

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

FERNANDA CAMILA SANCHES

Expressão de genes da via Hippo em *Apis mellifera*: relação com hormônios, microRNAs e comparação entre ovários de rainhas e operárias em desenvolvimento

Ribeirão Preto, SP

2022

FERNANDA CAMILA SANCHES

Expressão de genes da via Hippo em *Apis mellifera*: relação com hormônios, microRNAs e comparação entre ovários de rainhas e operárias em desenvolvimento

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Genética.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes

Ribeirão Preto, SP

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Sanches, Fernanda Camila

Expressão de genes da via Hippo em *Apis mellifera*: relação com hormônios, microRNAs e comparação entre ovários de rainhas e operárias em desenvolvimento. Ribeirão Preto, 2022.

64+7p

Dissertação de Mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Genética.

Orientador: Nunes, Francis de Moraes Franco

1 - *Apis mellifera*, 2 - expressão gênica, 3 - fatores hormonais, 4 - via Hippo, 5 - ovário

Nome: SANCHES, Fernanda Camila.

Título: Expressão de genes da via Hippo em *Apis mellifera*: relação com hormônios, microRNAs e comparação entre ovários de rainhas e operárias em desenvolvimento

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

O presente trabalho foi realizado com apoio das seguintes agências brasileiras de fomento à pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Projeto no. 2019/02347-1) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Projeto no. 303160/2019-5).

Dedico esse trabalho aos meus pais que sempre me apoiaram e estiveram presentes em todas as minhas decisões.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), pela oportunidade de realização deste trabalho e por todo suporte que tive durante o Mestrado; às agências de fomento CAPES, Fapesp e CNPq por todo suporte financeiro;

Ao meu Orientador Prof. Dr. Francis Nunes pela oportunidade de desenvolver esse projeto, por todos os ensinamentos, pela amizade e por estar sempre disponível para me auxiliar no desenvolvimento do mesmo;

Às professoras, Profa Dra. Zilá Simões, Profa Dra. Márcia Bitondi e ao Prof. Dr. Klaus Hartfelder por disponibilizarem os recursos e o laboratório, e por estarem sempre disponíveis para discutir sobre o projeto;

À Profa Dra. Livia Moda, ao Prof. Dr. Rodrigo Dalaqua, e a MSc. Franciane Rabiço por todo o suporte que me deram a respeito da hibridização *in situ*;

À MSc. Natália Hernandes por ter gentilmente me cedido as amostras de *Apis mellifera* tratadas com hormônio juvenil e 20-hidroxiecdisona;

Aos meus colegas de laboratório e aos alunos do Prof. Dr. Klaus Hartfelder pela boa convivência e pela cooperação que sempre tivemos;

Ao técnico Luís Aguiar por tudo que aprendi sobre manutenção do apiário e pelo auxílio nas coletas de abelhas operárias e produção de rainhas da espécie *Apis mellifera*;

À Dra. Denyse Lago por ter se dedicado a me ensinar dissecação de ovários de larvas de *Apis mellifera*, junto com a Profa. Dra. Zilá;

Aos técnicos Vera Figueiredo, Rogério Pereira, por estarem sempre disposto a me auxiliar, pela amizade e todos os momentos felizes no laboratório. Ao técnico Anderson por ter me recebido com tanta gentileza;

À especialista do LMMC - EMRP, Elizabete Milani por ter me recebido com tanta gentileza. A dedicação e o amor que ela tem pelo trabalho e pelo projeto das pessoas que a procura é notável e inspirador;

Às funcionárias Maria e Francisca pela excelente companhia durante o almoço e no final do expediente, e por manter o laboratório sempre limpo e organizado;

Agradeço aos meus pais, Marlene e Luiz, ao meu noivo Pedro, a minha avó Zélia e ao meu irmão Carlos por todo o apoio que me deram durante essa trajetória: por todos os finais de semanas e feriados que me acompanharam nas coletas, pela imensa compreensão que tiveram comigo nas diferentes fases do projeto e por todo o amor que recebo de cada um, eu amo vocês.

À Maria Luiza e à Josélia por todo o apoio psicológico durante o período da Pandemia em que estive desenvolvendo o Mestrado.

Aos meus amigos Camila Panzeri, Mariana Bisio, Solange Cristina, Matheus Pereira, João Maia e Ingrid Menezes por serem uma segunda família para mim.

## Resumo

Sanches, F. C. **Expressão de genes da via Hippo em *Apis mellifera*: relação com hormônios, microRNAs e comparação entre ovários de rainhas e operárias em desenvolvimento.** Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2022.

As abelhas fêmeas da espécie *Apis mellifera*, rainhas e operárias, possuem capacidades reprodutivas muito distintas quando adultas, devido às diferenças morfo-fisiológicas que ocorrem ao longo do desenvolvimento de ambas. Enquanto as rainhas possuem ovários bem desenvolvidos e a sua principal atividade é a reprodução, as operárias possuem ovários menos desenvolvidos e são facultativamente estéreis. Essas diferenças morfo-fisiológicas são reguladas por fatores hormonais e vias de sinalização, como a Hippo, associada ao controle do tamanho dos órgãos por meio da regulação de proliferação celular e apoptose. Nosso objetivo foi identificar os genes da via Hippo em *A. mellifera*, realizar análises *in silico* de enriquecimento funcional baseada em Gene Ontology, e de predição de sítios de ligação de microRNAs nas 3'UTRs de mRNAs transcritos a partir de genes do *core* central (Hpo, Sav, Wts, Mts) e Yki. Além disso, analisar se os hormônios HJ e 20E influenciam a expressão de genes da via Hippo e se esta via está relacionada com o desenvolvimento diferencial dos ovários entre as duas castas de *A. mellifera*. Nós identificamos 50 genes da via nessa abelha, associados a processos biológicos canônicos (como proliferação, diferenciação e morte celulares) e alguns mais específicos (como desenvolvimento de epitélio, de sistema nervoso e metamorfose). Seis potenciais interações miRNA:mRNA foram preditas, sugerindo regulação pós-diferencial da via entre as castas. Também observamos, pela primeira vez em abelhas, que os hormônios HJ e 20E regulam a expressão de alguns genes do *core* central da via Hippo, principalmente o gene Hpo e seus variantes, e que os genes da via Hippo estão envolvidos em processos de crescimento, manutenção e degeneração dos ovários, com sinais de proliferação celular mais evidentes do que os de apoptose em rainhas, e o inverso para as operárias.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, expressão gênica, fatores hormonais, via Hippo, ovário

## Abstract

Sanches, F. C. **Expression of Hippo pathway genes in *Apis mellifera*: hormonal influence and comparison between ovaries of developing queens and workers.** Master's dissertation – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2022.

The *Apis mellifera* female bees, queens and workers, have very different reproductive capacities when adults, due to the morpho-physiological differences that occur during the development of both. While queens have well-developed ovaries and their main activity is reproduction, workers are facultatively sterile. These morpho-physiological differences are regulated by hormonal factors and signaling pathways, such as Hippo, associated with the control of organ size through the regulation of cell proliferation and apoptosis. Our goal was to identify the genes of the Hippo pathway in *A. mellifera*, perform *in silico* analyses of functional enrichment based on Gene Ontology, and predict microRNA binding sites in the 3'UTRs of mRNAs transcribed from genes of the central core (Hpo, Sav, Wts, Mts) and Yki. In addition, analyze whether the hormones HJ and 20E influence the expression of Hippo pathway's genes and whether this pathway is related to the differential development of the ovaries between the two *A. mellifera* castes. We identified 50 Hippo genes in this bee associated with canonical biological processes (such as cell proliferation, differentiation, and death) and some more specific ones (such as epithelial development, nervous system development, and metamorphosis). Six potential miRNA::mRNA interactions were predicted, suggesting differential regulation of the Hippo pathway between castes. Moreover, we observed, for the first time in bees, that the hormones HJ and 20E regulate the expression of some genes in the central core of the Hippo pathway, mainly the Hpo gene and its variants, and that the genes of the Hippo pathway are involved in growth processes, maintenance and degeneration of the ovaries, with signs of cell proliferation more evident than those of apoptosis in queens, and the opposite for workers.

Keywords: *Apis mellifera*, gene expression, hormonal factors, Hippo pathway, ovary

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios para a determinação das fases das operárias e rainhas da espécie <i>A. mellifera</i> coletadas no presente trabalho. Fonte: Michelette e Soares (1993) e Rembold et al. (1980).....	31
Tabela 2: Processos biológicos enriquecidos e que denotam papéis mais específicos da via Hippo, com o número de genes para cada termo, seus respectivos GO IDs e <i>p-value</i> ( $p < 0,05$ ). .....	39
Tabela 3: Dados referentes aos genes (e variantes) da via Hippo e seus produtos proteicos (aa – aminoácidos) em <i>A. mellifera</i> .....	41
Tabela 4: Sequências de pares de <i>primers</i> desenhados para a análise da expressão gênica. ....	42
Tabela 5: Informações sobre os miRNAs <i>up</i> regulados em larvas de rainhas em comparação às de operárias, e vice-versa, e que possuem sítios de ligação nas extremidades 3'UTR dos mRNAs da via Hippo.....	45
Tabela 6: Análise estatística referente à expressão dos genes da via Hippo em ovários em desenvolvimento (fases: L4, L5S1 e Pb) das castas, operárias e rainhas, de <i>A. mellifera</i> . As marcas em negrito e a coloração cinza indicam resultados estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). ....	47

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Via de sinalização Hippo. No cenário apoptótico, o *core* central da via está ativo, o que possibilita que a cinase Wts interaja diretamente com Yki, fosforilando-a no citoplasma. Essa fosforilação permite com que vias apoptóticas atuem. No cenário proliferativo, o *core* central da via está inativo. Nesse caso, Yki não é fosforilada e entra no núcleo celular, onde interage com fatores de transcrição, para ativar genes reguladores de proliferação..... 19
- Figura 2: Títulos de Hormônio Juvenil (HJ) e 20-hidroxiecdisona (20E) ao longo do desenvolvimento larval de rainhas (em laranja) e operárias (em verde) de abelhas da espécie *A. mellifera*. O retângulo em vermelho destaca o pico hormonal numa fase de pupa farata, pré-pupa 2 (PP2), de ambas as castas e hormônios, indicando ser mais elevado em rainhas. Modificado de Rachinsky et al. (1990). ..... 29
- Figura 3: Apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (A), com destaque para as cinco colônias utilizadas para a coleta do material biológico (B, C, D, E, F). Fonte: Acervo próprio..... 30
- Figura 4: Fases do desenvolvimento (L4, L5S1 e Pb) de operária e rainha de *A. mellifera*. Fonte: Acervo próprio, fotos tiradas com a câmera AxioCam MRm. 31
- Figura 5: Barras contendo realeiras (células de cria de rainha) artificiais para a produção de rainhas. (A) foto da barra completa, (B) detalhe de cada célula de cria na barra e (C) larva em desenvolvimento sobre a geleia real. Fonte: Acervo pessoal..... 32
- Figura 6: Via de sinalização Hippo disponibilizada pela ferramenta KEGG (Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto). Os retângulos verdes representam os genes/proteínas da via Hippo em *D. melanogaster* presentes também em *A. mellifera*, exceto aqueles destacados com bordas em vermelho que representam genes/proteínas presentes apenas na mosca..... 38
- Figura 7: Estrutura dos genes do *core* central e do coativador transcricional Yki da via de sinalização Hippo. As caixas representam os *éxons* e as linhas os *íntrons*. O tamanho dos *éxons*, em pares de base (pb), se encontra abaixo de cada caixa. O tamanho dos *íntrons*, em pares de base (pb), se encontra acima de cada linha. As caixas em azul escuro representam as regiões 5' e 3' não-traduzidas (UTR), enquanto as azuis claras representam a região codificadora de proteína (CDS). O códon de iniciação (ATG) e o códon de terminação (TAA, TAG, TGA) estão indicados em cada gene. Os *primers* estão indicados pelas setas em cor de rosa..... 43
- Figura 8: Diagrama de Venn com os miRNAs *up* regulados durante o desenvolvimento larval das castas da espécie *A. mellifera*, segundo Shi et al (2015) e Guo et al (2016). Em azul estão representados os miRNAs *up* regulados em rainhas, em amarelo estão representados os miRNAs *up* regulados em operárias e na intersecção dos dois conjuntos estão representados os miRNAs indicados como *up* regulados em ambas as castas pelos dois estudos. .... 44
- Figura 9: Expressão relativa (média  $\pm$  erro padrão) dos genes (mRNAs) da via Hippo em amostras de operárias tratadas com HJ (em branco) ou 20E (em cinza)

e seus respectivos controles, usando RT-qPCR e n=5 por condição. Asteriscos indicam diferenças estatísticas: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. .... 46

Figura 10: Expressão relativa (média ± erro padrão) dos genes (mRNAs) da via Hippo em amostras de ovários de rainhas (em laranja) e operárias (em verde) em diferentes fases do desenvolvimento (L4, L5S1 e Pb), usando RT-qPCR e n=5 por condição. Asteriscos indicam diferenças estatísticas: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001. .... 48

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. HIPÓTESE.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
4.1. Identificação dos genes da via Hippo .....	26
4.2. Análise de enriquecimento funcional baseada em <i>Gene Ontology</i> (GO) .....	26
4.3. Anotação gênica.....	27
4.4. Predição de potenciais interações entre microRNAs e genes da via Hippo ....	27
4.5. Tratamentos hormonais.....	28
4.6. Análise da expressão gênica nos ovários de rainhas e operárias .....	29
4.6.1. Coleta do material biológico.....	29
4.7. Extração de RNA .....	32
4.8. Síntese de cDNA.....	33
4.9. PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) .....	34
5. RESULTADOS .....	36
5.1. Identificação dos genes da via Hippo e análise de enriquecimento funcional com base nos termos de <i>Gene Ontology</i> (GO) .....	37
5.2. Anotação dos genes da via Hippo e desenho dos pares de <i>primers</i> .....	40
5.3. Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre larvas de rainhas e de operárias.....	43
5.4. A influência dos hormônios HJ e 20E sobre os genes da via Hippo .....	45
5.5. A expressão dos genes da via Hippo durante o desenvolvimento dos ovários de rainhas e operárias .....	47
6. DISCUSSÃO.....	49
7. REFERÊNCIAS .....	57
8. ANEXOS.....	64

# **1. INTRODUÇÃO**

---

A biodiversidade está cada vez mais ameaçada por mudanças climáticas, fragmentação de habitats e exploração comercial de espécies (Lewin et al, 2018), o que torna urgente o aprimoramento de abordagens de conservação. As abelhas, polinizadores que contribuem para a manutenção do ecossistema e para o suprimento global de alimentos, estão tendo um declínio populacional amplamente reportado em todo o mundo (Goulson et al, 2015; Klein et al, 2017; Meeus et al, 2018).

Naturalmente, a importância ambiental e econômica das abelhas depende de seu sucesso reprodutivo. No entanto, os dados científicos sobre a capacidade reprodutiva das abelhas ainda são poucos e descontínuos, tornando árduos os estudos comparativos no campo de evo-devo e o desenvolvimento de programas eficientes de manejo e conservação. No sentido de aprofundar os conhecimentos sobre a biologia reprodutiva de abelhas, investigamos a espécie *Apis mellifera*.

As abelhas fêmeas (castas), operárias e as rainhas da espécie *A. mellifera*, são oriundas da postura de ovos fecundados (diploides) e diferenciam-se em função do consumo de dietas diferentes, tanto qualitativa quanto quantitativamente, que resultam em fenótipos completamente distintos, incluindo o desenvolvimento diferencial dos ovários (Haydak, 1943; Snodgrass, 1956; Reginato e Cruz-Landim, 2003). Enquanto as larvas que se desenvolvem em rainhas se alimentam somente com geleia real durante todas as fases larvais, aquelas destinadas a se desenvolverem como operárias se alimentam com geleia real até o segundo instar larval e passam a consumir uma mistura de geleia real com mel e pólen a partir do terceiro instar (revisado por Haydak, 1970; Hartfelder e Engels, 1998).

Até o 4º instar larval (L4), os ovários apresentam um crescimento contínuo e possuem tamanho, histologia e estrutura semelhantes entre as castas. Diferenças estruturais tornam-se evidentes a partir do 5º instar (L5), como a intensa redução do número de ovariolos nas operárias (Hartfelder e Steinbrück, 1997; Reginato e Cruz-Landim, 2003).

Em operárias, na fase final de alimentação das larvas (*feeding*, L5F), tal redução é resultado de eventos de morte celular programada (daqui em diante, usaremos o termo **apoptose**) que se iniciam na região central dos ovariolos, onde estão

localizadas as células germinativas e, então, se estendem para as extremidades (basal e apical). Ocorre uma desorganização dos polifusomas (estruturas que formam rosetas, conectando células germinativas, tipicamente encontradas em ovários politróficos meroísticos) pela desintegração dos citoesqueletos de actina e espectrina (Schmidt Capella e Hartfelder, 2002). Em seguida, na fase de tecelagem do casulo (*spinning*, L5S) da mesma casta, surgem progressivamente mais células apoptóticas (Schmidt Capella e Hartfelder, 1998). Já em rainhas, os ovários desenvolvem-se normalmente em L4, L5F e L5S. Os altos níveis de hormônio juvenil (HJ) circulantes na hemolinfa de rainhas L5 protegem os ovariolos da degeneração, ao contrário das larvas de operárias que possuem níveis menores de HJ (Rachinsky et al, 1990; Schmidt Capella e Hartfelder, 1998).

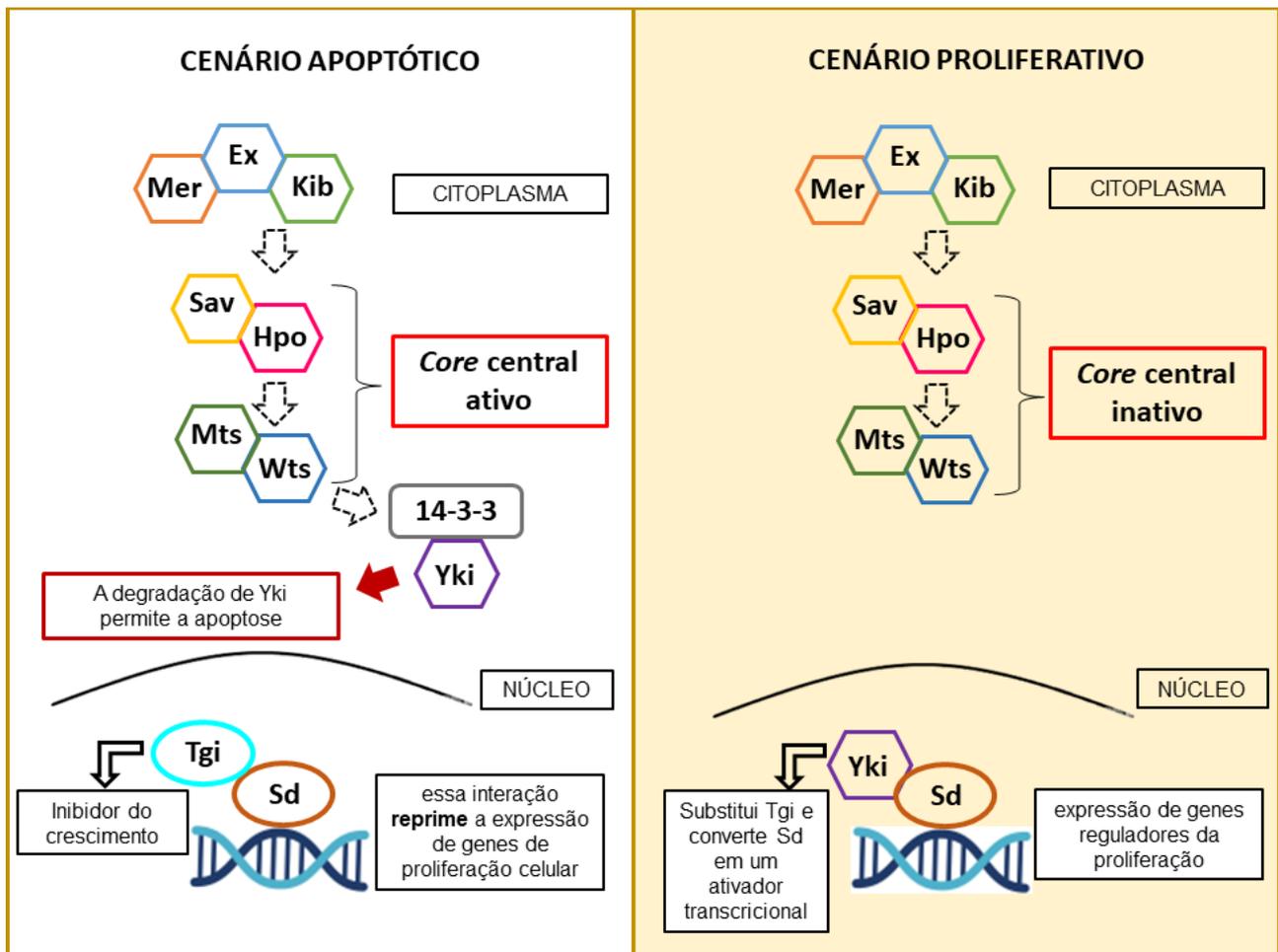
Em pupas faratas (também chamadas de pré-pupas, que se encontram na fase do desenvolvimento imediatamente anterior à muda metamórfica), foi observado que mais de 90% dos ovariolos se degradam em operárias, enquanto nas rainhas são preservados (Hartfelder e Steinbrück, 1997). Assim, o número final e diferencial de ovariolos entre as castas (120-200 filamentos em rainhas e 2-12 em operárias) é determinado antes da transição larva-pupa, os quais se manterão nas fases pupal e adulta (para revisão, ver Hartfelder et al, 2018).

Em pupas de olhos marrons (Pb), de operárias e de rainhas, não encontramos descrições sobre o desenvolvimento dos ovários na literatura. No entanto, nossas observações em laboratório sugerem que, nesta fase, os ovários de cada casta mantêm aparentemente os seus tamanhos até a fase adulta.

O desenvolvimento dos insetos depende da ação hormonal, especialmente HJ (mencionado acima) e 20-hidroxi-ecdisona (20E) (para revisão, ver Texada et al, 2020). Em particular, os hormônios regulam o desenvolvimento de ovários (Leimar et al, 2012; Hartfelder et al, 2018; Ramos et al, 2020), vias de sinalização, como a Hippo (Mirth e Shingleton, 2012; Dong et al, 2015; Gotoh et al, 2015; Wang et al, 2016), bem como pequenos RNAs não-codificadores, denominados microRNAs (miRNAs) (Belles, 2017).

A via Hippo (**Figura 1**) está associada ao controle preciso do tamanho dos órgãos por meio de uma regulação balanceada de proliferação ou apoptose celulares (Zhang, 2015). A via é ativada por diversos reguladores *upstream*, incluindo Merlin (Mer), Expanded (Ex), Kibra (Kb), responsáveis por acionar os

componentes do *core* central, composto pelas cinases Hippo (Hpo) e Warts (Wts) e suas respectivas proteínas adaptadoras Salvador (Sav) e Mats (Mts). A ação do *core* é responsável pela atividade da via, pois possibilita que Wts interaja diretamente com o coativador transcricional Yorkie (Yki), fosforilando três resíduos de serina. Isto gera um local de ligação para as proteínas da família 14-3-3. Uma vez que a via está ativa, o complexo (Yki/14-3-3) é retido no citoplasma e a proteína Yki é degradada, enquanto que, dentro do núcleo, ocorre a interação entre o fator de transcrição Scalloped (Sd) com o inibidor de crescimento contendo o domínio Tondu (tgi). Essa interação (Sd-tgi) reprime a expressão de genes de proliferação celular. A degradação de Yki permite com que vias apoptóticas atuem e, ainda, um curioso mecanismo de manutenção deste cenário, chamado de regulação por *feedback* negativo, é desencadeado: ocorre um aumento da expressão de transcritos do gene Yki que, por sua vez, induz principalmente o aumento de expressão da proteína Wts. Por outro lado, quando a atividade da via é reduzida, não ocorre a fosforilação da proteína Yki e nem a formação do complexo Yki /14-3-3. Portanto, Yki é capaz de entrar no núcleo da célula e se complexar com o fator de transcrição Scalloped (Sd), ativando a expressão de genes reguladores da proliferação, como a G1/S-specific cyclin-E1 (CycE1), e da sobrevivência celular, como Death-associated inhibitor of apoptosis 1 (Diap1). As informações deste parágrafo estão baseadas nos seguintes artigos: Liu et al, 2016; Park et al, 2016; Kwon et al, 2022. Os genes e proteínas/enzimas citados compõem o eixo principal da via Hippo, a qual possui dezenas de outros membros associados.



**Figura 1:** Via de sinalização Hippo. No cenário apoptótico, o core central da via está ativo, o que possibilita que a cinase Wts interaja diretamente com Yki, fosforilando-a no citoplasma. Essa fosforilação permite com que vias apoptóticas atuem. No cenário proliferativo, o core central da via está inativo. Nesse caso, Yki não é fosforilada e entra no núcleo celular, onde interage com fatores de transcrição, para ativar genes reguladores de proliferação.

A regulação pós-transcricional de genes pertencentes a diferentes vias de sinalização também está intimamente relacionada com diferenças morfo-fisiológicas que ocorrem ao longo do desenvolvimento de insetos, incluindo fêmeas da espécie *A. mellifera* (Asgari, 2013). Um mecanismo evolutivamente conservado pelo qual essa regulação pode se dar é por meio da ação de miRNAs (Lee et al, 1993; Cai et al, 2009). Após expressão e processamento, os miRNAs maduros resultantes possuem entre 19–26 nucleotídeos e se interagem com mRNAs alvos por meio de complementaridade de bases, levando-os à degradação ou impedindo a tradução. Em animais, as extremidades 3'UTRs de mRNAs são alvos mais frequentes de interações não perfeitas com miRNAs (revisado por Feitosa et al, 2022). Cabe ressaltar que na extremidade 5' dos miRNAs encontra-se uma região chamada *seed*, que envolve todos os ou parte

dos 8 primeiros nucleotídeos que, por sua vez, se ligam mais fielmente aos transcritos alvos do que a porção de ~2/3 que se encontra mais à extremidade 3' da sequência (Didiano e Hobert, 2006). É importante destacar que alguns miRNAs possuem funções relacionadas a aspectos reprodutivos de insetos como, por exemplo, no desenvolvimento de ovários (Ashby et al, 2016; Chen e Shi, 2020), na (in)ativação de ovários (Macedo et al, 2016), na regulação da ovogênese em ovários panoísticos e meroísticos (Tanaka e Piulachs, 2012) e, também, na oviposição (Chen et al, 2017). Sabe-se que a via Hippo regula a expressão de alguns miRNAs, como por exemplo o bantam e, conseqüentemente, processos apoptóticos e de proliferação celular, como observado durante o crescimento de *D. melanogaster* (Hipfner et al, 2002; Brennecke et al, 2003; Xu et al, 2004; Barry e Stephen, 2006).

Pelo exposto, o desenvolvimento de insetos e, em última instância, a reprodução, integram vias nutricionais, hormonais, de sinalização, as quais são responsivas a ou ativadoras da expressão de genes codificadores e não-codificadores de proteínas (Asgari, 2013; Belles, 2017; Mo, 2017). Todo esse *crosstalk* pode, em insetos que apresentam plasticidade fenotípica, como as castas de *A. mellifera*, culminar em destinos morfo-fisiológicos diferentes (Barchuk et al, 2007). Desse modo, propomos no presente trabalho analisar, pela primeira vez em abelhas, se os hormônios HJ e 20E influenciam a expressão de genes da via Hippo e se esta via está relacionada com o desenvolvimento diferencial dos ovários entre as castas de *A. mellifera*.

## **2. HIPÓTESE**

---

Hipotetizamos que os genes da via Hippo desempenham um papel importante no desenvolvimento diferencial entre as castas (rainha e operária) da espécie *A. mellifera*, sob potencial regulação por miRNAs e por hormônios, HJ e 20E. Além disso, que tal via tenha um papel decisivo no desenvolvimento dos ovários (num contexto mais amplo) e, conseqüentemente, na futura capacidade reprodutiva das fêmeas adultas de *A. mellifera*, por meio de um balanço coordenado, porém diferencial entre castas, que envolve o crescimento (proliferação celular) e a degeneração (apoptose) de ovariolos (num contexto mais específico). Para testar a hipótese, focamos em genes do *core* central e o coativador transcricional Yki.

### **3. OBJETIVOS**

---

- Identificar todos os genes da via Hippo em *A. mellifera* e realizar uma análise de enriquecimento funcional baseada em *Gene Ontology*;
- Averiguar se miRNAs diferencialmente expressos entre larvas de rainhas e de operárias da espécie *A. mellifera* possuem sítios de ligação nas 3'UTRs de mRNAs transcritos a partir de genes do eixo principal da via Hippo;
- Analisar a expressão de genes da via Hippo, tanto do *core* central (Hpo, Sav, Wts, Mts, e variantes quando for o caso) quanto *downstream* (Yki e variantes) em amostras de pupas faratas (fase 2, PP2) de operárias tratadas com HJ e 20E;
- Analisar a expressão dos genes da via Hippo, tanto do *core* central (Hpo, Sav, Wts, Mts, e variantes quando for o caso) e quanto *downstream* (Yki e variantes) nos ovários de rainhas e operárias da espécie *A. mellifera* em três pontos diferentes do desenvolvimento: na fase L4, quando as estruturas são semelhantes entre as castas; na fase L5S1, quando ocorre o ápice dos eventos degenerativos em operárias e desenvolvimento contínuo em rainhas; na fase Pb, quando os eventos degenerativos já cessaram e o número final e diferencial de ovariolos entre as castas encontra-se definido.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

---

#### 4.1. Identificação dos genes da via Hippo

O primeiro passo foi identificar todos os genes (codificadores e não codificadores de proteínas) da via Hippo em *A. mellifera* descritos até o momento. Para isso, realizamos buscas por meio da ferramenta *KEGG Pathway Database* (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), utilizando o prefixo “ame” (relativo à espécie *A. mellifera*) e a palavra-chave “Hippo”. O resultado leva à entrada ame04391, relacionada com a entrada dme04391 (*Hippo signaling pathway - fly*), e atalho para o mapa contendo ortólogos (*Ortholog table*) da via em 118 espécies de insetos. A partir dos *Gene IDs* recuperados do mapa de ortólogos do KEGG, foram realizadas buscas na plataforma NCBI ([https://ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_euk/Apis\\_mellifera/104/](https://ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/Apis_mellifera/104/)) para a identificação dos potenciais transcritos variantes (*RefSeqs*) de cada gene.

#### 4.2. Análise de enriquecimento funcional baseada em *Gene Ontology* (GO)

Após a identificação dos genes da via Hippo presentes no genoma de *A. mellifera* (item 4.1), realizamos uma análise de enriquecimento funcional com base nos termos de *Gene Ontology* (GO) por meio de ferramentas disponíveis na plataforma *g:Profiler*. O intuito da análise foi verificar as funções moleculares e os processos biológicos em que os genes da via estão envolvidos. Por não haver muitas informações de GO disponíveis para a espécie *A. mellifera*, recuperamos as informações dos respectivos ortólogos de *D. melanogaster*, mais especificamente o identificador FBgn (*FlyBase ID*), utilizando a ferramenta *g:Orth* (*Orthology Search* - <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/orth>). Em seguida, os FBgns serviram de entrada para a análise na ferramenta *g:GOST* (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>). Como resultado, consideramos apenas os conjuntos gênicos representados por termos de GO com significância estatística de  $p < 0,05$ . Sempre que necessário, consultamos a base de dados *Gene Ontology and GO Annotations* (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) para checar as definições detalhadas de termos.

### 4.3. Anotação gênica

Para o prosseguimento do presente estudo, selecionamos os genes do *core* central da via Hippo (Hpo, Sav, Mts, Wts) e seu coativador transcricional (Yki). Tais genes orquestram os principais mecanismos de ação da via: a proliferação ou a apoptose celular. Recuperamos as sequências nucleotídicas, em formato fasta, a partir das *RefSeqs* obtidas no NCBI (**item 4.1**) dos genes supracitados. Em seguida, anotamos cada uma das arquiteturas gênicas, definindo os tamanhos e os limites das regiões não-traduzidas (5' e 3' UTRs), da região codificadora (CDS), de *éxons* e de *íntrons* por meio da plataforma Artemis (Rutherford et al, 2000). A arquitetura gênica foi útil para o desenho de pares de *primers* utilizados nas análises de expressão gênica (**item 4.6**).

### 4.4. Predição de potenciais interações entre microRNAs e genes da via Hippo

Utilizamos a base de dados Google Acadêmico para o levantamento de artigos científicos sobre a expressão diferencial de miRNAs durante o desenvolvimento larval das castas de *A. mellifera*. Encontramos três artigos: Shi et al (2015), Ashby et al (2016), Guo et al (2016). Ashby e colaboradores (2016), apesar de detectar 72 miRNAs diferencialmente expressos entre as larvas diploides, não disponibilizaram tais dados no texto principal do artigo ou no material suplementar e, portanto, o estudo foi excluído da análise. Os dados estatisticamente significativos de expressão diferencial, segundo os critérios adotados pelos autores de cada artigo, foram organizados em planilha excel e separados em dois conjuntos: miRNAs super-expressos (a partir daqui, utilizaremos o termo *up* regulado) em rainhas ou em operárias (compreendendo que um miRNA *up* regulado numa casta é, conseqüentemente, *down* regulado na outra). As sequências dos miRNAs maduros, em formato fasta, foram recuperadas na base de dados *miRBase* (<https://www.mirbase.org/summary.shtml?org=ame>), versão 22.1. A fim de identificar potenciais sítios de ligação de miRNAs nas extremidades 3'UTR de mRNAs (dos genes do *core* central e Yki) da via Hippo (anotados no **item 4.3**), utilizamos o *software RNA Hybrid* (Rehmsmeier et al, 2004) disponível na

plataforma *BibiServ* (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>) com os seguintes parâmetros: *threshold* para energia livre mínima (MFE) < -15.0 kcal/mol (Li et al, 2021; Du et al, 2022), tamanho das *seeds* dos miRNAs variando entre 1-8, 1-7, 2-8, 2-7 nucleotídeos, sem pareamento de bases nitrogenadas G·U entre as *seeds* e as 3'UTRs.

#### 4.5. Tratamentos hormonais

As amostras, apenas de operárias, referentes aos tratamentos hormonais (hormônio juvenil [HJ] e 20-hidroxiecdisona [20E]) foram gentilmente cedidas pela MSc. Natália Hernandez.

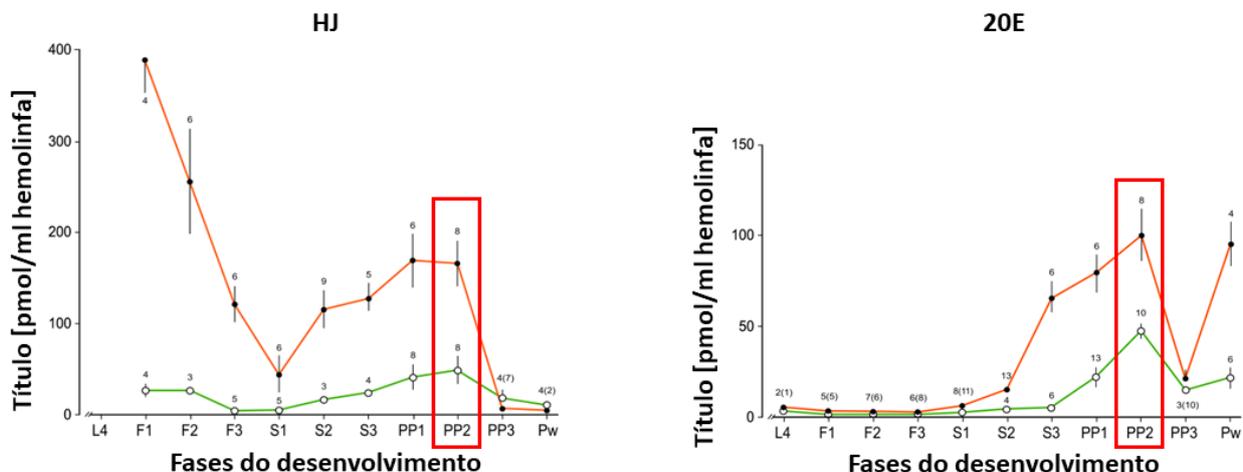
Coletamos operárias da espécie *A. mellifera*, mantidas no apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), com base nos critérios estabelecidos por Michelette e Soares (1993).

Para testar possíveis efeitos de HJ sobre a expressão dos genes da via Hippo, foi preparada uma solução de 5 µg/µL deste hormônio diluído em hexano (*Synth*). Um total de 2 µL dessa solução (10 µg/µL) foi aplicada topicamente numa fase de pupa farata (pré-pupa 2, PP2) e, como grupo controle, PP2 receberam topicamente 2 µL de hexano. Após os tratamentos, os indivíduos foram mantidos em estufa.

Para testar possíveis efeitos de 20E sobre a expressão dos genes da via Hippo, foi preparada uma solução de 20 µg/µL deste hormônio diluído em etanol absoluto (MERCK). Em seguida, a solução foi diluída em solução salina (NaCl 0,9%), obtendo-se uma solução de trabalho na concentração de 5 µg/µL. Pré-pupas (PP2) receberam injeção de 1 µL desta solução na região ventro-posterior. Como grupo controle, PP2 foram injetadas com 1 µL de salina.

Após 6 horas, 5 indivíduos de cada grupo experimental (HJ e controle, 20E e controle) foram coletados, individualmente colocados em tubos *eppendorf* 1,5 mL contendo 500 µL de reagente *TRIzol*<sup>TM</sup> (*Invitrogen*) e armazenados em freezer -80°C até o momento da extração de RNA (**item 4.7**). A escolha de PP2 deve-se ao fato de que os níveis de HJ e de 20E nesta fase são menores em operárias em comparação às rainhas (Rachinsky et al. 1990) (**Figura 2**). Dessa forma, o

intuito dos tratamentos foi elevar a concentração de HJ e 20E em operárias, simulando um ambiente hormonal mais próximo ao observado em rainhas.



**Figura 2:** Títulos de Hormônio Juvenil (HJ) e 20-hidroxiecdisona (20E) ao longo do desenvolvimento larval de rainhas (em laranja) e operárias (em verde) de abelhas da espécie *A. mellifera*. O retângulo em vermelho destaca o pico hormonal numa fase de pupa farata, pré-pupa 2 (PP2), de ambas as castas e hormônios, indicando ser mais elevado em rainhas. Modificado de Rachinsky et al. (1990).

#### 4.6. Análise da expressão gênica nos ovários de rainhas e operárias

##### 4.6.1. Coleta do material biológico

Para a obtenção de amostras de operárias e de rainhas em desenvolvimento e dissecação de ovários, utilizamos indivíduos provenientes de cinco colônias da abelha africanizada *A. mellifera*, mantidas no mesmo apiário mencionado no item 4.5 (Figura 3).

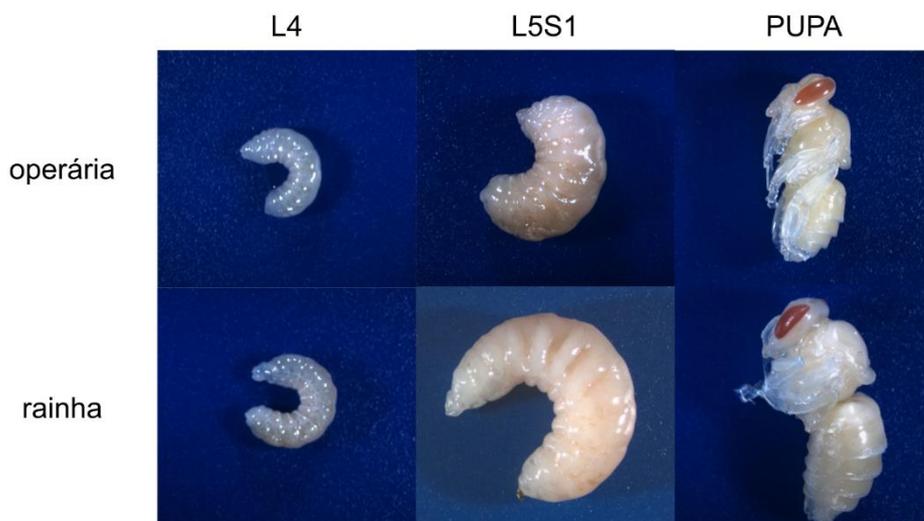


**Figura 3:** Apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (A), com destaque para as cinco colônias utilizadas para a coleta do material biológico (B, C, D, E, F). Fonte: Acervo próprio.

Dissecamos ovários de operárias e de rainhas nas seguintes fases de desenvolvimento: quarto instar larval (L4), quinto instar larval em início de tecelagem do casulo (L5S1) e pupa de olho marrom (Pb) (**Figura 4**). A identificação das fases para as operárias foi baseada em critérios descritos por Michelette e Soares (1993) e para as rainhas foi baseada em critérios descritos por Rembold et al. (1980) (**Tabela 1**). As larvas em L2, de cada uma das colônias, foram transferidas para barras contendo realeiras artificiais e, foram mantidas em recrias (**Figura 5**). A fase L2 foi escolhida pois, durante esse instar, as larvas recebem a mesma geleia nutritiva e, portanto, continuam bipotentes no que tange ao desenvolvimento de uma ou outra casta (revisado por Maleszka, 2018). As amostras de operárias foram obtidas diretamente de favos contendo células de cria dessa casta.

A dissecação dos ovários foi realizada com o auxílio da lupa *SZH10 Research stereo* e de pinças esterilizadas, colocados em tubos *eppendorf* 1,5 mL contendo 500  $\mu$ L de reagente *TRIZOL™* (*Invitrogen*) e armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até

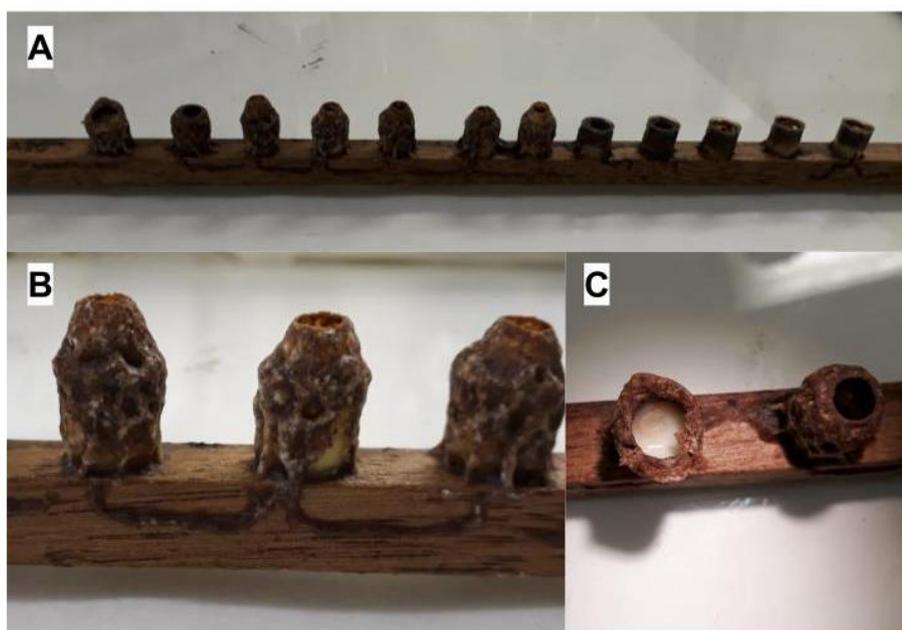
o momento da extração de RNA (**item 4.7**). Para cada fase do desenvolvimento por colônia, foram montados *pools* contendo 20 pares de ovários de operárias ou 5 pares de ovários de rainhas.



**Figura 4:** Fases do desenvolvimento (L4, L5S1 e Pb) de operária e rainha de *A. mellifera*. Fonte: Acervo próprio, fotos tiradas com a câmera AxioCam MRm.

**Tabela 1:** Critérios para a determinação das fases das operárias e rainhas da espécie *A. mellifera* coletadas no presente trabalho. Fonte: Michelette e Soares (1993) e Rembold et al. (1980)

<b>Casta</b>	<b>Fase</b>	<b>Critério</b>
Operária	L4	peso - 0,004 a 0,0248 g
	L5S1	célula de cria operculada, larva com intestino cheio
	Pb	olho marrom e sem pigmentação do mesothorax dorsal
Rainha	L4	peso entre 0,020 g a 0,030 g
	L5S1	célula de cria operculada, larva com intestino cheio, peso ~ 0,23 g
	Pb	olho marrom e sem pigmentação do mesothorax dorsal



**Figura 5:** Barras contendo realeiras (células de cria de rainha) artificiais para a produção de rainhas. (A) foto da barra completa, (B) detalhe de cada célula de cria na barra e (C) larva em desenvolvimento sobre a geleia real. Fonte: Acervo pessoal.

#### 4.7. Extração de RNA

As amostras mantidas em *Trizol*<sup>TM</sup>® foram descongeladas à temperatura ambiente e posteriormente agitadas no vórtex durante 5 minutos. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 5 minutos para lise de membranas e dissociação dos complexos nucleoproteicos. Logo após, foram adicionados 100 µL de clorofórmio (*Merck*). Os tubos foram agitados manualmente por 15 segundos e incubados à temperatura ambiente por 3 minutos e, em seguida, foram centrifugados a 13.000 rpm a 4°C, por 15 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de 1,5 mL e acrescidos de 250 µL de isopropanol (*Merck*). Após 10 segundos de agitação em vórtex, as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e os tubos centrifugados a 13.000 rpm a 4°C, por 30 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os produtos precipitados (*pellets*) lavados com 500 µL de etanol 75% (*Merck*). Após essa etapa, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm, a 4°C, por 15 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e o etanol residual evaporado à temperatura ambiente. Os *pellets* foram ressuspensos em 15 µL de água ultra-pura (*UltraPure*<sup>TM</sup> DNase/RNase-Free Distilled Water, *Invitrogen*). A pureza (estimada por meio da razão entre os valores da leitura a 260 e 280

nm) e concentração (dada em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) da solução final de cada amostra foram obtidas por absorvância óptica a 260 nm, em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific Inc*). As amostras foram estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o preparo do cDNA.

#### 4.8. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita a partir do RNA total extraído. Volumes de RNA total com massa correspondente a 1  $\mu\text{g}$  para cada *pool* de ovários (**item 4.6.1**) e 3  $\mu\text{g}$  para amostras tratadas com hormônios (**item 4.5**) foram completados com água ultra-pura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, 0,1% (v/v), *Sigma*) e autoclavada q.s.p. 8  $\mu\text{L}$ . Para remoção de possível contaminação por resíduos de DNA, foi adicionado 1,0  $\mu\text{L}$  10X *DNase I Reaction Buffer* (*Invitrogen*), 0,5  $\mu\text{L}$  de *DNase I* (1 U/ $\mu\text{L}$ , *Invitrogen*) e 0,5  $\mu\text{L}$  de água DEPC 0,1% e as amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*) (25 mM, *Invitrogen*) com posterior incubação em termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*) a  $65^{\circ}\text{C}$ , por 10 minutos, para inativação da enzima *DNase I*. O RNA total tratado com *DNase* foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA, em volume final de 20  $\mu\text{L}$ , utilizando-se, por amostra, o seguinte protocolo: 1  $\mu\text{L}$  de oligo(dT) 12-18 (500 ng/mL, *Invitrogen*), 1  $\mu\text{L}$  de uma mistura de dNTPs (10 mM, *Invitrogen*), com incubação em termociclador a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos; 4  $\mu\text{L}$  de tampão 5x *First Strand Buffer* (*Invitrogen*), 2  $\mu\text{L}$  de ditriotretitol (DDT - 0,1 M, *Invitrogen*), 1  $\mu\text{L}$  de inibidor de RNase (*RNase OUT™*, 40 U/ $\mu\text{L}$ , *Invitrogen*), com incubação a  $42^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos; 1  $\mu\text{L}$  da enzima *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (200 U/ $\mu\text{L}$ , *Invitrogen*), com incubação a  $42^{\circ}\text{C}$  por 50 minutos, com posterior ciclo de inativação da enzima a  $70^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Como controles, foram preparadas reações sem a adição da enzima *SuperScript™ II* (C1, controle 1) ou sem a adição de RNA molde (C2, controle 2).

#### 4.9. PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

A fim de garantir a especificidade na amplificação de cada variante de genes da via Hippo, desenhamos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*, vide **Tabela 4** do **item 5.2** dos Resultados) para gerar fragmentos entre de 80-150 pares de bases (pb) a partir das anotações manuais realizadas por meio da plataforma Artemis (**item 4.3**). A especificidade de cada um dos pares de *primers* foi avaliada utilizando a ferramenta *Primer-BLAST* ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)). Para descartar eventual contaminação com DNA genômico foram desenhados *primers Forward* e *Reverse* que, preferencialmente, se anelam em éxons distintos, portanto, flanqueando regiões intrônicas. O comprimento dos *primers* variou entre 20-22 nucleotídeos, com temperatura de anelamento entre 52°C-60°C. Para uma primeira verificação da qualidade dos pares de *primers* foi feita PCR convencional e eletroforese em gel de agarose 2% para a visualizar a ocorrência, ou não, dos produtos amplificados de interesse, a formação de *primer-dimers* e outros produtos inespecíficos.

Em seguida, realizamos uma diluição em série (1:5) de concentrações conhecidas de cDNA para a construção de uma curva de regressão linear específica para cada par de *primers*. O valor de *Slope* (que deve ser entre -3,6 e -3,1) foi utilizado para determinar a eficiência da reação pela fórmula  $E=10^{(-1/Slope)}$ . Os valores de eficiência da reação ficaram entre 90% e 110%.

Para as análises de PCR quantitativa em tempo real foi utilizado o protocolo do reagente *2x qPCRBIO SyGreen Mix Separate-ROX (PCRBIO SYSTEMS)*. A reação final foi constituída de um volume final de 15 µL, contendo: 7,5 µL de solução *2x qPCRBIO SyGreen Mix Separate-ROX (PCRBIO SYSTEMS)*, 4,8 µL de água, 0,6 µL de cada *primer, forward* e *reverse* (10 pmol/µL) e 1,5 µL da solução de cDNA (10 ng/µL). As reações foram montadas em triplicatas técnicas e processadas em aparelho *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. Para os pares de *primers* com eficiência ótima foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 2 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 5 segundos e a temperatura de cada par de *primers* por 25 segundos. O gene codificador da proteína ribossomal L32 (RpL32) (número de acesso da *RefSeq* no NCBI: NM\_001011587.1) foi utilizado como normalizador das reações

de *RT-qPCR* dos genes da via Hippo (Lourenço et al, 2008), e o par de *primers* utilizado encontra-se na **Tabela 4** do **item 5.2** dos Resultados. Foram utilizados os controles negativos: sem molde de cDNA (NTC), e C1 e C2 (**item 4.8**).

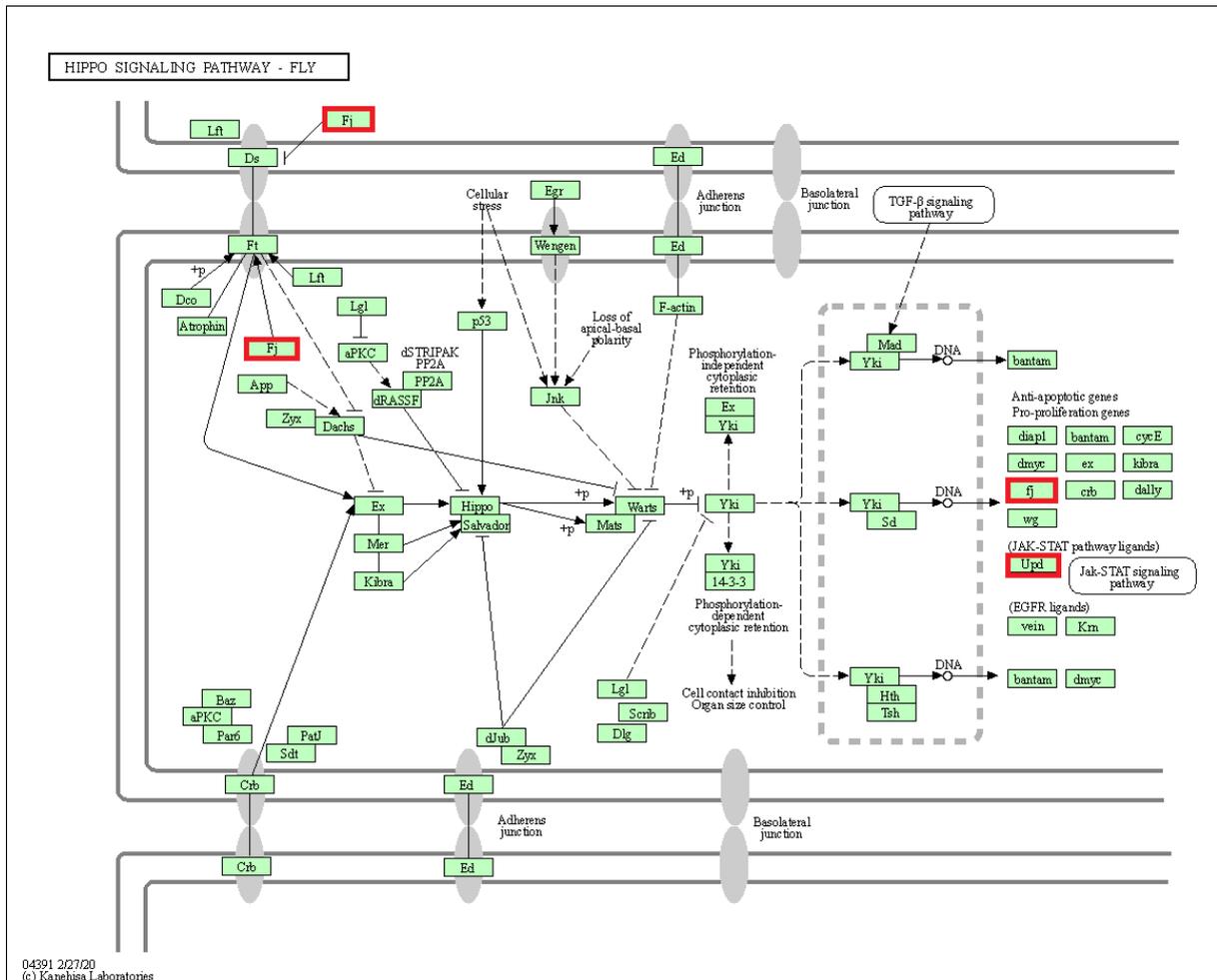
A análise dos resultados de RT-qPCR foi feita sobre os valores de Cq emitidos para cada triplicata de uma mesma amostra. Os dados foram organizados em planilhas do Excel for *Windows (Microsoft)*, para cada gene. Foi feita a média dos valores de Cq de cada triplicata, e posteriormente, foi utilizado o método tradicional  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (*Real-time PCR handbook, Thermo Fisher Scientific Inc, 2016 - goo.gl/JD7fNk*). Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* ( $p>0,05$ ). Confirmada a distribuição normal, os dados foram analisados utilizando o *software Prism 6 (GRAPHPAD)* e nível de significância de 5% ( $p<0,05$ ), por meio dos seguintes testes estatísticos: para as amostras de ovários de rainhas e operárias, *Two-way ANOVA* seguido dos *post-hoc Tukey* (comparação entre as fases numa mesma casta) e *Sidak* (comparação de uma mesma fase entre as castas); para os tratamentos hormonais, *t de Student*.

## **5. RESULTADOS**

---

### 5.1. Identificação dos genes da via Hippo e análise de enriquecimento funcional com base nos termos de *Gene Ontology* (GO)

Com base nas informações disponíveis no KEGG (Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto), identificamos, a princípio, 52 e 46 genes relacionados à via Hippo em *D. melanogaster* e *A. mellifera*, respectivamente. Para os seis genes em que o KEGG indicou presença apenas no genoma da mosca (Fj, p53, PatJ, TSH, diap1 e UPD), usamos as suas sequências de aminoácidos como entrada para buscas adicionais, por meio de alinhamentos do tipo BlastP e tBlastN, contra dados de *RefSeqs* (nr) ou de genoma da abelha (*assembly* Amel\_HAV3.1), respectivamente, disponíveis no NCBI. Com exceção de Fj e UPD, os demais quatro genes foram identificados, totalizando 50 em *A. mellifera* (**Figura 6 e Tabela S1** do anexo, com informações a respeito do *Gene ID*, *RefSeqs* dos respectivos RNAs (codificadores e 1 não codificador) e seus variantes). Com o intuito de compreender o perfil funcional da via Hippo e, também, considerando que *D. melanogaster* é o inseto que possui uma maior quantidade de informações na literatura e nos bancos de dados, os ortólogos dos 50 genes de *A. mellifera*, obtidos na mosca, foram utilizados como entrada para a análise de enriquecimento funcional. Esta estratégia tem sido amplamente utilizada por outros grupos de pesquisa.



**Figura 6:** Via de sinalização Hippo disponibilizada pela ferramenta KEGG (Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto). Os retângulos verdes representam os genes/proteínas da via Hippo em *D. melanogaster* presentes também em *A. mellifera*, exceto aqueles destacados com bordas em vermelho que representam genes/proteínas presentes apenas na mosca.

O resultado da análise baseada em termos do *Gene Ontology* está dentro do esperado, ou seja, mostra que a ação da via Hippo depende de proteínas/enzimas com funções que incluem, principalmente, atividades reguladoras que vão da transdução de sinal extracelular (GO:0007165 [*p-value* 5,989×10<sup>-18</sup>]) desencadeando cascatas de sinalização intracelular (GO:0035329 [2,082×10<sup>-32</sup>]) até a transcrição, cinases (GO:0016301 [9,742×10<sup>-2</sup>], GO:0004385 [1,143×10<sup>-2</sup>]) que se ligam e fosforilam membros da própria via (GO:0019900 [8,796×10<sup>-4</sup>]). Além disso, também observamos a ocorrência de enriquecimento para outros tipos de função “ligante” (GO:0005488 [4,414×10<sup>-7</sup>], GO:0005515 [1,846×10<sup>-12</sup>]), com receptores (GO:0005154 [1,089×10<sup>-3</sup>]) e moléculas de adesão celular (GO:0050839 [1,818×10<sup>-3</sup>]) ou, ainda, atuando como ou

associando-se a fatores de transcrição (GO:0008134 [ $7,357 \times 10^{-5}$ ]). Os resultados de *Gene Ontology* também validam a conservação evolutiva dos processos biológicos de insetos em que os genes da via Hippo atuam, em particular em *A. mellifera*, entre eles: desenvolvimento (morfogênese) de tecidos (GO:0009888 [ $4,189 \times 10^{-31}$ ], GO:0048729 [ $1,427 \times 10^{-19}$ ]) e órgãos (GO:0048513 [ $2,016 \times 10^{-23}$ ], GO:0009887 [ $2,209 \times 10^{-21}$ ]), crescimento (GO:0048589 [ $8,460 \times 10^{-16}$ ], GO:0040007 [ $1,189 \times 10^{-15}$ ]), proliferação celular positiva (GO:0008283 [ $1,443 \times 10^{-18}$ ]) e negativa (GO:0008285 [ $3,016 \times 10^{-12}$ ]), regulação positiva da morte celular (GO:0010942 [ $6,253 \times 10^{-11}$ ]), comunicação celular (GO:0007154 [ $6,762 \times 10^{-16}$ ]), especificação do destino (GO:0001708 [ $1,092 \times 10^{-10}$ ]) e da diferenciação (GO:0030154 [ $3,892 \times 10^{-18}$ ]) celulares.

Também observamos um conjunto de termos de GO que indicam a participação da via Hippo em processos biológicos mais específicos, que vão além de seus conhecidos papéis canônicos, que incluem: desenvolvimento de epitélio, desenvolvimento do sistema nervoso, resposta a estímulos, desenvolvimento de células germinativas e metamorfose (**Tabela 2**).

**Tabela 2:** Processos biológicos enriquecidos e que denotam papéis mais específicos da via Hippo, com o número de genes para cada termo, seus respectivos GO IDs e *p-value* ( $p < 0,05$ ).

<b>Processo biológico</b>	<b>GO ID</b>	<b>Número de genes</b>	<b><i>p-value</i></b>
Desenvolvimento de epitélio	GO:0060429	38	$1,559 \times 10^{-32}$
	GO:0002009	26	$6,379 \times 10^{-20}$
	GO:0030855	21	$1,214 \times 10^{-16}$
	GO:0002064	17	$2,930 \times 10^{-12}$
Desenvolvimento do sistema nervoso	GO:0022008	27	$4,520 \times 10^{-16}$
	GO:0007399	29	$4,037 \times 10^{-16}$
	GO:0048699	26	$1,397 \times 10^{-15}$
Resposta a estímulos	GO:0048583	28	$1,555 \times 10^{-16}$
	GO:0051716	35	$1,954 \times 10^{-14}$
	GO:0050896	36	$7,507 \times 10^{-11}$
	GO:0048477	23	$2,705 \times 10^{-15}$
	GO:0007292	23	$1,500 \times 10^{-14}$

Desenvolvimento de células germinativas	GO:0007281	23	1,783×10 <sup>-13</sup>
	GO:0007276	24	2,394×10 <sup>-12</sup>
	GO:0030707	15	2,719×10 <sup>-10</sup>
Metamorfose	GO:0048707	17	1,546×10 <sup>-10</sup>

Os termos de *Gene Ontology* relacionados aos processos biológicos apresentados acima merecem destaque dada a coerência com contextos da ontogenia de *A. mellifera*, sugerindo a participação da via Hippo. Por exemplo, no desenvolvimento desigual de ovários entre as castas dessa abelha, desencadeado por estímulos nutricionais distintos e sob o controle de hormônios ao longo do processo de metamorfose. Os termos destacados na tabela acima possuem suporte experimental (*Direct assay* [IDA], *Mutant phenotype* [IMP], *Genetic interaction* [IGI], *Physical interaction* [IPI] e *Expression pattern* [IEP]), segundo o *Gene Ontology*. Tais informações reforçaram a continuidade desse trabalho com foco na expressão de genes da via Hippo: 1 - em fases onde os ovários das castas se desenvolvem e se diferenciam e, também, 2 - sob potencial influência hormonal.

## 5.2. Anotação dos genes da via Hippo e desenho dos pares de *primers*

Os seguintes genes do *core* central foram anotados: Hpo (Gene ID: 410208) e seus variantes Hpo X1 (XM\_006566028.2), Hpo X2 (XM\_393691.6) e Hpo X3 (XM\_016914482.1), Sav (Gene ID: 552413, XM\_016912444.2), Wts (Gene ID: 411678, XM\_026440102.1), Mts (Gene ID: 409540) e seus variantes Mts X1 (XM\_006568252.3) e Mts X2 (XM\_393046.7), e Yki (Gene ID: 408292) e seus variantes Yki X1 (XM\_026443161.1) e Yki X2 (XM\_391844.6). Observamos que a variante Yki X2 não possui o domínio conservado HUL4 (número de acesso no *Conserved Domain Database*, CDD-NCBI: cl34867) e, portanto, não é alvo de fosforilação por Wts e não desencadeia processos apoptóticos. Por esse motivo, a sua expressão não foi analisada. As arquiteturas dos demais genes e variantes foram anotados, possibilitando a construção dos pares de *primers* específicos. Informações referentes aos genes e aos seus respectivos pares de *primers* estão disponibilizados nas **Tabelas 3 e 4**, e **Figura 7**.

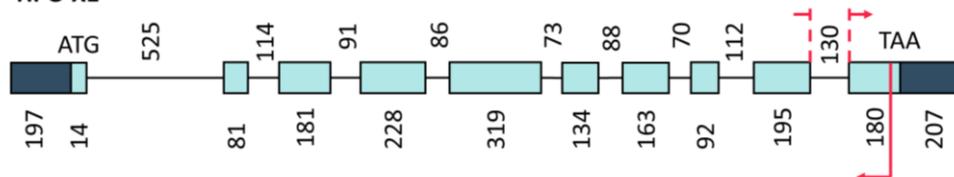
**Tabela 3:** Dados referentes aos genes (e variantes) da via Hippo e seus produtos proteicos (aa – aminoácidos) em *A. mellifera*.

	<b>Símbolo</b>	<b>Nome</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Tamanho da proteína (aa)</b>
<i>Core central</i>	Hpo X1	Serine/threonine-protein kinase 3	10	528
	Hpo X2			521
	Hpo X3			478
	Sav	Scaffold protein salvador	5	382
	Mts X1	MOB kinase activator-like 1	12	224
	Mts X2			217
	Wts	Serine/threonine-protein kinase Warts	4	1137
<i>Downstream</i>	Yki X1	Transcriptional coactivator YAP1	10	507

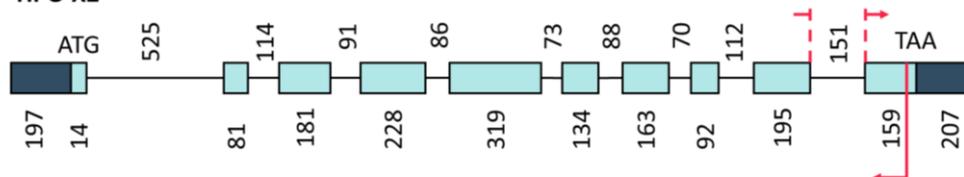
**Tabela 4:** Sequências de pares de *primers* desenhados para a análise da expressão gênica.

Símbolo do gene	<i>primer Forward</i>	<i>primer Reverse</i>	Tamanho do amplicon (cDNA, em pb)	Temperatura de anelamento
Hpo X1	5' TTTGACTTCATAAACAACC 3'	5' CTTCGTTTGGTACCTTCTTC 3'	133	56°C
Hpo X2	5' TCGACTTCCTGAAGTTTCTC 3'	5' TATCCATAGCGTCAAGAATC 3'	138	56°C
Hpo X3	5' GATTTGACTTCGCATTTTT 3'	5' TTTCTGCATCCAAATTAGCC 3'	117	58°C
Sav	5' ACAACAATGAGTGCAGTAGG 3'	5' GCAGGTGAAAGTCCAGAATG3'	170	58°C
Mts X1	5' GCAGTAAATAAAAAAAAAAATG 3'	5' CTTTCTTCAGTACAGAATTC 3'	98	52°C
Mts X2	5' GGGTTGCAGTAAATACTGTTG 3'	5' CTTTCTTCAGTACAGAATTC 3'	82	54°C
Wts	5' TGTGATTGGTGGAGTGTGG3'	5' TCCATACCTCCGCGGAAAG 3'	158	60°C
Yki X1	5' GTTTCCTTCATCTTGGATAATC 3'	5' CTGAATACCACCACCTGTAG 3'	159	56°C
RPL32	5' CGTCATATGTTGCCAACTGGT 3'	5' TTGAGCACGTTCAACAATGG 3'	150	60°C

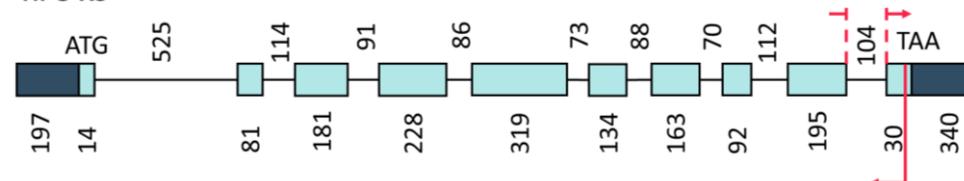
**HPO X1**



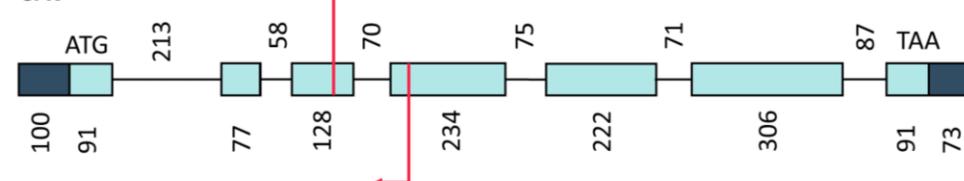
**HPO X2**

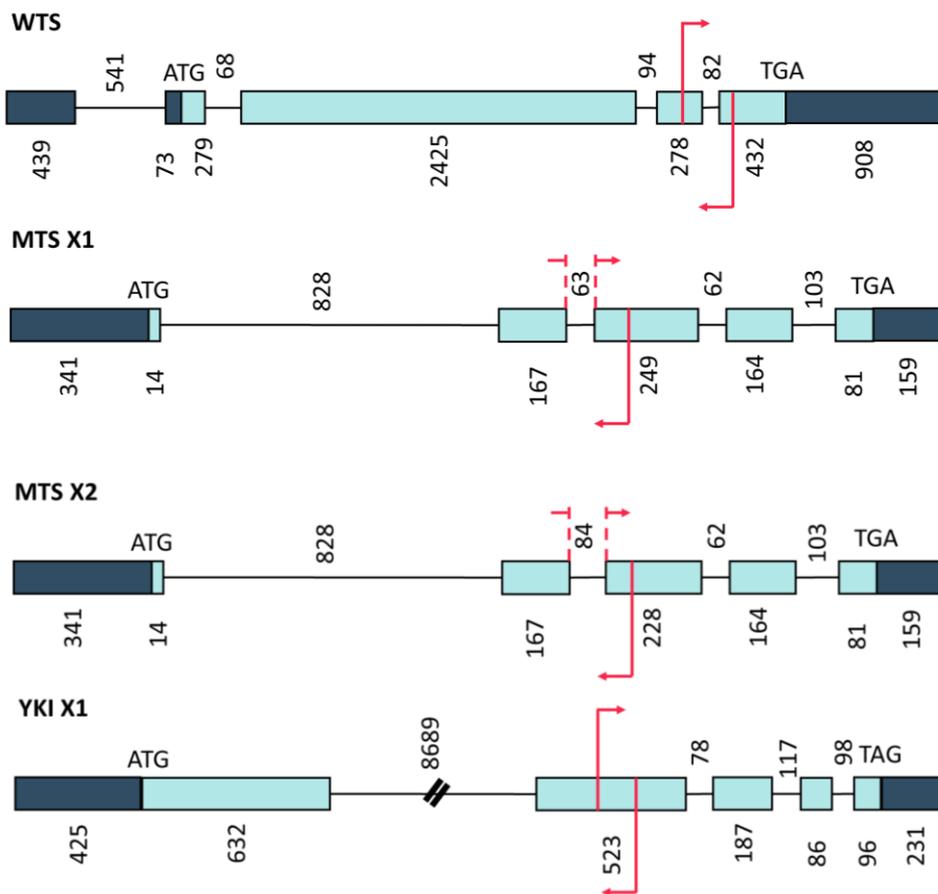


**HPO X3**



**SAV**

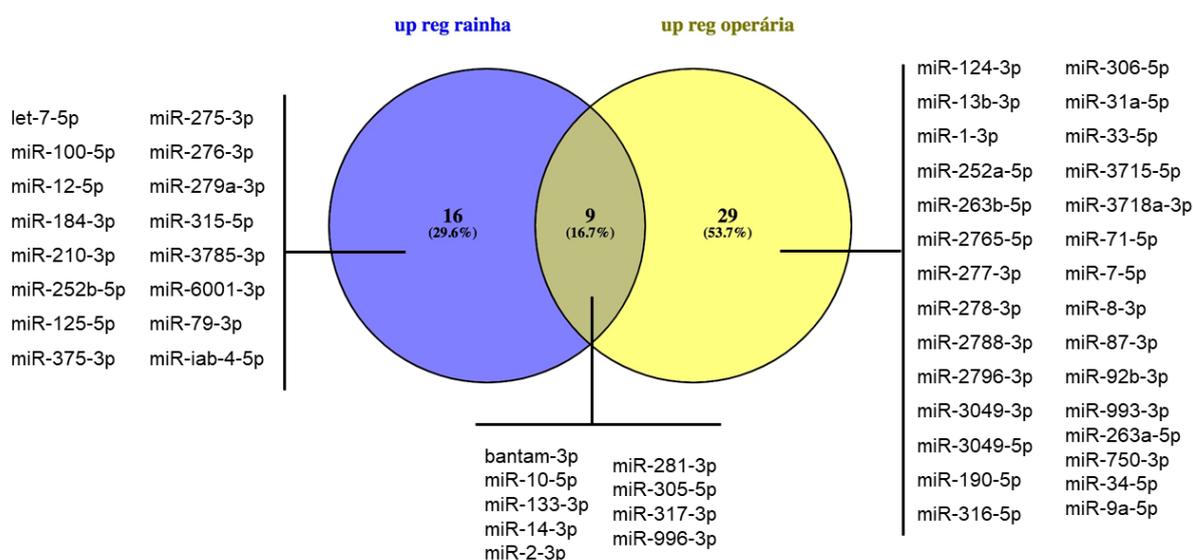




**Figura 7:** Estrutura dos genes do *core* central e do coativador transcricional Yki da via de sinalização Hippo. As caixas representam os éxons e as linhas os íntrons. O tamanho dos éxons, em pares de base (pb), se encontra abaixo de cada caixa. O tamanho dos íntrons, em pares de base (pb), se encontra acima de cada linha. As caixas em azul escuro representam as regiões 5' e 3' não-traduzidas (UTR), enquanto as azuis claras representam a região codificadora de proteína (CDS). O códon de iniciação (ATG) e o códon de terminação (TAA, TAG, TGA) estão indicados em cada gene. Os *primers* estão indicados pelas setas em cor de rosa.

### 5.3. Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre larvas de rainhas e de operárias

Após o levantamento realizado nos artigos Shi et al (2015) e Guo et al (2016), encontramos dezesseis miRNAs *up* regulados em larvas de rainha, vinte e nove miRNAs *up* regulados em larvas de operárias. Outros nove miRNAs foram desconsiderados da análise pois os dados dos dois artigos são conflitantes, apresentando-os como *up* regulados em ambas as castas da espécie *A. mellifera* (Figura 8).



**Figura 8:** Diagrama de Venn com os miRNAs *up* regulados durante o desenvolvimento larval das castas da espécie *A. mellifera*, segundo Shi et al (2015) e Guo et al (2016). Em azul estão representados os miRNAs *up* regulados em rainhas, em amarelo estão representados os miRNAs *up* regulados em operárias e na intersecção dos dois conjuntos estão representados os miRNAs indicados como *up* regulados em ambas as castas pelos dois estudos.

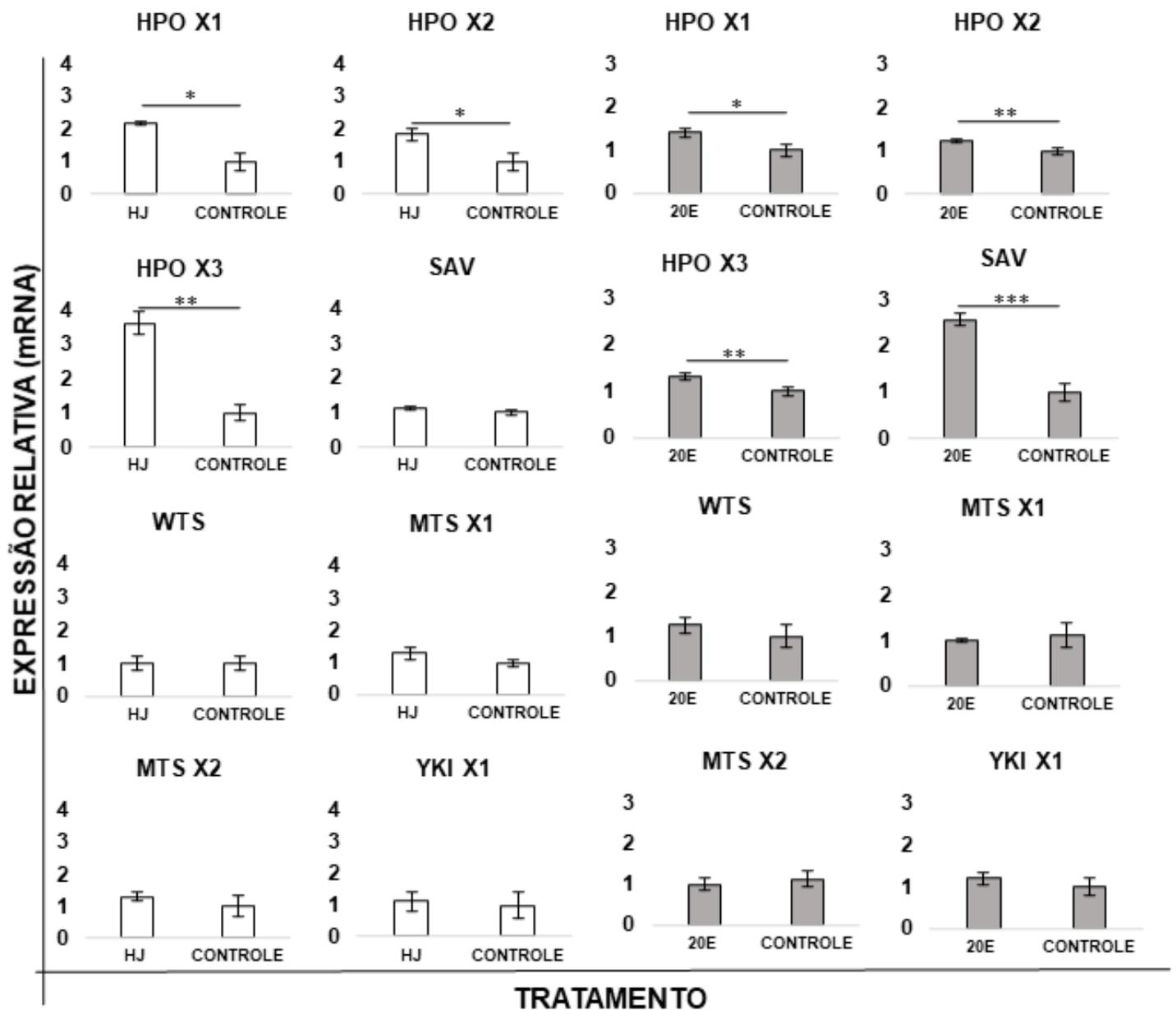
Consideramos aqui que os miRNAs *up* regulados numa dada casta são mais abundantes ou preferencialmente expressos nesta em relação ao observado na outra casta. Desta forma, os sítios de interação entre mRNA::miRNA preditos (**Tabela 5**) sugerem relações moleculares que são biologicamente mais prováveis de ocorrer. Ainda que tais interações requerem validação experimental (como ensaios de luciferase, Freitas et al, 2017), os parâmetros estridentes que utilizamos nas predições retornam um número pequeno de resultados, porém robustos no que tange a considerar seis microRNAs como fortes candidatos a regular três genes da via Hippo, abrindo caminhos para futuras pesquisas. As estruturas de ligação entre os miRNAs e as sequências 3'UTR dos mRNAs estão ilustradas na **Figura S1** do anexo.

**Tabela 5:** Informações sobre os miRNAs *up* regulados em larvas de rainhas em comparação às de operárias, e vice-versa, e que possuem sítios de ligação nas extremidades 3'UTR dos mRNAs da via Hippo.

Genes	Rainha	Operária
Hpo (X1, X2 e X3)	miR-6001-3p	-
		-
		-
Sav	-	-
Mts (X1 e X2)	-	miR-33-5p
Wts	miR-276-3p	miR-190-5p
		miR-31a-5p
		miR-2788-3p
Yki	-	-

#### 5.4. A influência dos hormônios HJ e 20E sobre os genes da via Hippo

Os resultados indicam que as três variantes de Hpo (X1, X2 e X3) tiveram níveis significativamente mais alta ( $p < 0,05$ ) de expressão tanto no tratamento com HJ quanto com 20E em relação aos seus respectivos controles. Além disso, a expressão de Sav também foi significativamente mais alto ( $p < 0,05$ ) que o controle quando as amostras foram tratadas com 20E. Os dados estão ilustrados na **Figura 9**.



**Figura 9:** Expressão relativa (média ± erro padrão) dos genes (mRNAs) da via Hippo em amostras de operárias tratadas com HJ (em branco) ou 20E (em cinza) e seus respectivos controles, usando RT-qPCR e n=5 por condição. Asteriscos indicam diferenças estatísticas: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

## 5.5. A expressão dos genes da via Hippo durante o desenvolvimento dos ovários de rainhas e operárias

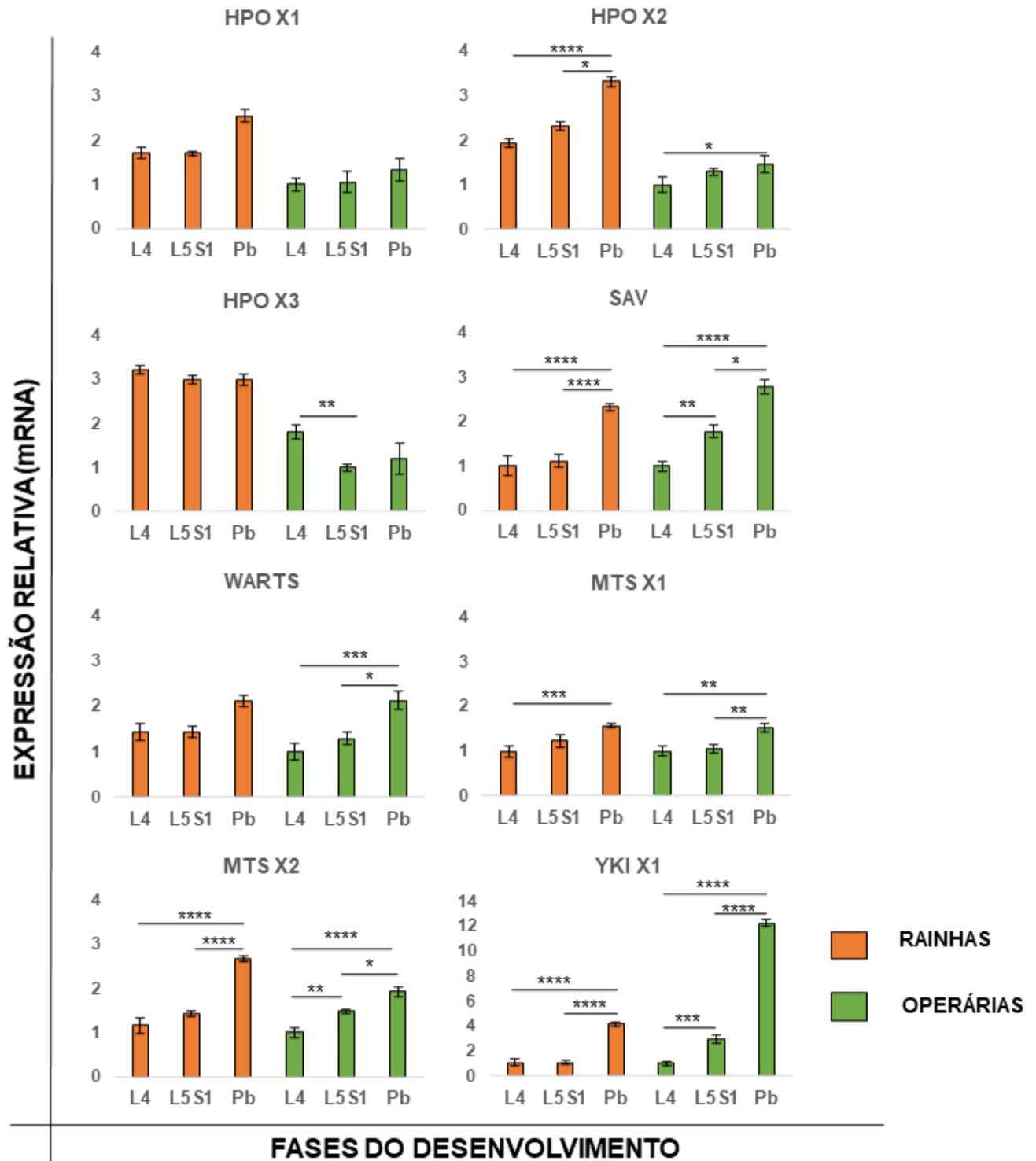
Com base nos resultados do teste Two-Way ANOVA (Tabela 6), nós observamos que a fase do desenvolvimento, um fator “temporal”, influencia a expressão de todos os genes analisados, independentemente da casta. O fator “casta” também exerce influência sobre a expressão dos genes da via Hippo entre as castas, com exceção de Wts e Mts X1. Referente às comparações usando o teste Sidak (Tabela 6), os dados indicam que a expressão de todos os variantes do gene Hpo diferem entre cada fase de rainhas *versus* operárias, assim como Sav em L5S1, Mts X2 em Pb, e Yki X1 tanto em L5S1 quanto em Pb.

**Tabela 6:** Análise estatística referente à expressão dos genes da via Hippo em ovários em desenvolvimento (fases: L4, L5S1 e Pb) das castas, operárias e rainhas, de *A. mellifera*. As marcas em negrito e a coloração cinza indicam resultados estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

Genes								
	Hpo X1	Hpo X2	Hpo X3	Sav	Wts	Mts X1	Mts X2	Yki X1
<b>Two-way ANOVA</b>								
<b>Fator</b>								
<b>Fase</b>	<b><math>F(2, 24)=5,371</math></b>	<b><math>F(2, 24)=12,90</math></b>	<b><math>F(2, 24)=3,709</math></b>	<b><math>F(2, 24)=42,72</math></b>	<b><math>F(2, 24)=13,09</math></b>	<b><math>F(2, 24)=17,67</math></b>	<b><math>F(2, 24)=56,44</math></b>	<b><math>F(2, 24)=76,76</math></b>
<b>(Tempo)</b>	<b><math>p=0,0118</math></b>	<b><math>p=0,0002</math></b>	<b><math>p=0,0395</math></b>	<b><math>p&lt;0,0001</math></b>	<b><math>p=0,0001</math></b>	<b><math>p&lt;0,0001</math></b>	<b><math>p&lt;0,0001</math></b>	<b><math>p&lt;0,0001</math></b>
<b>Casta</b>	<b><math>F(1, 24)=34,86</math></b>	<b><math>F(1, 24)=88,70</math></b>	<b><math>F(1, 24)=68,57</math></b>	<b><math>F(1, 24)=6,645</math></b>	<b><math>F(1, 24)=2,779</math></b>	<b><math>F(1, 24)=1,095</math></b>	<b><math>F(1, 24)=6,616</math></b>	<b><math>F(1, 24)=26,30</math></b>
	<b><math>p&lt;0,0001</math></b>	<b><math>p&lt;0,0001</math></b>	<b><math>p&lt;0,0001</math></b>	<b><math>p=0,0165</math></b>	<b><math>p=0,1085</math></b>	<b><math>p=0,3059</math></b>	<b><math>p=0,0167</math></b>	<b><math>p&lt;0,0001</math></b>
<b>Rainhas x Operárias – Sidak's Multiple Comparisons Test</b>								
<b>L4</b>	<b><math>p&lt;0,05</math></b>	<b><math>p&lt;0,0001</math></b>	<b><math>p&lt;0,05</math></b>	<b><math>p&gt;0,05</math></b>	<b><math>p&gt;0,05</math></b>	<b><math>p&gt;0,05</math></b>	<b><math>p&gt;0,05</math></b>	<b><math>p&gt;0,05</math></b>
<b>L5S1</b>	<b><math>p&lt;0,05</math></b>	<b><math>p&lt;0,001</math></b>	<b><math>p&lt;0,0001</math></b>	<b><math>p&lt;0,05</math></b>	<b><math>p&gt;0,05</math></b>	<b><math>p&gt;0,05</math></b>	<b><math>p&gt;0,05</math></b>	<b><math>p&lt;0,001</math></b>
<b>Pb</b>	<b><math>p&lt;0,01</math></b>	<b><math>p&lt;0,0001</math></b>	<b><math>p&lt;0,001</math></b>	<b><math>p&gt;0,05</math></b>	<b><math>p&gt;0,05</math></b>	<b><math>p&gt;0,05</math></b>	<b><math>p&lt;0,01</math></b>	<b><math>p&lt;0,001</math></b>

Com relação às comparações realizadas pelo teste Tukey (Figura 10), da expressão de cada gene entre as fases de uma mesma casta, seguem os principais achados. Observamos que a expressão dos genes nos ovários de rainhas e operárias tende a aumentar progressivamente, da fase L4 até Pb, com exceção de Hpo X1 e Hpo X3 em ambas as castas, bem como de Wts apenas em rainhas. Cabe destacar que, nos ovários das rainhas, observamos uma expressão estável de todos os genes entre L4 e L5S1, seguido de um aumento significativo em Pb para quatro dos oito genes. Nas operárias, os genes Sav, Mts X2, e Yki X1 são significativamente mais expressos na fase L5S1 do que na fase

L4. Também em operárias, o gene Hpo X3 é significativamente mais expresso na fase L4 do que em L5S1, enquanto o gene Wts não apresenta diferença significativa de expressão entre essas duas fases.



**Figura 10:** Expressão relativa (média  $\pm$  erro padrão) dos genes (mRNAs) da via Hippo em amostras de ovários de rainhas (em laranja) e operárias (em verde) em diferentes fases do desenvolvimento (L4, L5S1 e Pb), usando RT-qPCR e  $n=5$  por condição. Asteriscos indicam diferenças estatísticas: \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$ .

## **6. DISCUSSÃO**

---

A via Hippo tem sido amplamente estudada e cada vez mais associada a diferentes processos biológicos em animais. No entanto, ainda que alguns dados pontuais encontrados na literatura demonstrem a participação dessa via em diferentes contextos da vida de abelhas (Ashby et al, 2016; Yin et al, 2018; Azzouz-Olden et al, 2018), não existem até o momento nenhum estudo que se dedicou exclusivamente a ela em polinizadores.

Os principais componentes da via Hippo e seus mecanismos de sinalização foram descobertos em *D. melanogaster* e, posteriormente, verificou-se que eles são funcionalmente e evolutivamente conservados entre invertebrados e vertebrados (Liu et al, 2016; Kwon et al, 2022). No presente estudo, nossas buscas confirmaram que a via Hippo em *A. mellifera* é completa e conservada, contando com a presença de todos os genes e as proteínas necessários ao desempenho de papéis canônicos, especialmente relacionados ao controle de crescimento e tamanho de órgãos e tecidos. Cabe destacar que apenas dois genes da via, presentes no genoma de moscas, não foram encontrados em *A. mellifera*: UPD (*unpaired*) e Fj (*four-jointed box*). O gene UPD codifica um componente central da via de sinalização canônica JAK/STAT, com função de ligação ao receptor *Domeless* (Dome) (Singh, 2015). O gene Fj não tem uma função totalmente elucidada, mas parece estar envolvido no controle da proliferação celular, induzido pela via Notch e, conseqüentemente, com papel na comunicação com outras vias, como Fat- Dachsous e Hippo (Keeler et al, 2015; Chai et al, 2019). Ainda que sejam funcionalmente relevantes em outras espécies, a ausência desses genes em abelhas não parece comprometer a sinalização Hippo uma vez que os mesmos não estariam presentes no eixo principal da via (vide **Figura 6**), sugerindo que outros componentes moleculares em *A. mellifera* desempenhem papéis semelhantes ou alternativos a UPD e Fj. Além dos termos funcionais canônicos, a análise de enriquecimento funcional dos genes da via Hippo também nos retornou processos biológicos mais específicos, que são do interesse para a biologia geral (Hartfelder e Engels, 1998) e reprodução de abelhas (Hartfelder e Steinbrück, 1997; Tanaka e Hartfelder, 2004). Entre os termos mais específicos, destacamos: desenvolvimento de epitélio, desenvolvimento do sistema nervoso, resposta a estímulos, desenvolvimento de células germinativas e metamorfose.

A via Hippo participa no desenvolvimento e na diferenciação de células epiteliais e, conseqüentemente, na morfogênese e função de tecido epitelial, incluindo o epitélio folicular dos ovários como descrito para moscas (Fletcher et al, 2018). Em *A. mellifera*, desde o 4º instar larval é possível observar a diferenciação de células somáticas em precursores das células epiteliais foliculares dos ovários (Hartfelder e Steinbrück, 1997), bem como a manutenção do epitélio folicular nos ovários das fêmeas adultas (Tanaka e Hartfelder, 2004).

Na mesma direção, as análises de *Gene Ontology* também nos sinalizam para a participação da via em processos que resultam na progressão de células germinativas imaturas (primordiais) ao longo do tempo até a formação da estrutura madura de gameta feminino. Células germinativas são observadas ao longo do 5º. instar larval de rainhas e operárias de *A. mellifera*, que se diferenciam e formam *clusters* na primeira casta, enquanto a apoptose começa a ser observada na segunda casta (Schmidt Capella e Hartfelder, 2002). Essas evidências também sugerem a participação da via Hippo, desde a fase larval, para formação de futuros de ovócitos.

Até onde conseguimos apurar não há relatos na literatura sobre inervação de ovários nas castas de *A. mellifera*. Por outro lado, em outros insetos, sabe-se que os ovários e o oviduto são inervados. A literatura indica que, o ovário de *D. melanogaster* é circundado por uma bainha peritoneal, que é uma malha contrátil inervada por neurônios octopaminérgicos, responsáveis pelas contrações para facilitar a ovulação na fase adulta (Middleton et al, 2006; Deady e Sun, 2015). Os termos de *Gene Ontology* mostram a participação de genes da via Hippo na geração e diferenciação de células nervosas (neurônios) para a formação do sistema nervoso (central e periférico). Ainda que especulativo, sugerimos que a relação da via com a inervação dos ovários em abelhas ocorra desde a fase larval. Desta forma, neurônios se projetariam a partir do cordão nervoso ventral (Pinto et al, 2003), mais especificamente na região do gânglio abdominal, em direção aos ovários.

Por fim, a análise funcional da via Hippo indica associação com respostas a estímulos externos e com a metamorfose. Ou seja, há coerência com a questão da alimentação diferencial consumida pelas larvas fêmeas que, por sua vez ativa programações genéticas distintas entre as castas (Barchuk et al, 2007). No caso, genes da via Hippo são co-partícipes (Ashby et al, 2016), desde o momento que

as castas são determinadas e ao longo da progressão do desenvolvimento. Além da via Hippo, todo esse processo de mudanças morfo-fisiológicas de larva até adulto (metamorfose) conta também com a ação hormonal, principalmente o hormônio juvenil e os ecdisteroides e microRNAs (Belles, 2017).

Identificamos também que existem miRNAs diferencialmente expressos entre as castas de *A. mellifera*. Na rainha encontramos duas interações miRNA::mRNA, uma com Hpo e outra com Wts. Isso nos indica que o desenvolvimento larval da rainha possui um duplo sistema de regulação pós-transcricional da via Hippo que favorece a proliferação celular, pois quando o mRNA de ambas as cinases é degradado ou tem sua tradução impedida, o *core* central da via é inativado (Liu et al, 2016; Kwon et al, 2022). Na abelha *Bombus terrestris*, o miR-6001 está altamente expresso em rainhas no fim do estágio larval e relacionado com o controle de genes com funções no desenvolvimento dos ovários e oócitos (Collins et al, 2017). A nossa predição de sítios de ligação reforça que o miR-6001 se liga, preferencialmente, ao mRNA Hpo de larvas de rainhas de *A. mellifera*, que resulta em um controle pró-proliferação nos ovários das mesmas. Já nas operárias, encontramos quatro interações miRNA::mRNA, uma com a Mts e três com Wts, nos sugerindo uma regulação pós-transcricional mais refinada da via Hippo. Durante o desenvolvimento larval ocorre eventos apoptóticos nos ovários das operárias, que resultam em uma redução de 90% dos ovaríolos (Hartfelder e Steinbrück, 1997; Schmidt Capella e Hartfelder, 1998). Esses eventos sugerem uma intensa ativação pró-apoptose do *core* central da via, incluindo mecanismo de manutenção da morte celular por *feedback* negativo com o aumento de expressão de Wts (Liu et al, 2016; Park et al, 2016). Nesse contexto, a interação preferencial de miRNAs com o mRNA Wts se torna importante para que, na emergência de indivíduos adultos, 10% dos ovários das operárias sejam preservados. O miR-31a encontrado em nossa predição (miRNA-31a::mRNA Wts), está relacionado com controle da apoptose em várias ordens de inseto (Kumar e Sudhir, 2016).

Ainda que nem todos os mecanismos de crescimento, homeostase e manutenção de um dado tecido estejam completamente elucidados, sabe-se que muitas vias de sinalização participam de forma interconectada em tais processos, entre elas EGFR, Notch e Hippo, inclusive no desenvolvimento de ovários de insetos (Elshaer e Piulachs, 2015).

A influência hormonal sobre a via de sinalização Hippo é conhecida (Mirth e Shingleton, 2012; Dong et al, 2015; Gotoh et al, 2015; Wang et al, 2016), mas até o momento não havia sido investigada em abelhas. No presente trabalho, confirmamos que os hormônios HJ e 20E regulam a expressão de alguns genes do core central da via Hippo na espécie *A. mellifera*: Sav regulado por 20E, enquanto as variantes Hpo são reguladas por HJ e por 20E. Não encontramos descrição na literatura que suporte a relação Sav-20E, sendo, portanto, a primeira vez que este *crosstalk* é proposto, e abre caminhos para futuras investigações. Já os efeitos hormonais sobre Hpo são particularmente interessantes porque esse foi o único dentre os genes testados que apresentou diferença de expressão significativa das suas três variantes entre os ovários de rainhas e operárias (fator “casta”) e todas as fases do desenvolvimento (fator “tempo”) analisadas (vide **Tabela 6**, teste *Sidak*). Ou seja, ao tratarmos PP2 de operárias com HJ ou 20E, simulamos um ambiente hormonal mais próximo ao de rainhas em PP2 e induzimos a expressão das variantes de Hpo. Esse achado é corroborado por resultados apresentados na **Figura 10**, onde observamos que Hpo é mais expresso em larvas de rainhas em comparação às de operárias, o que coincide com os níveis mais elevados dos dois hormônios principalmente ao longo do 5º instar (fase que vai de L5F1 a PP3), na primeira casta em relação à segunda (Rachinsky et al, 1990).

Talvez esperássemos que as rainhas, independentemente se tratadas ou não com hormônios, apresentassem níveis de expressão menores de Hpo (especialmente comparado a operárias), levando à proliferação celular e desenvolvimento de seus ovários, de acordo com o funcionamento canônico da via Hippo, segundo a literatura. No entanto, a atividade não-canônica também já foi descrita (Chen, 2019) e a via parece se comportar de maneira alternativa no contexto reprodutivo de insetos. Guardadas as diferenças entre os ovários panoístico (de baratas) e meroístico (de abelhas), semelhanças também podem ser encontradas. No último instar de ninfas de baratas (*Blattella germanica*), os componentes da via Hippo apresentam altas taxas de expressão nos folículos ovarianos em processo de maturação, bem como o silenciamento de Hpo leva à desorganização dos filamentos de actina de células foliculares (Irls e Piulachs, 2014). Tal desorganização de actina afeta citoesqueletos e polifusomas, desencadeando apoptose, um cenário coerente com o que se sabe sobre a

degeneração de ovários em operárias de *A. mellifera* (Schmidt Capella e Hartfelder, 2002) e que, também, está de acordo com a menor expressão de transcritos de Hpo que encontramos no presente trabalho para esta casta. Em *Drosophila*, o tratamento com 20E aumentou a expressão de genes da via Hippo, incluindo Hpo, em comparação ao controle, também corroborando o nosso achado em abelhas. Porém, nas moscas, a combinação de 20E com o aumento da atividade da via induziram apoptose (Dong et al, 2015).

A literatura indica uma interdependência entre as taxas de proliferação celular e a apoptose (Huang et al, 2005) ao longo do desenvolvimento de um organismo. E, em diferentes contextos biológicos, tanto HJ quanto ecdisteroides (como 20E e makisterona A podem promover proliferação celular (Champlin e Truman, 1998; Truman et al, 2006) ou apoptose (Manaboon et al, 2012; Nicolson et al, 2015) em insetos, interagindo com inúmeras vias de sinalização e com sinais nutricionais (ver Texada et al, 2020). Em *A. mellifera*, a existência de duas castas fêmeas, uma reprodutora e outra *quasi* estéril, e suas diferenças morfo-fisiológicas, tornam o cenário um tanto mais complexo, inclusive para a interpretação da ação da via Hippo. Complexidades a parte, o desenvolvimento alternativo dos ovários das castas de *A. mellifera* é um bom modelo para se investigar eventos simultâneos de regulação hormonal, de proliferação celular e de apoptose (Schmidt Capella e Hartfelder, 1998). Nossos dados mostram que, em linhas gerais, os fatores “casta” e “fase” influenciam, significativa e diferencialmente (vide **Tabela 6**, teste Two-way ANOVA), a atividade da via Hippo nos ovários de rainhas e operárias que, em última instância, ajudam a explicar as diferenças fenotípicas.

Com exceção da expressão de Hpo, os demais genes da via Hippo testados no presente trabalho apresentaram níveis transcricionais similares ( $p > 0,05$ ) em ovários de L4 entre as castas (vide **Tabela 6**, teste *Sidak*), momento em que diferenças morfológicas aparentes não são observadas em termos de estrutura e número de ovariolos (Hartfelder e Steinbrück, 1997).

É muito coerente observar que todos os genes (e variantes) testados apresentam expressão estável entre os ovários de rainhas em L4 e L5S1, sugerindo uma mesma trajetória de desenvolvimento gonadal (pró-crescimento). Por outro lado, em ovários de operárias, quatro genes (ou variantes) apresentam expressão diferencial entre L4 e L5S1, sugerindo uma mudança de trajetória (pró-

degeneração) e, de fato, é na fase L5S1 que ocorre o ápice da degeneração dos ovaríolos (Schmidt Capella e Hartfelder, 1998; Dallacqua e Bitondi, 2014). O fato de Hpo X3 ser significativamente menos expresso em L5S1 do que em L4, bem como Wts não apresentar diferença significativa entre estas duas fases, nos leva à seguinte sugestão: apesar de estar ocorrendo um processo intenso de apoptose dos ovaríolos na fase L5S1, Hpo X3 e Wts garantiriam que a degeneração não seja completa e, assim, nem todos os ovaríolos das operárias seriam degradados. Como sabemos, geralmente até 12 ovaríolos são preservados em operárias e podem, inclusive, ser eventualmente ativados na fase adulta em condição de orfandade (Snodgrass, 1956).

Um resultado que nos chama a atenção é o aumento significativo de expressão da maioria dos genes/variantes nos ovários Pb, tanto em rainhas quanto em operárias, em relação às fases anteriores (L4 e L5S1). Este cenário molecular sugere um aumento de apoptose nos ovários de ambas as castas. Por outro lado, as castas diferem-se em relação à expressão de Wts que, por sua vez, codifica a enzima responsável por fosforilar Yki X1. Quanto mais Wts no citoplasma, mais Yki é fosforilado e, conseqüentemente, degradado, levando à morte de células. Assim, ausência de diferença significativa de expressão de Wts nos leva a hipotetizar um processo apoptótico menos intenso em ovários de rainhas Pb. E, nas operárias Pb, a diferença significativa de expressão de Wts sugere um processo apoptótico mais intenso em seus ovários. Nossos resultados, principalmente em operárias, são compatíveis com o mecanismo de regulação por *feedback* negativo, citado na Introdução.

Eventos de proliferação celular e apoptose ocorrem a todo instante num dado tecido. Num dado momento, células germinativas e somáticas dos ovários podem, individualmente, estar passando por eventos moleculares distintos. Por exemplo, em L5S1 de operárias, quando a apoptose se inicia nas células da região central dos ovaríolos, as células vizinhas, localizadas mais nas extremidades dos filamentos, ainda não manifestaram sinais de morte (mas com o passar do tempo estas últimas também vão se degenerar) (Schmidt Capella e Hartfelder, 2002). A própria fase pupal é um momento em que faz todo sentido a via Hippo continuar ativa, tanto para a remodelação quanto para a manutenção da homeostase de células e tecidos.

Em vertebrados (camundongos) e invertebrados (moscas) o acoplamento dos eventos de proliferação celular e apoptose já estão bem estabelecidos, e podem acontecer de dois modos: (i) um aumento de proliferação levando a um aumento da morte celular, impedindo um descontrole de crescimento tecidual (como em tumores), e/ou (ii) uma superproliferação supera a taxa de apoptose, mas não a elimina, resultando em um aumento robusto no tamanho do órgão (Lowe et al, 2004). Dependendo da fase do desenvolvimento, entendemos que os ovários de rainhas e de operárias, coordenam de forma distinta o balanço entre proliferação celular e apoptose. Cada ovário, de cada casta, é um mosaico de células que se comunicam e trabalham de forma orquestrada, mas cada célula pode ter suas especificidades. Os nossos resultados refletem uma “média” dos eventos celulares e moleculares, uma vez que analisamos *pools* de células (ou órgãos) de diferentes indivíduos (ainda que da mesma fase do desenvolvimento e casta). O nosso recorte experimental, focado na via Hippo, avança o conhecimento, mas, ao mesmo tempo, gera lacunas e novas possibilidades científicas uma vez que outras vias de sinalização não foram investigadas nos mesmos contextos em *A. mellifera*.

## **7. REFERÊNCIAS**

---

- Asgari S. MicroRNA functions in insects. *Insect Biochem Mol Biol.* 2013 Apr;43(4):388-97. doi: 10.1016/j.ibmb.2012.10.005. Epub 2012 Oct 26. PMID: 23103375.
- Ashby R, Forêt S, Searle I, Maleszka R. MicroRNAs in Honey Bee Caste Determination. *Sci Rep.* 2016 Jan 7;6:18794. doi: 10.1038/srep18794. PMID: 26739502; PMCID: PMC4704047.
- Avni D, Hendriksma HP, Dag A, Uni Z, Shafir S. Nutritional aspects of honey bee-collected pollen and constraints on colony development in the eastern Mediterranean. *J Insect Physiol.* 2014 Oct;69:65-73. doi: 10.1016/j.jinsphys.2014.07.001. Epub 2014 Jul 16. PMID: 25038311.
- Azzouz-Olden F, Hunt A, DeGrandi-Hoffman G. Transcriptional response of honey bee (*Apis mellifera*) to differential nutritional status and *Nosema* infection. *BMC Genomics.* 2018 Aug 22;19(1):628. doi: 10.1186/s12864-018-5007-0. PMID: 30134827; PMCID: PMC6106827.
- Barchuk AR, Cristino AS, Kucharski R, Costa LF, Simões ZL, Maleszka R. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev Biol.* 2007 Jun 18;7:70. doi: 10.1186/1471-213X-7-70. PMID: 17577409; PMCID: PMC1929063.
- Barry JT, Stephen MC. The Hippo Pathway Regulates the bantam microRNA to Control Cell Proliferation and Apoptosis in *Drosophila*. 2006 Aug; 126(4): 0–774. doi:10.1016/j.cell.2006.07.013.
- Belles X. MicroRNAs and the Evolution of Insect Metamorphosis. *Annu Rev Entomol.* 2017 Jan 31;62:111-125. doi: 10.1146/annurev-ento-031616-034925. Epub 2016 Oct 28. PMID: 27813669.
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell.* 2003 Apr 4;113(1):25-36. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00231-9. PMID: 12679032.
- Collins DH, Mohorianu I, Beckers M, Moulton V, Dalmay T, Bourke AF. MicroRNAs Associated with Caste Determination and Differentiation in a Primitively Eusocial Insect. *Sci Rep.* 2017 Mar 31;7:45674. doi: 10.1038/srep45674. PMID: 28361900; PMCID: PMC5374498.
- Chai SJ, Ahmad Zabidi MM, Gan SP, Rajadurai P, Lim PVH, Ng CC, Yap LF, Teo SH, Lim KP, Patel V, Cheong SC. An Oncogenic Role for Four-Jointed Box 1 (FJX1) in Nasopharyngeal Carcinoma. *Dis Markers.* 2019 May 19;2019:3857853. doi: 10.1155/2019/3857853. PMID: 31236144; PMCID: PMC6545767.
- Champlin DT, Truman JW. Ecdysteroid control of cell proliferation during optic lobe neurogenesis in the moth *Manduca sexta*. *Development.* 1998 Jan;125(2):269-77. doi: 10.1242/dev.125.2.269. PMID: 9486800.
- Chen L. Non-canonical Hippo signaling regulates immune responses. *Adv Immunol.* 2019;144:87-119. doi: 10.1016/bs.ai.2019.07.001. Epub 2019 Aug 20. PMID: 31699221.
- Chen, X., Shi, W. Genome-wide characterization of coding and non-coding RNAs in the ovary of honeybee workers and queens. *Apidologie.* 2020; 51:777–92. 10.1007/s13592-020-00760-7.
- Chen X, Ma C, Chen C, Lu Q, Shi W, Liu Z, Wang H, Guo H. Integration of lncRNA-miRNA-mRNA reveals novel insights into oviposition regulation in honey bees. *PeerJ.* 2017 Oct 5;5:e3881. doi: 10.7717/peerj.3881. PMID: 29018616; PMCID: PMC5632538.

- Dallacqua RP, Bitondi MM. Dimorphic ovary differentiation in honeybee (*Apis mellifera*) larvae involves caste-specific expression of homologs of ark and buffy cell death genes. *PLoS One*. 2014 May 20;9(5):e98088. doi: 10.1371/journal.pone.0098088. PMID: 24844304; PMCID: PMC4028266.
- Deady LD, Sun J. A Follicle Rupture Assay Reveals an Essential Role for Follicular Adrenergic Signaling in *Drosophila* Ovation. *PLoS Genet*. 2015 Oct 16;11(10):e1005604. doi: 10.1371/journal.pgen.1005604. PMID: 26473732; PMCID: PMC4608792.
- Didiano D, Hobert O. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Sep;13(9):849-51. doi: 10.1038/nsmb1138. Epub 2006 Aug 20. PMID: 16921378.
- Dong DJ, Jing YP, Liu W, Wang JX, Zhao XF. The Steroid Hormone 20-Hydroxyecdysone Up-regulates Ste-20 Family Serine/Threonine Kinase Hippo to Induce Programmed Cell Death. *J Biol Chem*. 2015 Oct 9;290(41):24738-46. doi: 10.1074/jbc.M115.643783. Epub 2015 Aug 13. PMID: 26272745; PMCID: PMC4598986.
- Du K, Shi Y, Bai X, Chen L, Sun W, Chen S, Wang J, Jia X, Lai S. Integrated Analysis of Transcriptome, microRNAs, and Chromatin Accessibility Revealed Potential Early B-Cell Factor1-Regulated Transcriptional Networks during the Early Development of Fetal Brown Adipose Tissues in Rabbits. *Cells*. 2022 Aug;11(17): 2675. doi: 10.3390/cells11172675.
- Dubrovsky EB. Hormonal cross talk in insect development. *Trends Endocrinol Metab*. 2005 Jan-Feb;16(1):6-11. doi: 10.1016/j.tem.2004.11.003. PMID: 15620543.
- Elshaer N, Piulachs MD. Crosstalk of EGFR signalling with Notch and Hippo pathways to regulate cell specification, migration and proliferation in cockroach panoistic ovaries. *Biol Cell*. 2015 Aug;107(8):273-85. doi: 10.1111/boc.201500003. Epub 2015 Jun 5. PMID: 25907767.
- Feitosa RMMW, Prieto-Oliveira P, Brentani H, Machado-Lima A. MicroRNA target prediction tools for animals: Where we are at and where we are going to - A systematic review. *Comput Biol Chem*. 2022 Oct;100:107729. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2022.107729. Epub 2022 Jul 12. PMID: 35921777.
- Fletcher GC, Diaz-de-la-Loza MD, Borreguero-Muñoz N, Holder M, Aguilar-Aragon M, Thompson BJ. Mechanical strain regulates the Hippo pathway in *Drosophila*. *Development*. 2018 Mar 8;145(5):dev159467. doi: 10.1242/dev.159467. PMID: 29440303; PMCID: PMC5868995.
- Freitas FC, Pires CV, Claudianos C, Cristino AS, Simões ZL. MicroRNA-34 directly targets pair-rule genes and cytoskeleton component in the honey bee. *Sci Rep*. 2017 Jan 18;7:40884. doi: 10.1038/srep40884. PMID: 28098233; PMCID: PMC5241629.
- Gotoh H, Hust JA, Miura T, Niimi T, Emlen DJ, Lavine LC. The Fat/Hippo signaling pathway links within-disc morphogen patterning to whole-animal signals during phenotypically plastic growth in insects. *Dev Dyn*. 2015 Sep;244(9):1039-1045. doi: 10.1002/dvdy.24296. Epub 2015 Jul 14. PMID: 25997872.
- Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*. 2015 Mar 27;347(6229):1255957. doi: 10.1126/science.1255957. Epub 2015 Feb 26. PMID: 25721506.

- Guo X, Su S, Geir S, Wenfeng L, Zhiguo L, Shaowu Z, Shenglu C, Runsheng C. Differential expression of miRNAs related to caste differentiation in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*. 2016 Nov;47:495–508. doi: 10.1007/s13592-015-0389-3.
- Haydak MH. Larval food and the development of castes in honeybee. *J Econ Entomol*. 1943 Oct 1;36(5):778-92. doi: 10.1093/jee/36.5.778.
- Haydak MH. Honey bee nutrition. *Annu Rev Entomol*. 1970. 15(1): 143-56. doi: 10.1146/annurev.en.15.010170.001043.
- Hartfelder K, Engels W. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr Top Dev Biol*. 1998;40:45-77. doi: 10.1016/s0070-2153(08)60364-6. PMID: 9673848.
- Hartfelder K, Steinbrück G. Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. *Invert Reprod Dev*. 1997 Aug;31:237–50. doi: 10.1080/07924259.1997.9672582.
- Hartfelder K, Tiberio GJ, Lago DC, Dallacqua RP, Bitondi MMG. The ovary and its genes—developmental processes underlying the establishment and function of a highly divergent reproductive system in the female castes of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*. 2018 Oct;49:49–70. doi: 10.1007/s13592-017-0548-9.
- Hipfner DR, Weigmann K, Cohen SM. The bantam gene regulates *Drosophila* growth. *Genetics*. 2002 Aug;161(4):1527-37. doi: 10.1093/genetics/161.4.1527. PMID: 12196398; PMCID: PMC1462212.
- Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell*. 2005 Aug 12;122(3):421-34. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.007. PMID: 16096061.
- Irles P, Piulachs MD. Unlike in *Drosophila* Meroistic Ovaries, hippo represses notch in *Blattella germanica* Panoistic ovaries, triggering the mitosis-endocycle switch in the follicular cells. *PLoS One*. 2014 Nov 26;9(11):e113850. doi: 10.1371/journal.pone.0113850. PMID: 25426635; PMCID: PMC4245235.
- Keeler AB, Molumby MJ, Weiner JA. Protocadherins branch out: Multiple roles in dendrite development. *Cell Adh Migr*. 2015;9(3):214-26. doi: 10.1080/19336918.2014.1000069. Epub 2015 Apr 14. PMID: 25869446; PMCID: PMC4594470.
- Klein S, Cabirol A, Devaud JM, Barron AB, Lihoreau M. Why Bees Are So Vulnerable to Environmental Stressors. *Trends Ecol Evol*. 2017 Apr;32(4):268-278. doi: 10.1016/j.tree.2016.12.009. Epub 2017 Jan 19. PMID: 28111032.
- Kumar A, Sudhir C. Radiation-induced phosphorylation of P53 protects radioresistant *Spodoptera frugiperda* 9 cells by suppressing microRNA-31-Bim-Bax mediated apoptosis. *Journal of Radiation and Cancer Research* 2016 7.1: 45.
- Kwon H, Kim J, Jho EH. Role of the Hippo pathway and mechanisms for controlling cellular localization of YAP/TAZ. *FEBS J*. 2022 Oct;289(19):5798-5818. doi: 10.1111/febs.16091. Epub 2021 Jul 13. PMID: 34173335.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y. PMID: 8252621.
- Leimar O, Hartfelder K, Laubichler MD, Page RE Jr. Development and evolution of caste dimorphism in honeybees - a modeling approach. *Ecol Evol*. 2012

- Dec; 2(12): 3098-109. doi: 10.1002/ece3.414. Epub 2012 Nov 8. PMID: 23301175; PMCID: PMC3539003.
- Lewin HA, Robinson GE, Kress WJ, Baker WJ, Coddington J, Crandall KA, Durbin R, Edwards SV, Forest F, Gilbert MTP, Goldstein MM, Grigoriev IV, Hackett KJ, Haussler D, Jarvis ED, Johnson WE, Patrinos A, Richards S, Castilla-Rubio JC, van Sluys MA, Soltis PS, Xu X, Yang H, Zhang G. Earth BioGenome Project: Sequencing life for the future of life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Apr 24;115(17):4325-4333. doi: 10.1073/pnas.1720115115. PMID: 29686065; PMCID: PMC5924910.
- Li N, Shan N, Lu L, Wang Z. tRFtarget: a database for transfer RNA-derived fragment targets. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D254-D260. doi: 10.1093/nar/gkaa831. PMID: 33035346; PMCID: PMC7779015.
- Liu S, Zhang P, Song HS, Qi HS, Wei ZJ, Zhang G, Zhan S, Liu Z, Li S. Yorkie Facilitates Organ Growth and Metamorphosis in *Bombyx*. *Int J Biol Sci*. 2016 Jun 7;12(8):917-30. doi: 10.7150/ijbs.14872. PMID: 27489496; PMCID: PMC4971731.
- Lourenço AP, Mackert A, Cristino AS, Simões ZLP. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*. 2008 Jan;39(3):372-85. doi: 10.1051/apido:2008015.
- Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):307-15. doi: 10.1038/nature03098. PMID: 15549092.
- Macedo LM, Nunes FM, Freitas FC, Pires CV, Tanaka ED, Martins JR, Piulachs MD, Cristino AS, Pinheiro DG, Simões ZL. MicroRNA signatures characterizing caste-independent ovarian activity in queen and worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Mol Biol*. 2016 Jun;25(3):216-26. doi: 10.1111/imb.12214. Epub 2016 Feb 8. PMID: 26853694.
- Maleszka R. Beyond Royalactin and a master inducer explanation of phenotypic plasticity in honey bees. *Commun Biol*. 2018 Jan 22;1:8. doi: 10.1038/s42003-017-0004-4. PMID: 30271895; PMCID: PMC6123742.
- Manaboon M, Yasanga T, Sakurai S, Singtripop T. Programmed cell death of larval tissues induced by juvenile hormone in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*. *J Insect Physiol*. 2012 Sep;58(9):1202-8. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.06.004. Epub 2012 Jun 23. PMID: 22732232.
- Meeus I, Pisman M, Smaghe G, Piot N. Interaction effects of different drivers of wild bee decline and their influence on host-pathogen dynamics. *Curr Opin Insect Sci*. 2018 Apr;26:136-141. doi: 10.1016/j.cois.2018.02.007. Epub 2018 Feb 8. PMID: 29764653.
- Michelette ERF, Soares AEE. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*. 1993 Jan 24(4):431-40. doi: 10.1051/apido:19930410.
- Middleton CA, Nongthomba U, Parry K, Sweeney ST, Sparrow JC, Elliott CJ. Neuromuscular organization and aminergic modulation of contractions in the *Drosophila* ovary. *BMC Biol*. 2006 Jun 12;4:17. doi: 10.1186/1741-7007-4-17. PMID: 16768790; PMCID: PMC1526757.
- Mirth CK, Shingleton AW. Integrating body and organ size in *Drosophila*: recent advances and outstanding problems. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012 Apr 3;3:49. doi: 10.3389/fendo.2012.00049. PMID: 22654869; PMCID: PMC3356080.

- Mo JS. The role of extracellular biophysical cues in modulating the Hippo-YAP pathway. *BMB Rep.* 2017 Feb;50(2):71-78. doi: 10.5483/bmbrep.2017.50.2.199. PMID: 27916025; PMCID: PMC5342869.
- Nicolson S, Denton D, Kumar S. Ecdysone-mediated programmed cell death in *Drosophila*. *Int J Dev Biol.* 2015;59(1-3):23-32. doi: 10.1387/ijdb.150055sk. PMID: 26374522.
- Park GS, Oh H, Kim M, Kim T, Johnson RL, Irvine KD, Lim DS. An evolutionarily conserved negative feedback mechanism in the Hippo pathway reflects functional difference between LATS1 and LATS2. *Oncotarget.* 2016 Apr 26;7(17):24063-75. doi: 10.18632/oncotarget.8211. PMID: 27006470; PMCID: PMC5029684.
- Pinto LZ, Laure MA, Bitondi MM, Hartfelder K, Simões ZL. Ventral nerve cord remodeling in a stingless bee (*Melipona quadrifasciata* anthidioides, Hymenoptera, Apidae) depends on ecdysteroid fluctuation and programmed cell death. *Int J Dev Biol.* 2003 Jun;47(5):385-8. PMID: 12895033.
- Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K. Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen Comp Endocrinol.* 1990 Jul;79(1):31-8. doi: 10.1016/0016-6480(90)90085-z. PMID: 2354779.
- Ramos S, Chelemen F, Pagone V, Elshaer N, Irlles P, Piulachs MD. Eyes absent in the cockroach panoistic ovaries regulates proliferation and differentiation through ecdysone signalling. *Insect Biochem Mol Biol.* 2020 Aug;123:103407. doi: 10.1016/j.ibmb.2020.103407. Epub 2020 May 15. PMID: 32417417.
- Reginato RD, Cruz-Landim C. Ovarian growth during larval development of queen and worker of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae): a morphometric and histological study. *Braz J Biol.* 2003 Feb;63(1):121-7. doi: 10.1590/s1519-69842003000100016. Epub 2003 Aug 14. PMID: 12914423.
- Rembold H, Kremer JP, Ulrich GM. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie.* 1980 Jan;11(1):29-38. doi: 10.1051/apido:19800104.
- Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA.* 2004 Oct;10(10):1507-17. doi: 10.1261/rna.5248604. PMID: 15383676; PMCID: PMC1370637.
- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics.* 2000 Oct;16(10):944-5. doi: 10.1093/bioinformatics/16.10.944. PMID: 11120685.
- Schmidt Capella IC, Hartfelder K. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J Insect Physiol.* 1998 May;44(5-6):385-391. doi: 10.1016/s0022-1910(98)00027-4. PMID: 12770156.
- Schmidt Capella IC, Hartfelder K. Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honey bee ovary. *Cell Tissue Res.* 2002 Feb;307(2):265-72. doi: 10.1007/s00441-001-0490-y. Epub 2001 Dec 18. PMID: 11845333.
- Shi YY, Zheng HJ, Pan QZ, Wang ZL, Zeng ZJ. Differentially expressed microRNAs between queen and worker larvae of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie.* 2015 Mar;46(1):35-45. doi: 10.1007/s13592-014-0299-9.

- Singh G. *Drosophila's* contribution to stem cell research. *F1000Res*. 2015 Jun 18;4:157. doi: 10.12688/f1000research.6611.2. PMID: 26180635; PMCID: PMC4490781.
- Snodgrass R. *Anatomy of the honey bee*. Cornell University Press. 1956. 334p.
- Tanaka ED, Hartfelder K. The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. *Arthropod Struct Dev*. 2004 Oct;33(4):431-42. doi: 10.1016/j.asd.2004.06.006. Epub 2004 Sep 25. PMID: 18089049.
- Tanaka ED, Piulachs MD. Dicer-1 is a key enzyme in the regulation of oogenesis in panoistic ovaries. *Biol Cell*. 2012 Aug;104(8):452-61. doi: 10.1111/boc.201100044. Epub 2012 May 18. PMID: 22462497.
- Texada MJ, Koyama T, Rewitz K. Regulation of Body Size and Growth Control. *Genetics*. 2020 Oct;216(2):269-313. doi: 10.1534/genetics.120.303095. PMID: 33023929; PMCID: PMC7536854.
- Truman JW, Hiruma K, Allee JP, Macwhinnie SG, Champlin DT, Riddiford LM. Juvenile hormone is required to couple imaginal disc formation with nutrition in insects. *Science*. 2006 Jun 2;312(5778):1385-8. doi: 10.1126/science.1123652. PMID: 16741122.
- Xu P, Guo M, Hay BA. MicroRNAs and the regulation of cell death. *Trends Genet*. 2004 Dec;20(12):617-24. doi: 10.1016/j.tig.2004.09.010. PMID: 15522457.
- Wang D, Li XR, Dong DJ, Huang H, Wang JX, Zhao XF. The Steroid Hormone 20-Hydroxyecdysone Promotes the Cytoplasmic Localization of Yorkie to Suppress Cell Proliferation and Induce Apoptosis. *J Biol Chem*. 2016 Oct 7;291(41):21761-21770. doi: 10.1074/jbc.M116.719856. Epub 2016 Aug 22. PMID: 27551043; PMCID: PMC5076844.
- Yin L, Wang K, Niu L, Zhang H, Chen Y, Ji T, Chen G. Uncovering the Changing Gene Expression Profile of Honeybee (*Apis mellifera*) Worker Larvae Transplanted to Queen Cells. *Front Genet*. 2018 Oct 24;9:416. doi: 10.3389/fgene.2018.00416. PMID: 30405683; PMCID: PMC6207841.
- Zhang L. Control of growth and beyond: a special issue on Hippo signaling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2015 Jan;47(1):1. doi: 10.1093/abbs/gmu113. Epub 2014 Dec 2. PMID: 25467756.

## **8. ANEXOS**

---

**Tabela S1:** Os cinquenta genes e seus variantes presentes no genoma de *A. mellifera*, identificados pela ferramenta KEGG (Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto)

Genes	Símbolo	Gene ID	RefSeq	
			RNA	Proteína
protein diaphanous	diap1	412191	XM_395654.7	XP_395654.5
cellular tumor antigen p53	p53	100577122	XM_006560982.3	XP_006561045.1
			XM_003249744.4	XP_003249792.1
			XM_016916870.2	XP_016772259.1
protein limb expression 1 homolog	LIX1L	551265	XM_006561807.3	XP_006561870.1
			XM_623656.5	XP_623659.3
protein dachsous	DCHS1_2	408767	XM_026440137.1	XP_026295922.1
			XM_026440140.1	XP_026295925.1
			XM_026440139.1	XP_026295924.1
			XM_026440138.1	XP_026295923.1
			XM_026440141.1	XP_026295926.1
cadherin-related tumor suppressor	FAT4	410009	XM_026440870.1	XP_026296655.1
			XM_026440868.1	XP_026296653.1
casein kinase I	CSNK1E	412108	XM_006558957.3	XP_006559020.1
			XM_006558954.3	XP_006559017.1
			XM_016914939.2	XP_016770428.1
			XM_006558956.3	XP_006559019.1
			XM_026443767.1	XP_026299552.1
			XM_006558958.2	XP_006559021.1
			XM_006558959.3	XP_006559022.1
arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein	RERE	409084	XM_006563055.3	XP_006563118.1
			XM_016916209.2	XP_016771698.1
			XM_392608.7	XP_392608.4
			XM_006563054.3	XP_006563117.1
			XM_016916208.2	XP_016771697.1
			XM_006563057.3	XP_006563120.1
			XM_016916207.2	XP_016771696.1
palmitoyltransferase app	ZDHHC14_18	412051	XM_026443491.1	XP_026299276.1
			XM_026443490.1	XP_026299275.1
lipoma-preferred partner homolog	LPP	412617	XM_006563048.3	XP_006563111.2
			XM_006563047.3	XP_006563110.2
			XM_006563050.3	XP_006563113.2

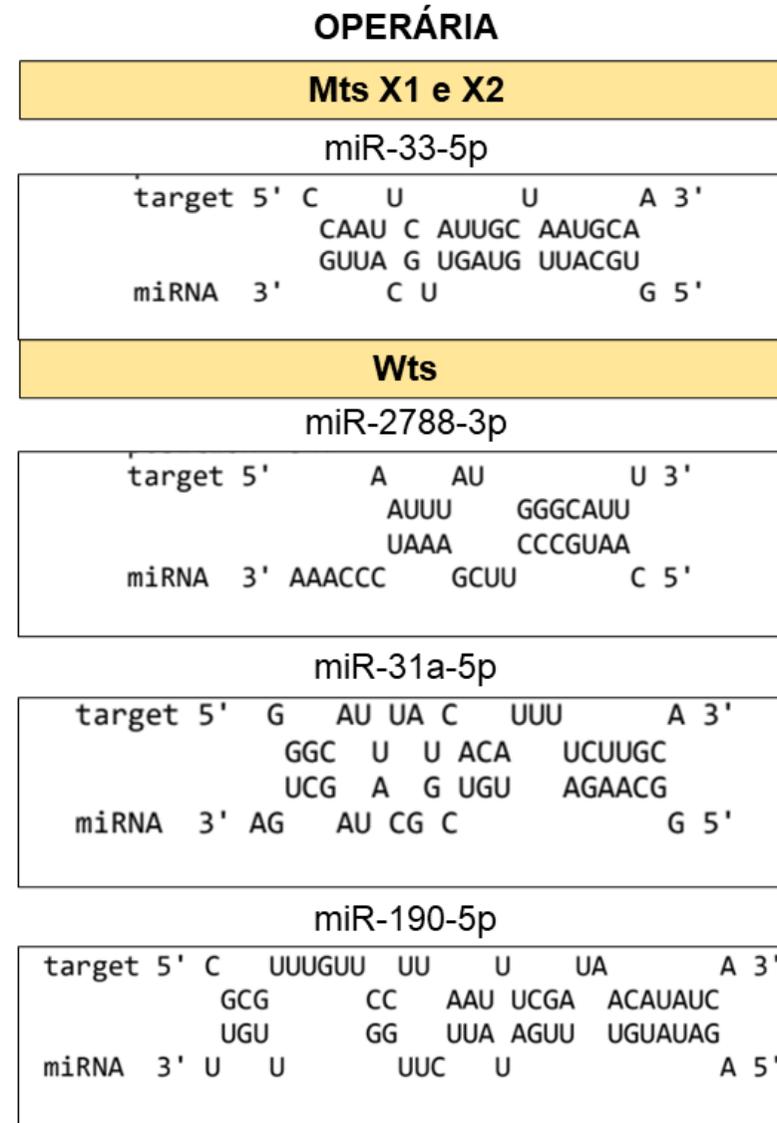
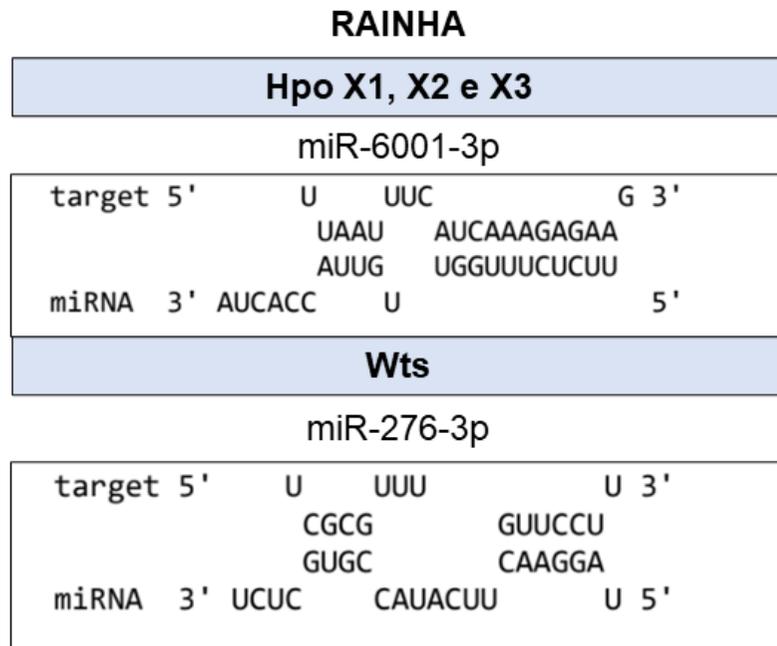
unconventional myosin-IXb	DACHS	551706	XM_016914569.2 XM_026443129.1 XM_016914568.2 XM_026443125.1 XM_026443128.1 XM_026443132.1 XM_026443133.1 XM_026443131.1 XM_026443130.1 XM_026443127.1 XM_026443126.1 XM_624095.5	XP_016770058.2 XP_026298914.1 XP_016770057.2 XP_026298910.1 XP_026298913.1 XP_026298917.1 XP_026298918.1 XP_026298916.1 XP_026298915.1 XP_026298912.1 XP_026298911.1 XP_624098.3
lethal(2) giant larvae protein homolog 1	LLGL	409348	XM_006558963.3 XM_006558967.3 XM_006558962.3 XM_006558960.3 XM_006558965.3 XM_006558961.3 XM_392864.7 XM_006558964.3	XP_006559026.1 XP_006559030.1 XP_006559025.1 XP_006559023.1 XP_006559028.1 XP_006559024.1 XP_392864.4 XP_006559027.1
atypical protein kinase C	PRKCI	413834	XM_016917618.2 XM_026446280.1 XM_006558603.3 XM_397273.7	XP_016773107.2 XP_026302065.1 XP_006558666.1 XP_397273.4
ras association domain-containing protein 2	RASSF2_4	724888	XM_001120788.4	XP_001120788.1
serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit	PPP2C	550710	XM_623102.6	XP_623105.1
serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A	PPP2R1	726088	XM_001120202.5 XM_006562757.3	XP_001120202.2 XP_006562820.1
protein phosphatase PP2A 55 kDa regulatory subunit	PPP2R2	410604	XM_026445688.1 XM_394082.7 XM_026445690.1 XM_026445689.1 XM_006563479.3 XM_026445687.1	XP_026301473.1 XP_394082.3 XP_026301475.1 XP_026301474.1 XP_006563542.1 XP_026301472.1

			XM_016916740.2	XP_016772229.1
			XM_016916742.2	XP_016772231.1
			XM_016916741.2	XP_016772230.1
protein eiger	EGR	725245	XM_016915131.2	XP_016770620.1
			XM_001121117.5	XP_001121117.1
tumor necrosis factor receptor superfamily member wengen	WGN	726958	XM_016914178.2	XP_016769667.1
			XM_001122675.5	XP_001122675.2
stress-activated protein kinase JNK	JNK	409286	XM_016911128.2	XP_016766617.1
			XM_006557237.3	XP_006557300.1
			XM_006557239.3	XP_006557302.1
			XM_006557238.3	XP_006557301.1
			XM_026439401.1	XP_026295186.1
			XM_006557240.3	XP_006557303.1
hemicentin-2	ED	413423	XM_006567137.3	XP_006567200.2
			XM_006567136.3	XP_006567199.2
			XM_026440038.1	XP_026295823.1
Arp1 actin related protein 1	ACTB_G1	406122	NM_001185145.1	NP_001172074.1
			NM_001185146.1	NP_001172075.1
protein crumbs	CRB	725591	XM_026439371.1	XP_026295156.1
			XM_026439372.1	XP_026295157.1
			XM_026439374.1	XP_026295159.1
partitioning defective 3 homolog	PARD3	726759	XM_016915810.2	XP_016771299.2
partitioning defective protein 6	PARD6	724977	XM_001120877.5	XP_001120877.2
			XM_026441295.1	XP_026297080.1
uncharacterized LOC409904	MPP5	409904	XM_016914813.2	XP_016770302.2
			XM_016914812.2	XP_016770301.2
			XM_016914811.2	XP_016770300.2
			XM_016914809.2	XP_016770298.2
			XM_006570314.3	XP_006570377.3
			XM_016914810.2	XP_016770299.2
			XM_006570310.3	XP_006570373.3
			XM_026443998.1	XP_026299783.1
			XM_006570316.3	XP_006570379.2
			XM_016914814.2	XP_016770303.2

LIM domain-containing protein jub	AJUBA	408431	XM_391978.6	XP_391978.2
protein lap4	SCRIB	413669	XM_026439998.1	XP_026295783.1
			XM_026440003.1	XP_026295788.1
			XM_026440000.1	XP_026295785.1
			XM_026440002.1	XP_026295787.1
			XM_026439997.1	XP_026295782.1
			XM_026440007.1	XP_026295792.1
			XM_026440006.1	XP_026295791.1
			XM_026440004.1	XP_026295789.1
			XM_026439999.1	XP_026295784.1
			XM_026440001.1	XP_026295786.1
			XM_026440005.1	XP_026295790.1
			XM_026440008.1	XP_026295793.1
disks large 1 tumor suppressor protein	DLG1	724292	XM_026444421.1	XP_026300206.1
			XM_026444422.1	XP_026300207.1
			XM_026444412.1	XP_026300197.1
			XM_026444416.1	XP_026300201.1
			XM_026444414.1	XP_026300199.1
			XM_026444415.1	XP_026300200.1
			XM_026444411.1	XP_026300196.1
			XM_026444419.1	XP_026300204.1
			XM_026444420.1	XP_026300205.1
			XM_026444417.1	XP_026300202.1
			XM_026444418.1	XP_026300203.1
			XM_026444426.1	XP_026300211.1
			XM_026444423.1	XP_026300208.1
			XM_026444425.1	XP_026300210.1
protein expanded-like	EX	409898	XM_026441439.1	XP_026297224.1
merlin	NF2	100576968	XM_006559507.3	XP_006559570.1
			XM_003249478.4	XP_003249526.1
			XM_006559508.3	XP_006559571.1
			XM_006559509.3	XP_006559572.1
protein kibra	WWC1	413440	XM_396884.7	XP_396884.3
			XM_006561991.3	XP_006562054.1

			XM_016911883.2	XP_016767372.1
			XM_003249951.4	XP_003249999.1
serine/threonine-protein kinase 3	STK3	410208	XM_006566028.2	XP_006566091.1
			XM_393691.6	XP_393691.4
			XM_016914482.1	XP_016769971.1
scaffold protein salvador	SAV1	552413	XM_016912444.2	XP_016767933.1
serine/threonine-protein kinase Warts	LATS1_2	411678	XM_026440102.1	XP_026295887.1
			XM_395146.7	XP_395146.3
MOB kinase activator-like 1	MOB1	409540	XM_393046.7	XP_393046.2
			XM_006568252.3	XP_006568315.2
transcriptional coactivator YAP1	YAP1	408292	XM_026443161.1	XP_026298946.1
			XM_391844.6	XP_391844.3
14-3-3 protein zeta	YWHAB_Q_Z	102655329	XM_006566098.3	XP_006566161.1
			XM_006566096.3	XP_006566159.1
			XM_006566097.3	XP_006566160.1
			XM_016914363.2	XP_016769852.1
			XM_006566093.3	XP_006566156.1
14-3-3 protein epsilon	YWHAE	408951	XM_006559821.3	XP_006559884.1
protein mothers against dpp	SMAD1	409301	XM_016911916.2	XP_016767405.1
			XM_006567242.3	XP_006567305.1
			XM_016911915.2	XP_016767404.1
transcriptional enhancer factor TEF-1	TEAD	408616	XM_006562525.3	XP_006562588.1
			XM_026446055.1	XP_026301840.1
			XM_026446053.1	XP_026301838.1
			XM_006562527.3	XP_006562590.1
			XM_016913824.2	XP_016769313.1
			XM_016913819.2	XP_016769308.1
			XM_026446054.1	XP_026301839.1
			XM_016913826.2	XP_016769315.1
			XM_006562524.3	XP_006562587.1
			XM_006562529.3	XP_006562592.1
			XM_392157.6	XP_392157.3
			XM_006562526.3	XP_006562589.1
			XM_006562523.3	XP_006562586.1

homeobox protein homothorax	HTH	552079	XM_016912223.2	XP_016767712.1
			XM_026440631.1	XP_026296416.1
			XM_026440632.1	XP_026296417.1
			XM_026440633.1	XP_026296418.1
			XM_006564734.3	XP_006564797.1
bantam microRNA bantam	BAN	732515	NR_031508.1	
G1/S-specific cyclin-E1	CCNE	411327	XM_016914185.2	XP_016769674.2
transcriptional regulator Myc-B	MYC	100576392	XM_016914905.2	XP_016770394.1
			XM_016914906.2	XP_016770395.1
			XM_003250399.4	XP_003250447.1
division abnormally delayed protein	DALLY	552545	XM_026440932.1	XP_026296717.1
			XM_026440933.1	XP_026296718.1
protein Wnt-1	WNT1	413502	XM_026444306.1	XP_026300091.1
ras-interacting protein RIP3-like	VN	113218545	XM_026443371.1	XP_026299156.1
uncharacterized LOC100577697	KRN	100577697	XM_016916948.2	XP_016772437.2
			XM_016916949.2	XP_016772438.2
inaD-like protein	PatJ (inaD-like)	409020	XM_026442738.1	XP_026298523.1
protein tiptop	Tsh	102654448	XM_026444602.1	XP_026300387.1
			XM_026444601.1	XP_026300386.1
			XM_026444599.1	XP_026300384.1
			XM_026444600.1	XP_026300385.1
			XM_026444597.1	XP_026300382.1
			XM_026444598.1	XP_026300383.1



**Figura S1:** Estruturas de ligação entre os miRNAs e as sequencias 3'UTR dos mRNAs da via Hippo presentes no genoma de rainhas e operárias da espécie *A. mellifera*.