP3 é importante para ocorrência da metamorfose (Liu *et al.*, 2011). Por sua vez, a comparação entre os perfis expressionais de *chd64* e miR-252b parece demonstrar uma relação negativa de L5S3 a PP1 e uma relação positiva de PP1 a Pw. Estes resultados indicam outros mecanismos regulatórios sofridos por *chd64*, como pelo miR-34, bem como a participação de miR-252b na regulação de outros genes. Pelo nosso conhecimento, esta é também a primeira vez que a regulação do gene *chd64* por

miR-34 e miR-252b é provada e também sugerida como reguladora da metamorfose em *A. mellifera*.

Nossas análises de predição encontraram sítios de ligação para os miRNAs miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281 na região 3'UTR do gene do receptor de ecdisona (*EcR*) e. O ensaio da luciferase provou que a região 3'UTR do gene *EcR* possui um sítio de ligação funcional para o miR-252a, um sítio para o miR-252b e um sítio para o miR-281. Como já mencionado, a sinalização de 20E ocorre através da ligação a *EcR*, que por sua vez, forma um dímero com USP (Fahrback *et al.*, 2012; Hill *et al.*, 2013; Riddiford *et al.*, 2001). Esse complexo *EcR*+USP atua como receptor de 20E, se liga aos elementos de resposta nos promotores de genes regulados por 20E (Cherbas *et al.*, 1991; Fahrback *et al.*, 2012; Hill *et al.*, 2013; Riddiford *et al.*, 2001) e ativa a transcrição pelo recrutamento de coativadores (Henrich, 2012). Mesmos os dados existentes sobre *EcR* são insuficientes para explicar toda a complexidade e dinâmica da metamorfose. Em *Aedes aegypti*, o tratamento com metopreno (análogo ao HJ) impede o remodelamento do intestino durante a metamorfose, pela inibição da expressão de *EcR*, *Usp* e *Br-C* (Wu *et al.*, 2006b). Já o tratamento com 20E causa uma repressão de *EcR* em *A. mellifera* (Mello *et al.*, 2014) e em *M. sexta* (Jindra *et al.*, 1996). Em *A. mellifera*, o silenciamento de *EcR* via RNAi induziu a expressão diferencial de 70 miRNAs e de 234 mRNAs tais como *CYP* (Cytochrome p450), *MRJPs* (Major Royal Jelly Proteins), e genes de resposta hormonal, como *Kr-h1* e *ftz-f1* (Mello *et al.*, 2014). Da mesma forma que apontada em nosso trabalho, Jiang *et al.* (2013) verificaram através de predição *in silico* que a 3'UTR do mRNA de *EcR* possui sítios-alvo do miR-281, sendo provavelmente um elemento regulador na expressão *EcR* também em *B. mori*.

Dados já publicados sobre a expressão de *EcR* em *A. mellifera* por Mello e colaboradores (2014), mostram que seu perfil é oposto aos dos títulos de 20E, com uma queda em PP1, um pico em PP3 e outra queda em Pw. Esse padrão é semelhante aos perfis de miR-252a, miR-252b e miR-281, indicando uma relação positiva entre miRNAs e o gene *EcR*. Este resultado pode indicar que estes miRNAs podem regular a expressão de *EcR* em outras fases do desenvolvimento que não a muda metamórfica de *A. mellifera* e, ainda, que *EcR* possa estar sob a regulação de outros miRNAs. Pelo nosso conhecimento, esta é também a primeira vez que estes dados são apresentados.

Por fim, propusemos interações entre o gene *ftz-f1* e os miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281. O ensaio da luciferase comprovou a existência de todas as interações

com exceção daquela com o miR-34. Apesar desta interação em específico não ter sido validada, outra interação envolvendo miR-34 e *ftz-f1* foi validado em *A. mellifera* (Freitas FCP, *in* preparação). Há fortes indícios de que o *ftz-f1* interaja com a via de 20E (revisado por Yamanaka *et al.*, 2013), e também com a via de HJ, uma vez que ele é necessário para ativação de genes de resposta primária a este hormônio (Dubrovsky *et al.*, 2011). Em *D. melanogaster*, *ftz-f1* regula a metamorfose direcionando respostas específicas, mediadas por 20E e HJ, ligando-se a diferentes cofatores em diferentes tecidos (Woodard *et al.*, 1994; Broadus *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2000). Esse gene possui também papel essencial durante as fases de pupa e eclosão do adulto em *D. melanogaster* (Sultan *et al.*, 2014).

Broadus e colaboradores (1999) descobriram que mutações em *ftz-f1* são letais, por perturbarem a via de sinalização de 20E no início da metamorfose de *D. melanogaster*. *Ftz-f1* é reprimido com tratamento com 20E em *D. melanogaster* (Rewitz *et al.*, 2010). Em *Leptinotarsa decemlineata*, *ftz-f1* é altamente expresso durante cada muda, com perfil similar ao de ecdisteroides (Liu *et al.*, 2014). Silenciamento de *ftz-f1* causa repressão na transcrição de *EcR* e *Usp*, diminuição nos títulos de 20E e inibição da metamorfose (Liu *et al.*, 2014), além de induzir genes de biossíntese do HJ, aumento os títulos desse hormônio e diminuindo a transcrição de *Kr-h1* (Liu *et al.*, 2014).

A comparação entre os perfis de expressão de *ftz-f1* e mir-252a ao longo do desenvolvimento demonstra que esses dois elementos possuem uma relação positiva, principalmente entre fases L5S3 e Pw, uma vez que, ambos possuem um aumento de expressão em PP1, com um pico em PP3 e queda em Pw. Por sua vez, a comparação entre os perfis de expressão de *ftz-f1* e mir-252b evidencia o mecanismo regulatório entre as fases L3-L4 e L5S3, de forma que o aumento na transcrição do miRNA levam a queda na abundância de transcritos de *ftz-f1*. Porém, de PP1 a Pw observam-se perfis semelhantes de expressão, indicando que outros mecanismos regulatórios devem estar envolvidos. Finalmente, a comparação entre os perfis transcricionais de *ftz-f1* e mir-281 demonstram que, de L5F3 a L5S3, os aumentos na abundância do miRNA contrastam com a queda do gene codificador de proteína. A queda acentuada de miR-281 de L5S3 a PP1 é seguida por um aumento exponencial de *ftz-f1* de PP1 a PP3. Esses resultados reforçam a regulação de *ftz-f1* por miR-281, validada pelo ensaio da luciferase. Pelo nosso conhecimento, podemos mais uma vez afirmar que é a primeira vez que a regulação de

ftz-fl por miR-281, miR-252a e miR-252b é validada e sugerida como envolvida com a metamorfose de *A. mellifera*.

Em relação aos tratamentos hormonais, observamos primeiramente um aumento significativo da expressão de miR-34 após tratamento com 20E. Nossos dados mostraram, ainda, que o miR-34 apresenta uma expressão maior durante a fase L5 e em PP3 e uma queda após muda metamórfica, semelhante ao que ocorre em *D. melanogaster* (Sempere *et al.*, 2003), *H. armigera* (Ge *et al.*, 2013) e *S. litura* (Ge *et al.*, 2013). Sugerimos, então, que o tratamento de pupas PP2 de *A. mellifera* com 20E aumentam os títulos desse hormônio (já altos nessa fase) consequentemente, aumentando a expressão do miR-34. No entanto, não observamos alterações significativas na expressão do miR-34 após tratamento com HJ. Rubio e colaboradores (2012) também observaram uma tendência a aumentar a expressão miR-34 com tratamento com 20E, mas não com HJ em *B. germanica*. Já em *D. melanogaster*, o miR-34 é induzido pelo tratamento com HJ (Liu *et al.*, 2012; Sempere *et al.*, 2003), no entanto é inibido por 20E (Sempere *et al.*, 2003; Varghese & Cohen, 2007; Jin *et al.*, 2012; revisado por Luhur *et al.*, 2013). Provavelmente, essa diferença ocorre pela existência de distintos modelos de regulação desse miRNA em diferentes espécies, sendo que nesse caso em *A. mellifera* parece ser mais relacionado ao modelo de regulação existente em *B. germanica*.

Como já mencionado, os miR-252a e miR-252b apresentam perfis de expressão semelhantes aos títulos de HJ em *A. mellifera*. Podemos observar ainda que um pico de expressão desses miRNAs ocorre durante a muda metamórfica e um padrão semelhante foi encontrado no corpo gorduroso de *B. mori* (Liu *et al.*, 2010). Em relação aos tratamentos, a expressão do miR-252a não foi afetada com tratamento com HJ e o miR-252b teve uma tendência a aumentar sua expressão, porém apresentou diferença estatística com o controle hexano, mas não com controle sem tratamento. E em relação ao tratamento com 20E, tanto o miR-252a quanto o miR-252b apresentaram um aumento na expressão em relação aos grupos controles. Em *B. germanica*, o mir-252 foi inibido durante a última fase ninfal em resposta ao tratamento com 20E e ao tratamento com 20E+HJ (Rubio *et al.*, 2012). Dessa forma, sugere-se que o perfil de expressão desse microRNA possa ser coordenado tanto com os títulos de HJ quanto com os de 20E (Rubio *et al.*, 2012).

Apesar da função do miR-281 ainda não ter sido determinada, esse miRNA parece ter um papel na metamorfose (Jiang *et al.*, 2013). Nosso tratamento com HJ, não causou

alterações significativas na expressão do miR-281. O tratamento com HJ, em *B. mori* também não apresentou alterações na expressão do miR-281 (Jiang *et al.*, 2013). Já após o tratamento com 20E observamos a indução da expressão desse miRNA em relação aos seus controles. Em *B. mori*, a expressão de miR-281 foi inibida nos túbulos de Malpighi após tratamento com 20E (Jiang *et al.*, 2013). Por outro lado, em nosso trabalho a expressão de miR-281 se contrapõe à curva de HJ, mantendo-se relativamente elevada durante o desenvolvimento larval, o que restringiria a expressão de EcR, durante essas fases. Este resultado é semelhante aos dados encontrados por Jiang e colaboradores em *B. mori* (2013). Durante a fase de muda metamórfica (PP3), expressão de miR-281 diminuiu drasticamente, o que permitiria a expressão de EcR. Como já mencionado, existe um sítio validado por nós do miR-281 na 3'UTR do gene EcR, o que reforça nossa hipótese que esse miRNA regula a expressão de EcR durante as fases larvais e a diminuição da expressão desse miRNA, permite um aumento na expressão de EcR durante a muda metamórfica. Ainda que sua função não seja completamente esclarecida, em nosso trabalho pudemos apresentar muitas evidências do envolvimento de miR-281 com a metamorfose, revelando sua regulação sobre os genes *ftz-f1*, *EcR* e *Usp*, como discutido anteriormente.

Nos últimos anos, muitos estudos vêm tentando elucidar o processo de ação de 20E e de HJ sobre a metamorfose, porém a resposta diferencial dos tecidos ou, ainda, como um mesmo tecido responde de maneira distinta aos títulos desses hormônios durante o desenvolvimento são questões que não estão completamente esclarecidas (revisado por Jindra *et al.*, 2013; Yamanaka *et al.*, 2013). Uma vez que, a metamorfose está fortemente relacionada a diversas funções fisiológicas, desenvolvimento e reprodução, além de estar sobre controle de outros hormônios, como peptídios do tipo insulina, entender o *cross-talk* entre hormônios, genes e processos é extremamente importante para se atingir uma visão holística deste evento (Jindra *et al.*, 2013).

6. CONCLUSÕES

Por meio de nossa pesquisa, pudemos acrescentar algumas peças que ajudam a esclarecer o complexo evento da metamorfose em insetos holometábolos. Pudemos provar, bem como caracterizar a regulação exercida por miRNAs (miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-281) sobre genes (*chd64*, *Kr-h1*, *ftz-f1*, *EcR*, *inr2* e *Usp*) relacionados à metamorfose. Dessa forma, nossos resultados corroboram pelo menos parcialmente nossa hipótese inicial da regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs. Não apenas provamos interações (miR-34 com os alvos *Kr-h1*, *chd64* e *inr2*; miR-252a com os alvos *ftz-f1* e *EcR*; miR-252b com os alvos *chd64* e *ftz-f1*; miR-281 com os alvos *ftz-f1*, *EcR* e *Usp*) como também descartamos interações putativas (miR-34 com os alvos *ftz-f1*, *EcR* e *Usp*; miR-252a com o alvo *Usp*; miR-252b com o alvo *Usp*; e miR-281 com o alvo *inr2*). A regulação exercida por estes miRNAs sobre importantes genes ligados a metamorfose evidencia seu envolvimento neste processo em *A. mellifera*. A investigação dos perfis de expressão destes miRNAs ao longo do desenvolvimento, contrastados com os perfis de seus respectivos mRNAs alvo ilustraram as interações validadas, expondo a regulação exercida pelo miRNA sobre seus alvos. A caracterização desses perfis demonstrou ainda a existência de mecanismos regulatórios ainda desconhecidos e a necessidade de se investigar novos mecanismos moleculares regulatórios da metamorfose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaux C, Dantec C, Parrinello H, Le Conte Y. 2011. Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics*. 12: 496.
- Amdam GV, Page RE Jr. 2005. Intergenerational transfers may have decoupled physiological and chronological age in a eusocial insect. *Ageing Res Rev*. 4(3): 398-408.
- Ament SA, Chan QW, Wheeler MM, Nixon SE, Johnson SP, Rodriguez-Zas SL, Foster JL, Robinson GE. 2011. Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *The Journal of Experimental Biology*. 214: 3808-3821.
- Ament SA, Corona M, Pollock HS, Robinson GE. 2008. Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 105(11): 4226-4231.
- Ament SA, Wang Y, Chen CC, Blatti CA, Hong F, Liang ZS, Negre N, White KP, Rodriguez-Zas SL, Mizzen CA, Sinha S, Zhong S, Robinson GE. 2012. The transcription factor ultraspiracle influences honey bee social behavior and behavior-related gene expression. *PLoS Genetics* 8(3): e1002596.
- Ament SA, Wang Y, Robinson GE. 2010. Nutritional regulation of division of labor in honey bees: toward a systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2(5): 566-576.
- Asgari S. 2013. MicroRNA functions in insects. *Insect Biochemistry and Molecular. Insect Biochem Mol Biol*. 43(4):388-97.
- Axtell MJ. 2008. Evolution of microRNAs and their targets: are all microRNAs biologically relevant? *Biochim Biophys Acta*. 1779(11):725-734.
- Azevedo SV, Hartfelder K. 2008. 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*. 54 (6): 1064-1071.
- Barchuck AR, Maleszka R, Simões ZLP. 2004. *Apis mellifera* ultraspiracle: cDNA sequence and rapid up-regulation by juvenile hormone. *Insect Mol Biol*. 13:459-467.
- Barchuk AR, Figueiredo VLC, Simões ZLP. 2008. Downregulation of ultraspiracle gene expression delays pupal development in honeybees. *J Insects Physiol*. 54:1035-1040.
- Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. 2006. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 20, 1885-98.
- Belgacem YH, Martin JR. 2007. Hmger in the corpus allatum controls sexual dimorphism of locomotor activity and body size via the insulin pathway in *Drosophila*. *PLoS ONE* 2:e187.
- Belles X, Cristino AS, Tanaka ED, Rubio M, Piulachs MD. 2011. Insect MicroRNAs: From Molecular Mechanisms to Biological Roles. In *Insect Molecular Biology and Biochemistry*, Volume 1. Edited by Gilbert LI. Amsterdam: Elsevier-Academic Press: 30–56.
- Bindea GB, Mlecnik H, Hackl P, Charoentong M, Tosolini et al., 2009 ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25: 1091-1093.

- Broadus J, McCabe JR, Endrizzi B, Thummel CS, Woodard CT. 1999. The *Drosophila* β FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Mol. Cell* 3:143–49.
- Cherbas L, Lee K, Cherbas P. 1991. Identification of ecdysone response elements by analysis of the *Drosophila* Eip28/29 gene. *Genes Dev.* 5:120–131.
- Colombani J, Bianchini L, Layalle S, Pondeville E, Dauphin-Villemant C, Antoniewski C, Carre C, Noselli S, Leopold P. 2005. Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science*. 310:667–670.
- Davis E, Caiment F, Tordoir X, Cavaillé J, Ferguson-Smith A, Cockett N, Georges M, Charlier C. 2005. RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted Rtl1/Peg11 locus. *Curr Biol.* 26;15(8):743-749.
- Didiano D, Hobert O. 2006. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA target interactions. *Nat Struct Mol Biol* 13, 849-851.
- Didiano D, Hobert O. 2008. Molecular architecture of a miRNA-regulated 3' UTR. *RNA* 14, 1297-1317.
- Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Bernardo T, Otte V, DiFilippo R, Bryan H. 2011. The *Drosophila* FTZ-F1 nuclear receptor mediates juvenile hormone activation of E75A gene expression through an intracellular pathway. *J. Biol. Chem.* 286: 33689–33700.
- Dubrovsky EB. 2005. Hormonal cross talk in insect development. *Trends in Endocrinology Metabolism* 16(1): 6-11.
- Duursma AM, Kedde M, Schrier M, le Sage C, Agami R. 2008. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA* 14, 872-877.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Elsik CG. et al. 2014. Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC Genomics*. 15: 86.
- Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang SF, Doerks T, Dorner S, Bork P, Boutros M, Izaurralde E. 2007. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev* 21, 2558-2570.
- Evans JD, Wheeler DE. 1999. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 5575-5580.
- Evans JD, Wheeler DE. 2000. Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biology* 2:1-6.
- Fahrbach SE, Smagghe G, Velarde RA. 2012. Insect nuclear receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 57:83–106.
- Fasanaro P, Romani S, Voellenkle C, Maimone B, Capogrossi MC, Martelli F. 2012. ROD1 is a seedless target gene of hypoxia-induced miR-210. *PLoS One* 7, e44651
- Feldlaufer MF, Herbert EWJ, Svoboda JA. 1985. Makisterone A: the major ecdysteroid from the pupae of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* 15:597–600.
- Feldlaufer MF, Herbert EWJr, Svoboda JA, Thompson MJ. 1986a. Biosynthesis of makisterone A and 20-hydroxyecdysone from labeled sterols by the honey bee, *Apis mellifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 3:415–421.
- Feldlaufer MF, Svoboda JA, Herbert EWJr. 1986b. Makisterone A and 24-methylenecholesterol from the ovaries of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experientia* 42, 200–201.
- Francis, VA, Zorzano A, Teleman AA., 2010. dDOR is an EcR coactivator that forms a feed-forward loop connecting insulin and ecdysone signaling. *Curr. Biol.* 20:1799–1808.

- Freitas, Flávia Cristina de Paula. 2014. Análise do transcriptoma do desenvolvimento embrionário de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) e a regulação dos genes *eve*, *hairy*, *ftz-f1* e *act5C* pelo miR-34. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética. Orientadora: Simões, Zilá Luz Paulino. Ribeirão Preto, São Paulo.
- Garg D, Cohen SM. 2014. miRNAs and aging: a genetic perspective. *Ageing Res Rev.* 17:3-8.
- Garibay TJD, Jarquin AG. 2014. Transcriptional regulation mechanism mediated by miRNA-DNA•DNA triplex structure stabilized by Argonaute. *Biochim Biophys Acta.* 1839(11):1079-1083.
- Ge X, Zhang Y, Jiang J, Zhong Y, Yang X, Li Z, Huang Y, Tan A. 2013. Identification of microRNAs in *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* based on deep sequencing and homology analysis. *Int J Biol Sci.* 9(1):1-15.
- Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF. 2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312, 75-9.
- Godlewski J, Wang S, Wilson TG. 2006. Interaction of bHLH-PAS proteins involved in juvenile hormone reception in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342: 1305-1311.
- Goodisman MA, Isoe J, Wheeler DE, Wells MA. 2005. Evolution of insect metamorphosis: a microarray-based study of larval and adult gene expression in the ant *Camponotus festinatus*. *Evolution.* 59(4):858-70.
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R. 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 38:695-699.
- Grad I, Kochman M, Ozyhar, A. 2002. Functionality versus strength – has functional selection taken place in the case of the ecdysteroid receptor response element? *Acta Biochim Pol.* 49(3):747-756.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al. 2000. An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. New York: W. H. Freeman; How DNA changes affect phenotype.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36, D154-8
- Guo L, Lu Z. 2010. The fate of miRNA* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? *PLoS One* 5, e11387.
- Hartfelder K, Engels W. 1998. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Current Topics in Developmental Biology* 40: 45-77.
- Hartfelder, K. 1993. Structure and function of the prothoracic gland in honey bee (*Apis mellifera* L.) development. *Invertebrate Reproduction and Development.* 23 (1): 59-74.
- Haydak MH. 1970. Honey bee nutrition. *Annual Review Entomology.* 15, 143–156.
- Henrich VC. 2012. The ecdysteroid receptor. See Ref. 38, pp. 177–218.
- Hernandes, Natália Helena. 2013. Moléculas reguladoras do crescimento larval e da metamorfose em abelhas operárias *Apis mellifera*. Monografia apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP: Ciências Biológicas. Orientador: Nunes, Francis de Moraes Franco.
- Hill RJ, Billas IML, Bonneton F, Graham LD, Lawrence MC. 2013. Ecdysone receptors: from the Ashburner model to structural biology. *Annu. Rev. Entomol.* 58.

- Hiruma K, Riddiford LM. 2010. Developmental expression of mRNAs for epidermal and fat body proteins and hormonally regulated transcription factors in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 56:1390–95.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium. 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature.* 443(7114): 931-49.
- Huang J, Tian L, Peng C, Abdou M, Wen D, Wang Y, Li S, Wang J. 2011. DPP-mediated TGFbeta signaling regulates juvenile hormone biosynthesis by activating the expression of juvenile hormone acid methyltransferase. *Development.* 138(11):2283-2291.
- Huang Y, Zou Q, Song H, Song F, Wang L, Zhang G, Shen X. 2010. A study of miRNAs targets prediction and experimental validation. *Protein Cell.* (11):979-986.
- Hutvagner G, Simard MJ. 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(1):22-32.
- Iwema T, Billas IML, Beek Y, Bonneton F, Nierengarten H, Chaumot A, Richards G, Laudet V, Moras D. 2007. Structural and functional characterization of a novel type of ligand-independent RXR-USP receptor. *The EMBO Journal.* 26:3370-3782.
- Jagadeeswaran G, Zheng Y, Sumathipala N, Jiang H, Arrese EL, Soulages JL, Zhang W, Sunkar R. 2010. Deep sequencing of small RNA libraries reveals dynamic regulation of conserved and novel microRNAs and microRNA-stars during silkworm development. *BMC Genomics* 11: 52.
- Jiang J, Ge X, Li Z, Wang Y, Song Q, Stanley DW, Tan A, Huang Y. 2013. MicroRNA-281 regulates the expression of ecdysone receptor (EcR) isoform B in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol.* 43(8):692-700.
- Jin H, Kim VN, Hyun S. 2012. Conserved microRNA miR-8 controls body size in response to steroid signaling in *Drosophila*. *Genes & Development,* 26(13), 1427–1432.
- Jindra M, Malone F, Hiruma K, Riddiford LM. 1996. Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol.* 180(1):258-272.
- Jindra M, Palli SR, Riddiford LM. 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annual Review of Entomology* 58: 181-204.
- Jones G, Sharp PA. 1997. Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13499–13503
- Jones G, Wozniak M, Chu Y, Dhar S, Jones D. 2001. Juvenile hormone III-dependent conformational changes of the nuclear receptor ultraspiracle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:33–49
- Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577-1581.
- Kayukawa T, Minakuchi C, Namiki T, Togawa T, Yoshiyama M, Kamimura M, Mita K, Imanishi S, Kiuchi M, Ishikawa Y, Shinoda T. 2012. Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of Krüppel homolog 1, a repressor of insect metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 17: 109-129.
- Kayukawa T, Murata M, Kobayashi I, Muramatsu D, Okada C, Uchino K, Sezutsu H, Kiuchi M, Tamura T, Hiruma K, Ishikawa Y, Shinoda T. 2014. Hormonal regulation and developmental role of Krüppel homolog 1, a repressor of metamorphosis, in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev Biol.* 388(1):48-56.
- Khan FH, Pandian V, Ramraj S, Aravindan S, Herman TS, Aravindan N. 2015. Reorganization of metastamiRs in the evolution of metastatic aggressive neuroblastoma cells. *BMC Genomics.* 16(1):501.

- Kloosterman WP, Plasterk RH. 2006. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*. 11(4):441-450.
- Konopova B, Smykal V, Jindra M. 2011. Common and distinct roles of juvenile hormone signaling genes in metamorphosis of holometabolous and hemimetabolous insects. *PLoS One*. 6(12): e28728.
- Koyama T, Syropyatova MO, Riddiford LM. 2008. Insulin/IGF signaling regulates the change in commitment in imaginal discs and primordia by overriding the effect of juvenile hormone. *Dev. Biol*. 324:258– 265.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. 2011. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 39, 152-157.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597-610.
- Kruger J, Rehmsmeier M. 2006. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res* 34, 451-454.
- Lal A, Navarro F, Maher CA, Maliszewski LE, Yan N, O'Day E, Chowdhury D, Dykxhoorn DM, Tsai P, Hofmann O, Becker KG, Gorospe M, Hide W, Lieberman J. 2009. miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol Cell* 35, 610-625.
- Landin, C.C. 2009. Abelhas, Morfologia e função de sistemas. São Paulo, Editora UNESP. 408 p.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Li X, Zhang W, Zhou L, Yue D, Su X. 2015. MicroRNA-592 targets DEK oncogene and suppresses cell growth in the hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Int J Clin Exp Pathol*. 8(10):12455-12463.
- Li Y, Zhang Z, Robinson GE, Palli SR. 2007. Identification and characterization of a juvenile hormone response element and its binding proteins. *J Biol Chem*. 282(52):37605-37617.
- Liu N, Landreh M, Cao K, Abe M, Hendriks GJ, Kennerdell J, Zhu Y, Wang LS, Bonini NM. 2012. The microRNA miR-34 modulates aging and neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature*. 482(7386): 519–523
- Liu PC, Wang JX, Song QS, Zhao XF. 2011. The participation of Calponin in the cross talk between 20-hydroxyecdysone and Juvenile Hormone signaling pathways by phosphorylation variation. *PLoS One* 6(5).
- Liu S, Gao S, Zhang D, Yin J, Xiang Z, Xia Q. 2010. MicroRNAs show diverse and dynamic expression patterns in multiple tissues of *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 11: 85.
- Liu XP, Fu KY, Lü FG, Meng QW, Guo WC, Li GQ. 2014. Involvement of FTZ-F1 in the regulation of pupation in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem Mol Biol*. 55:51-60.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-408
- Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. 2002. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* 297, 2053-6.

- Lozano J, Bellés X. 2011. Conserved repressive function of Krüppel homolog 1 on insect metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous species. *Scientific Reports* 1:163.
- Lucas K, Raikhel AS. 2013. Insect MicroRNAs: Biogenesis, expression profiling and biological functions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 43: 24- 38.
- Luhur A, Chawla G, Sokol NS. 2013. MicroRNAs as components of systemic signaling pathways in *Drosophila melanogaster*. *Curr Top Dev Biol*. 105:97-123.
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. 2007. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9667-9672.
- Massirer KB, Pasquinelli AE. 2006. The evolving role of microRNAs in animal gene expression. *Bioessays*. 28(5):449-452.
- Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. 2007. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317, 1764-1767.
- Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. 2007. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 315, 1576-1579.
- McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, Cowley AP, Lopez R. 2013. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 41:597-600.
- Mello TR, Aleixo AC, Pinheiro DG, Nunes FM, Bitondi MM, Hartfelder K, Barchuk AR, Simões ZL. 2014. Developmental regulation of ecdysone receptor (EcR) and EcR-controlled gene expression during pharate-adult development of honeybees (*Apis mellifera*). *Front Genet*. 5:445.
- Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Smith H, Ueno Y, Patel T. 2007. The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes. *J Biol Chem* 282, 8256-8264.
- Michelette ERF, Soares AEE. 1993. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie* 24: 431–440.
- Minakuchi C, Namiki T, Shinoda T. 2009. Krüppel homolog 1, an early juvenile hormone- response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Developmental Biology* 325: 341–350.
- Minakuchi C, Zhou X, Riddiford LM. 2008. Krüppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development* 125: 91–105.
- Mirth CK, Riddiford LM. 2007. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *Bioessays* 29:344–355
- Mirth CK, Shingleton AW. 2012. Integrating body and organ size in *Drosophila*: recent advances and outstanding problems. *Front. Endocrinol*. 3:1–13
- Mishima Y, Giraldez AJ, Takeda Y, Fujiwara T, Sakamoto H, Schier AF, Inoue K. 2006. Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr Biol*. 16(21):2135-42.
- Murata T, Kageyama Y, Hirose S, Ueda H. 1996. Regulation of the EDG84A gene by FTZ-F1 during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol*. 16:6509–6515.
- Nicolas FE. 2011. Experimental validation of microRNA targets using a luciferase reporter system. *Methods Mol Biol*. 732:139-152.

- Nijhout HF, Grunert LW. 2002. Bombyxin is a growth factor for wing imaginal disks in Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:15446–15450.
- Nijhout HF. 1994. *Insect Hormones*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Nilsen KA, Ihle KE, Frederick K, Fondrk MK, Smedal B, Hartfelder K, Amdam GV. 2011. Insulin-like peptide genes in honey bee fat body respond differently to manipulation of social behavioral physiology. *The Journal of Experimental Biology*. 214: 1488-1497.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, team U. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28, 1166-1167.
- Olsen PH, Ambros V. 1999. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 216, 671-80.
- Orban TI, Izaurralde E. 2005. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* 11, 459-469.
- Orom UA, Nielsen FC, Lund AH. 2008. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 30, 460-471.
- Ou J, Deng HM, Zheng SC, Huang LH, Feng QL, Liu L. 2014. Transcriptomic analysis of developmental features of *Bombyx mori* wing disc during metamorphosis. *BMC Genomics*. 27;15:820.
- Page RE, Peng, CY. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*. 36: 695-711.
- Patrick CWJr, Zheng B, Wu X, Gurtner G, Barlow M, Koutz C, Chang D, Schmidt M, Evan GR. 2001. Muristerone a-induced nerve growth factor release from genetically engineered human dermal fibroblasts for peripheral nerve tissue engineering. *Tissue Eng*. 7:303-311.
- Piper MD, Selman C, McElwee JJ, Partridge L. 2008. Separating cause from effect: how does insulin/IGF signalling control lifespan in worms, flies and mice? *Journal of Internal Medicine*. 263: 179–191.
- 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, 31–38.
- Randall DJ, Burggren W, French K. 2002. *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. 5th Edition. New York: W. H. Freeman and Company.
- Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R. 2004. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* 10, 1507-1517.
- Rewitz KF, Yamanaka N, O'Connor MB. 2010. Steroid hormone inactivation is required during the juvenile-adult transition in *Drosophila*. *Developmental Cell* 19(6): 895-902.
- Riddiford LM, Cherbas P, Truman JW. 2001. Ecdysone receptors and their biological actions. *Vit. Horm*. 60:1–73.
- Riddiford LM, Hiruma K, Lan Q, Zhou B. 1999. Regulation and role of nuclear hormone receptors during larval molting and metamorphosis of Lepidoptera. *American Zoologist* 39, 736–746.
- Riddiford LM, Truman JW, Mirth CK, Shen YC. 2010. A role for juvenile hormone in the prepupal development of *Drosophila melanogaster*. *Development* 137:1117–26.
- Riddiford LM. 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect Physiol*. 24:213–74.
- Riddiford LM. 2012. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? *Gen Comp Endocrinol*. 179(3):477-84.

- Robinson GE. 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Entomol.*, 37:637–665.
- Roulston TH, Cane JH. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution.* 222: 187-209.
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, 365-86.
- Rubio M, de Horna A, Belles X. 2012. MicroRNAs in metamorphic and nonmetamorphic transitions in hemimetabolan insect metamorphosis. *BMC Genomics.* 10;13:386.
- Russell SJ, Kahn CR. 2007. Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 681–691.
- Russell SJ, Kahn CR. 2007. Endocrine regulation of ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 8: 681–691.
- Sasorith S, Billas IM, Iwema T, Moras D, Wurts JM. 2002. Structure-based analysis of the ultraspiracle protein and docking studies of putative ligands. *J Insects Sci.* 2:25.
- Scharlaken B, de Graaf DC Goossens K, Brunain M, Peelman LJ, Jacobs FJ. 2008. Reference Gene Selection for Insect Expression Studies Using Quantitative Real-Time PCR: The Head of the Honeybee, *Apis mellifera*, After a Bacterial Challenge. *Journal of Insect Science.* 8: 33.
- Schmittgen TD, Jiang J, Liu Q, Yang L. 2004. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic Acids Research.* 32(4): e43.
- Sempere LF, Sokol NS, Dubrovsky EB, Berger EM, Ambros V. 2003. Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity. *Dev Biol.* 259(1):9–18.
- Shemshedini L, Wilson TG. 1990. Resistance to juvenile hormone and an insect growth regulator in *Drosophila* is associated with an altered cytosolic juvenile hormone-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(6): 2072–2076.
- Silva, Aline Carolina Aleixo. 2012. Padrões diferenciais de expressão gênica no desenvolvimento das castas de *Apis mellifera*, com ênfase na diferenciação das operárias. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética. Orientadora: Simões, Zilá Luz Paulino. Ribeirão Preto, São Paulo.
- Simões, Z.L.P.; Boleli, I.C. & Hartfelder, K. 1997. Occurrence of a prothoracicotropic hormone-like peptide in the developing nervous system of the honey bee (*Apis mellifera* L). *Apidologie.* 28: 399-409.
- Soni K, Choudhary A, Patowary A, Singh AR, Bhatia S, Sivasubbu S, Chandrasekaran S, Pillai B. 2013. miR-34 is maternally inherited in *Drosophila melanogaster* and *Danio rerio*. *Nucleic Acids Res.* 41(8):4470-4480.
- Stanley RG, Linskens HF. 1974. Pollen: Biology, biochemistry, management. Heidelberg, Germany: Springer.
- Stark C. et al. 2011. The BioGRID Interaction Database: 2011 update. *Nucleic Acids Res* 39, D698-704.
- Sultan AR, Oishi Y, Ueda H. 2014. Function of the nuclear receptor FTZ-F1 during the pupal stage in *Drosophila melanogaster*. *Dev Growth Differ.* 56(3):245-53.
- Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS. 2001. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* 292:107–110.
- Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. 2008. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 455, 1124-1128.

- Thermann R, Hentze MW. 2007. *Drosophila* miR-2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* 447, 875-878.
- Thummel CS. 1995. From embryogenesis to metamorphosis: The regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members. *Cell* 83: 871–877.
- Truman JW, Riddiford LM. 1999. The origins of insect metamorphosis. *Nature*, 401 ,447–452.
- Tsang J, Zhu J, van Oudenaarden A. 2007. MicroRNA-mediated feedback and feedforward loops are recurrent network motifs in mammals. *Mol Cell*. 2007 Jun 8;26(5):753-767.
- Varghese J, Cohen SM. 2007. microRNA miR-14 acts to modulate a positive autoregulatory loop controlling steroid hormone signaling in *Drosophila*. *Genes Dev*. 21(18):2277-82.
- Vella MC, Choi EY, Lin SY, Reinert K, Slack FJ. 2004. The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev* 18, 132-137.
- Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. 2007. Let-7 microRNA mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* 21, 1857-1862.
- Wang S, Baumann A, Wilson TG. 2007. *Drosophila melanogaster* Methoprene-tolerant (Met) gene homologs from three mosquito species: Members of PAS transcriptional factor family. *Journal of Insect Physiology* 53(3): 246–253.
- Wang Y, Wang CM, Jiang ZZ, Yu XJ, Fan CG, Xu FF, Zhang Q, Li LI, Li RF, Sun WS, Zhang ZH & Liu YG. 2015. MicroRNA-34c targets TGF β -induced factor homeobox 2, represses cell proliferation and induces apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 10(5):3095-3102.
- White KP, Rifkin SA, Hurban P, Hogness DS. 1999. Microarray analysis of *Drosophila* development during metamorphosis. *Science*. 286(5447):2179-84.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-62.
- Wilson TG, Fabian J. 1986. A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone. *Developmental Biology* 118(1): 190-201.
- Winston ML. 1993. The Honey Bee Colony: Life History. In *The Hive and the Honey Bee*. Ed. Graham, J.M., Dadant & Sons-Hamilton, Illinois, p. 73-95.
- Woodard CT, Baehrecke EH, Thummel CS. 1994. A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. *Cell* 79: 607–615.
- Wu L, Belasco JG. 2008. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 29, 1-7.
- Wu L, Fan J, Belasco JG. 2006a. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4034-9.
- Wu Y, Parthasarathy R, Bai H, Palli SR. 2006b. Mechanisms of midgut remodeling: juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mech. Dev*. 123, 530–547.
- Xu Y, Fang F, Chu Y, Jones D, Jones G. 2002. Activation of transcription through the ligand-binding pocket of the orphan nuclear receptor ultraspiracle. *Eur J Biochem*. 269(24):6026-6036.
- Yamada M, Murata T, Hirose S, Lavorgna G, Suzuki E, Ueda H. 2000. Temporally restricted expression of transcription factor betaFTZ-F1: significance for

- embryogenesis, molting and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. Development 127(23): 5083-5092.
- Yamanaka N, Rewitz KF, O'Connor MB. 2013. Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. Annual Review of Entomology 58: 497-516.
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKron M, Cherbas P, Evan RM. 1993. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. Nature. 366:476-479.
- Yeh SD, von Grotthuss M, Gandasetiawan KA, Jayasekera S, Xia XQ, Chan C, Jayaswal V, Ranz JM. 2014. Functional divergence of the miRNA transcriptome at the onset of *Drosophila* metamorphosis. Mol Biol Evol. 2014 Oct;31(10):2557-72.
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP. 2004. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. Science 304, 594-596.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101, 25-33.
- Zhang Y, Fan M, Zhang X, Huang F, Wu K, Zhang J, Liu J, Huang Z, Luo H, Tao L, Zhang H. 2014. Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. RNA. 2014 Dec;20(12):1878-1889.
- Zhang Y, Zhou X, Ge X, Jiang J, Li M, Jia S, Yang X, Kan Y, Miao X, Zhao G, Li F, Huang Y. 2009. Insect-Specific microRNA Involved in the Development of the Silkworm *Bombyx mori*. PLoS One. 4(3):e4677.
- Zitnan D, Adams ME. 2005. Neuroendocrine Regulation of Insect Ecdysis. In: Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology, Pharmacology, and Molecular Biology, (L.I. Gilbert, K. Iatrou and S.S. Gill, Eds.), Elsevier Press, London, Vol. 3, p. 1-60.