Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

“Padrões diferenciais de expressão gênica no desenvolvimento das castas de *Apis mellifera*, com ênfase na diferenciação das operárias”

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de DOUTOR em CIÊNCIAS – Área de concentração: GENÉTICA.

Aluna: Aline Carolina Aleixo Silva

Orientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

Ribeirão Preto
2012

Aleixo Silva, Aline Carolina

“Padrões diferenciais de expressão gênica no desenvolvimento das castas de *Apis mellifera*, com ênfase na diferenciação das operárias” / Aline Carolina Aleixo Silva; orientadora Zilá Luz Paulino Simões – Ribeirão Preto, 2012.

172 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado (Área de Concentração: Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. *Apis mellifera* 2. castas 3. *ultraspiracle* 4. *cryptocephal*
5. *retinoid- and fatty acid-binding protein*
6. *esterase do hormônio juvenil* 7. microRNA

PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2012.

Aos meus Pais, com quem aprendi a ser quem sou,
pelo maravilhoso exemplo, e por me fazerem saber
o que é o amor incondicional e o significado de "*I
will be there for you*", DEDICO.

Agradeço imensamente:

à *Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões*, por todos estes anos de aprendizado, profissional e pessoal, pela imensa contribuição em minha formação, pela paciência, pelo carinho e por me proporcionar, com tanta competência, cumprir mais esta etapa.

à *Profa. Dra. Christina Grozinger*, por me receber em seu laboratório na Universidade do Estado da Pensilvânia (EUA), pelos ensinamentos, pela gentileza e carinho.

à *Profa. Mácia Bitondi*, pelo apoio e dedicação.

à *Vera Figueiredo*, pelo seu trabalho como técnica contribuindo para o bom andamento do laboratório como humor ácido que sempre nos divertia;

à *Sara Kocher* pela ajuda nos experimentos de microarrays e por fazer isto com muita dedicação.

ao *Bernardo Niño*, técnico do Laboratório de Ecologia Química (State College – EUA), pela imensa ajuda e paciência durante minha estadia naquele laboratório.

à *Flavia Freitas* pela valiosa ajuda com as análises de *miRNA* e RNA-Seq e por toda a paciência nas explicações e pelas sugestões,

à *Karina Guidugli*, *Francis Nunes* e *Flávia Freitas* pela valiosas dicas e sugestões que fizeram este trabalho melhor.

ao *Roberto Barchuk* pela grande contribuição em minha formação acadêmica, pelo incentivo, gentileza e bom humor de sempre e pela grande ajuda na finalização desta tese;

à *Tathiana Mello*, pela grande contribuição principalmente na finalização deste trabalho;

à *Holly Holt* pelo apoio na leitura e sugestões do abstract;

à *Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman*, pelos clones com a sequência de *gfp*;

a todos do *LBDA*, atuais e também aqueles que dele fizeram parte, pelo aprendizado proporcionado, pelo compartilhamento de amostras, *primers*, conhecimento, etc., pelo convívio diário, ótimo ambiente de trabalho e pela amizade

a toda equipe do *Laboratório de Ecologia Química* (State College – EUA) pela simpatia com que sempre me trataram.

ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Soares pelo carinho, amizade e dedicação.

aos *Técnicos Apícolas do LBDA*, Luiz Aguiar e Rogério Pereira, sem os quais este trabalho não seria possível.

À *equipe da Secretaria do Departamento de Genética*, em especial à *Susie Nalon*, por estar sempre disposta a ajudar.

à *Pró-Reitoria de Pós-Graduação*, por contribuir com minha ida aos Estados Unidos para o estágio,

à *Claudinéia Costa, Flávia Freitas, Camilla Valente, Vanessa Bonatti, Omar Martinez, Michelle Prioli, Tathiana Mello, Fernanda Torres e Francis Nunes*, por fazerem destes anos de Doutorado muito mais divertidos, especialmente à *Livia Moda* minha companheira em todas as horas.

aos meus pais, *João Bosco e Marlei*, por nunca me faltarem, pelo constante apoio e incentivo.

à minha irmã *Ana Gabriella* que por sua admiração me faz querer ser sempre melhor, para ser um bom exemplo.

ao meu irmão *Thiago* e minha cunhada *Priscila*, por estarem sempre torcendo por mim.

à *FAPESP* pelo apoio financeiro, grande determinante para a realização deste trabalho e todas as atividades nele envolvidas.

ao *Departamento de Genética* da FMRP – USP, pela oportunidade e por contribuir com minha formação durante o Doutorado.

a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Aleixo Silva, A.C. “**Padrões diferenciais de expressão gênica no desenvolvimento das castas de *Apis mellifera*, com ênfase na diferenciação das operárias**”. 172 p. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Nas abelhas sociais *Apis mellifera* a determinação de castas está relacionada à nutrição diferencial durante o desenvolvimento larval. Os indivíduos são alimentados com geléia real até o terceiro estágio larval, quando aqueles que são destinados a se tornarem operárias passam a receber uma mistura de secreções glandulares, mel e pólen. O conteúdo da dieta recebida após o terceiro estágio larval ativará respostas endócrinas diferenciais que resultarão no estímulo de vias distintas de expressão gênica que culminarão no desenvolvimento de rainhas e operárias. Vários modelos de determinação de castas foram propostos envolvendo diferentes fatores que atuam sobre o desenvolvimento de cada uma, em especial o Hormônio Juvenil (HJ), as vias de sinalização por insulina/IGF e TOR (*target of rapamycin*) a metilação diferencial e a proteína recentemente descoberta, *royalactin*, que favorecem o desenvolvimento de rainhas. Para o desenvolvimento de operárias foi sugerido estímulo de outras vias de sinalização, que possivelmente envolveria a participação dos genes *ultraspiracle* (*usp*), *cryptocephal* (*crc*) e *retinoid- and fatty acid-binding protein* (*RfaBp*). Utilizando diferentes abordagens avaliamos a participação destes genes no processo que culmina no desenvolvimento das castas. Através da análise de expressão gênica em larga escala utilizando *microarrays*, observamos a existência de genes diferencialmente expressos em rainhas e operárias, sendo a maior que parte deles apresentou expressão preferencial em operárias. Muitos destes genes, inclusive *esterase do hormônio juvenil* (*jhe*), *failed axon connections* (*fax*), *activating transcription factor-3* (*atf-3*), *cathepsin-D* (*cath-D*) e *peptidoglycan recognition protein-SC2* (*pgrp-sc2*), preferencialmente expressos em operárias, estão envolvidos, segundo análises de função por *Gene Ontology*, em processos essenciais no desenvolvimento das castas como crescimento, reprodução, apoptose, neurogênese, degradação do hormônio juvenil, entre outros. A partir destes resultados, incluímos o gene da *esterase do hormônio juvenil* (*jhe*) em nossas análises, como um possível candidato a determinante do desenvolvimento diferencial das operárias. Além disto, foi determinado o perfil de expressão de *usp*, *crc*, *RfaBp* e *jhe*, durante o desenvolvimento de rainhas e operárias. Observamos que os maiores níveis de expressão de cada um são encontrados em fases posteriores ao período crítico de determinação de castas e que em geral, os maiores níveis de expressão são encontrados em operárias, especialmente *crc*, *RfaBp* e *jhe*. Para *usp*, os níveis são distintos em rainhas e operária apenas em pontos específicos entre o quinto estágio larval e a fase pré-pupal. Adicionalmente avaliamos a influência da diminuição, através de interferência por RNA (RNAi), dos níveis de expressão de cada um destes genes sobre os níveis dos outros genes estudados, e também sua atuação no desenvolvimento. Vimos que mesmo pequenas modificações nestes níveis inibem ou estimulam a expressão de outros genes e, em alguns casos causam alterações no desenvolvimento das abelhas. Sabendo da importância dos microRNAs (miRNAs) na regulação da expressão gênica e do desenvolvimento, avaliamos os níveis de expressão dos miRNAs preditos como reguladores de *jhe*. Os resultados obtidos mostraram que alguns deles, como *let-7*, *miR-2796* e *miR-263b*, por apresentarem correlação negativa com os níveis do gene alvo, são realmente fortes candidatos a seus reguladores. Além disto, alterações nos níveis do gene alvo, mostraram a capacidade de alterar os níveis de expressão da maioria dos miRNAs preditos. Este resultado foi corroborado por sequenciamento em larga escala das amostras tratadas com *dsjhe* e controle, que apontou também outros possíveis reguladores de *jhe*, entre eles *miR-100*, *miR-306* e *mi-13b*. Analisando os resultados obtidos de forma conjunta podemos sugerir que o desenvolvimento de operárias está sob complexa regulação que envolve a participação dos genes aqui estudados, além de outros fatores como os miRNAs. Estes genes agem de maneira coordenada, inclusive com os miRNAs, em momentos específicos do desenvolvimento atuando sobre cascatas de expressão gênica de forma a ativar ou inibir a expressão uns dos outros e também de outros genes, o que culminará no desenvolvimento diferencial de rainhas e operárias em *A. mellifera*.

Palavras chave: *Apis mellifera*, castas, *ultraspiracle*, *cryptocephal*, *retinoid- and fatty acid-binding protein*, *esterase do hormônio juvenil*, microRNA.

ABSTRACT

Aleixo Silva, A.C., “Gene expression patterns governing caste determination in the honey bee (*Apis mellifera*) with an emphasis on worker differentiation”. 172 p. Thesis presented to the Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

In *Apis mellifera*, a eusocial bee, caste determination during larval development is regulated by differential nutrition. All female larvae are fed royal jelly until the third larval stage, when the worker-destined ones have their diet switched to a gland secretion mix, honey and pollen, Queen-destined larvae, however, are provisioned with a rich diet throughout development. Changes in diet after the third developmental stage modulate larval endocrine responses and different nutritional regimes trigger distinct patterns of gene expression. Thus, nutritional regulation of specific signaling pathways controls development of worker and queen phenotypes. Several proposed models of this process involve caste-specific regulation of hormonal and nutritional factors and/or molecular processes including Juvenile Hormone (JH), insulin/IGF and TOR (*target of rapamycin*) signaling pathways, differential methylation and the newly discovered protein *royalactin*, which facilitates queen development. Previous research has also suggested the stimulus of other factors in signaling pathways that acts towards workers development, and they possibly involves the participation of some genes like *ultraspiracle* (*usp*), *cryptocephal* (*crc*), and *retinoid- and fatty acid-binding protein* (*RfaBp*). Using diverse molecular approaches, we evaluate the role of these genes in caste differentiation. We used microarrays to characterize global differences in gene expression between queen and worker larvae. Functional analysis of significantly, differentially expressed genes identified fundamental biological processes including growth, reproduction, apoptosis, neurogenesis and JH degradation that are involved in caste differentiation. Based on these findings, we selected several candidate genes including *juvenile hormone esterase* (*jhe*), *failed axon connections* (*fax*), *activating transcription factor-3* (*atf-3*), *cathepsin-D* (*cath-D*), and *peptidoglycan recognition protein-SC2* (*pgrp-sc2*) for investigation. Notably, these genes were preferentially upregulated in workers. In a separate experiment, we monitored expression of *usp*, *crc*, *RfaBp* and *jhe*, in queen and worker larval during stages critical to caste determination. In general, workers expressed *crc*, *RfaBp* and *jhe* at higher levels than queens. For *usp*, distinct expression levels between worker- and queen-destined larvae were observed only at specific points between the 5th larval stage and pre-pupal phase. Additionally we used RNA interference (RNAi) to monitor the impact of decreased levels of select candidate genes on larval development. We found that even small modification of gene expression levels inhibited or triggered expression of other genes, and, in some cases, caused developmental alterations. Furthermore, microRNAs (miRNAs) are also important regulators of gene expression during development and we identified miRNAs that were predicted *jhe* regulators and assessed their levels. Results determined that some miRNAs including *let-7*, *miR-2796* e *miR-263b* were strong candidates for *jhe* regulation because they were significantly and negatively correlated with target gene expression levels. Furthermore, manipulation of target gene expression levels altered expression of most predicted miRNAs. These results were confirmed by deep sequencing of RNAi samples treated with double-stranded RNA for *jhe* gene (*dsjhe*) and controls (with no treatment) which also identified other candidate *jhe* regulators, like *miR-100*, *miR-306* and *mi-13b*. Taken together, these results suggest that worker development is regulated by complex interactions that involve *usp*, *crc*, *RfaBp* and *jhe* in addition to other molecules, including miRNAs. These molecular participants coordinate development at specific time points by regulating activity of gene networks and each other, producing the differential development of workers and queens in *A. mellifera*.

Keywords: *Apis mellifera*, castas, *ultraspiracle*, *cryptocephal*, *retinoid- and fatty acid-binding protein*, *esterase do hormônio juvenil*, microRNA.

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE DETERMINAÇÃO DE CASTAS EM <i>Apis mellifera</i>	13
1.2 MODELO UNIFICADO DA DETERMINAÇÃO DE CASTAS EM <i>Apis mellifera</i>	15
1.3 GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA DETERMINAÇÃO DE OPERÁRIAS EM <i>Apis mellifera</i>	18
1.3.1 <i>cryptocephal</i> - <i>crc</i>	19
1.3.2 <i>retinoid- and fatty acid-binding protein</i> ou <i>lipoforina</i> (<i>RfaBp</i> ou <i>lp</i>).....	20
1.3.3 <i>ultraspiracle</i> (<i>usp</i>).....	20
1.3.4 <i>esterase do hormônio juvenil</i> (<i>jhe</i>)	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVOS GERAIS	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	28
3.2 DESENHO DE <i>PRIMERS</i>	28
3.3 SEQUENCIAMENTO	30
3.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	30
3.3.2 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA	30
3.3.3 AMPLIFICAÇÃO POR PCR	31
3.3.4 LIGAÇÃO DO FRAGMENTO AO VETOR DE CLONAGEM	31
3.3.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA E MINI-PREPARAÇÕES	32
3.3.6 DIGESTÃO DO DNA PLASMIDIAL	32
3.3.7 SEQUENCIAMENTO GÊNICO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	32
3.4 PARA OS ESTUDOS DE EXPRESSÃO DOS GENES	33
3.4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	33
3.4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA (qPCR) OU PCR REAL-TIME	34
3.4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
3.5 PARA OS <i>MICROARRAYS</i>	35
3.5.1 MATERIAL BIOLÓGICO E PROTOCOLO DOS EXPERIMENTOS	35
3.5.2 SÍNTESE DE cDNA A PARTIR DO RNA NÃO-AMPLIFICADO	36
3.5.3 AMPLIFICAÇÃO DO RNA COM T7.....	37
3.5.4 MARCAÇÃO POR ULS™ (UNIVERSAL LINKAGE SYSTEM), PURIFICAÇÃO E FRAGMENTAÇÃO DO aRNA	37

3.5.5 PREPARAÇÃO, PRÉ-HIBRIDAÇÃO E HIBRIDAÇÃO DAS LÂMINAS DE <i>MICROARRAYS</i>	38
3.5.6 LAVAGENS PÓS-HIBRIDAÇÃO	39
3.5.7 ANÁLISES DOS RESULTADOS DOS <i>MICROARRAYS</i>	39
3.5.8 ANÁLISE DOS GENES COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL ENTRE AS CASTAS	39
3.6 PARA OS ESTUDOS DE SILENCIAMENTO UTILIZANDO INTERFERÊNCIA POR RNA (RNAi).....	41
3.6.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	41
3.6.2 PRIMERS	41
3.6.3 AMPLIFICAÇÃO POR PCR	42
3.6.4 SUPER PCR	42
3.6.5 SÍNTESE DO RNA DE FITA DUPLA (dsRNA)	42
3.6.6 PURIFICAÇÃO DO dsRNA UTILIZANDO TRIzol [®]	43
3.6.7 TRATAMENTO COM dsRNA.....	43
3.6.7.1 <i>esterase do hormônio juvenil -jhe</i>	44
3.6.7.2 <i>ultraspiracle -usp</i>	44
3.6.7.3 <i>cryptocephal - crc e retinoid- and fatty acid-binding protein - RfaBp</i>	44
3.6.7.4 PARA VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO SILENCIAMENTO.....	44
3.7 IDENTIFICAÇÃO DOS miRNAs CANDIDATOS A REGULADORES DO GENE DA <i>esterase do hormônio juvenil (jhe)</i>	46
3.7.1 PREDIÇÃO DOS microRNAs REGULADORES DO GENE DA <i>esterase do hormônio juvenil (jhe)</i>	46
3.7.2 VALIDAÇÃO DA PREDIÇÃO DOS microRNAs REGULADORES DO GENE <i>jhe</i>	46
3.7.2.1 SÍNTESE DE cDNA A PARTIR DE miRNAs E QUANTIFICAÇÃO POR PCR REAL-TIME.....	47
3.8 IDENTIFICAÇÃO DOS MIRNAS AFETADOS PELO SILENCIAMENTO DO GENE CODIFICADOR DA <i>esterase do hormônio juvenil – jhe</i>	47
3.8.1 SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA DE PEQUENOS RNAs	47
3.8.2 ANÁLISE DAS BIBLIOTECAS GERADAS PELO SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA.....	48
3.8.3 PREDIÇÃO DOS GENES REGULADOS PELOS MIRNAS AFETADOS PELO SILENCIAMENTO DO GENE CODIFICADOR DA <i>esterase do hormônio juvenil - jhe</i>	49
4. RESULTADOS.....	50
4.1 PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA	51
4.1.1 <i>cryptocephal (crc)</i>	51
4.1.2 <i>retinoid- and fatty acid-binding protein - RfaBp</i>	52
4.1.3 <i>ultraspiracle (usp)</i>	53
4.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL POR MICROARRAYS	54
4.3 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE CODIFICADOR DA <i>esterase do hormônio juvenil (jhe)</i>	57

4.4 SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNAi	59
4.4.1 <i>cryptocephal</i> - <i>crc</i>	59
4.4.2 <i>retinoid- and fatty acid-binding protein</i> - <i>RfaBp</i>	62
4.4.3 <i>ultraspiracle</i> - <i>usp</i>	64
4.4.4 <i>esterase do hormônio juvenil</i> - <i>jhe</i>	66
4.5 BUSCA POR microRNAs REGULADORES DE <i>jhe</i>	69
4.6 VALIDAÇÃO DE miRNAs SUGERIDOS COMO REGULADORES DE <i>jhe</i>	71
4.6.1 ESTUDOS DE EXPRESSÃO DOS miRNAs EM RAINHAS E OPERÁRIAS	71
4.6.2 ESTUDOS DE EXPRESSÃO DOS miRNAs EM AMOSTRAS <i>KNOCK-DOWN</i> PARA <i>jhe</i>	73
4.7 SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA DOS PEQUENOS RNAs	75
4.7.1 CARACTERIZAÇÃO DAS BIBLIOTECAS OBTIDAS ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DE PEQUENOS RNAs	75
4.7.2 IDENTIFICAÇÃO DOS miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NAS BIBLIOTECAS “TRATAMENTO” E “CONTROLE”	76
5. DISCUSSÃO	83
5.1 GENES ESPECIALMENTE ENVOLVIDOS NA DETERMINAÇÃO DE CASTAS	84
5.1.1 <i>cryptocephal</i> - <i>crc</i>	84
5.1.2 <i>retinoid- and fatty acid-binding protein</i> - <i>RfaBp</i>	86
5.1.3 <i>ultraspiracle</i> - <i>usp</i>	87
5.1.4 <i>esterase do hormônio juvenil</i> - <i>jhe</i>	88
5.2 EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL NAS DIFERENTES CASTAS DE ABELHAS <i>Apis mellifera</i>	91
5.3 EFEITOS DO NOCAUTE DOS GENES ESPECIALMENTE ENVOLVIDOS NA DETERMINAÇÃO DE CASTAS SOBRE DIFERENTES PROCESSOS BIOLÓGICOS	93
5.3.1 <i>cryptocephal</i> - <i>crc</i>	93
5.3.2 <i>retinoid- and fatty acid-binding protein</i> – <i>RfaBp</i>	94
5.3.3 <i>ultraspiracle</i> - <i>usp</i>	95
5.3.4 <i>esterase do hormônio juvenil</i> - <i>jhe</i>	97
5.3.5 PANORAMA GERAL DAS INTERAÇÕES DESENCADEADAS PELO NOCAUTE DE GENES RELEVANTES NA DETERMINAÇÃO DE CASTAS	98
5.4 ATUAÇÃO DOS microRNAs NO PROCESSO DE DETERMINAÇÃO DE CASTAS	99
5.4.1 POTENCIAIS miRNAs REGULADORES DE <i>jhe</i>	99
5.4.2 EXPRESSÃO DE miRNAs EM RAINHAS E OPERÁRIAS	101
5.4.3 EFEITOS DO NOCAUTE DE <i>jhe</i> NO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE miRNAs	102
5.5 PROPOSIÇÃO DE NOVAS RELAÇÕES DENTRO DO MODELO DE DETERMINAÇÃO DE CASTAS EM ABELHAS <i>Apis mellifera</i>	106
6. CONCLUSÕES	107

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
ANEXOS	125
ANEXO 1 - ORGANIZAÇÃO GÊNICA DE <i>crc</i> , <i>RfaBp</i> , <i>usp</i> E <i>jhe</i>	126
ANEXO 2 - RESULTADOS DE SEQUENCIAMENTO E ALINHAMENTOS DAS SEQUÊNCIAS DE <i>crc</i> E <i>RfaBp</i>	129
ANEXO 3	138
ANEXO 3A - LISTA DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM AMOSTRAS TRATADAS COM dsGFP E CONTROLE, OBTIDOS POR MICROARRAYS	139
ANEXO 3B - ANÁLISES DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM AMOSTRAS dsGFP E CONTROLE	140
ANEXO 4 - EFEITOS DE dsGFP NA EXPRESSÃO DOS GENES ALVO DO TRATAMENTO COM RNAi	142
ANEXO 5	145
ANEXO 5A - TABELA DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE RAINHAS E OPERÁRIAS NO QUARTO ESTÁGIO LARVAL, OBTIDOS POR MICROARRAYS	146
ANEXO 5B -TABELA CONTENDO AS CATEGORIAS DE PROCESSOS BIOLÓGICOS NOS QUAIS OS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE RAINHAS E OPERÁRIAS NO QUARTO ESTÁGIO LARVAL ESTÃO ENVOLVIDOS DE ACORDO COM ANÁLISES DE <i>GENE ONTOLOGY</i>	147
ANEXO 6 - RESULTADOS DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE mirNAS EM RAINHAS E OPERÁRIAS	148
ANEXO 7 - GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM RAINHAS E OPERÁRIAS COMPARTILHADOS NOS TRABALHOS ALEIXO SILVA (2012) E BARCHUK <i>ET AL.</i> (2007)	150
ANEXO 8 - PRIMEIRA VERSÃO DE MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO	152

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE DETERMINAÇÃO DE CASTAS EM *Apis mellifera*

As abelhas *Apis mellifera* são insetos eussociais pertencentes à ordem Hymenoptera. A definição de eussocialidade inclui divisão de trabalho entre indivíduos, específicos de cada casta, o cuidado com a prole e a sobreposição de gerações, que determinam o bom funcionamento de uma colônia (Gullan & Cranston, 1994). O dimorfismo de castas, presença de rainha e operárias, uma das características dos insetos sociais, também está presente nas abelhas *A. mellifera*. As rainhas, cuja principal função em uma colônia é a reprodução, possuem o sistema reprodutivo bem desenvolvido, espermateca funcional e taxas reprodutivas altas. Tipicamente existe uma rainha por colônia que é capaz de pôr mais de 2.000 ovos por dia. As operárias são responsáveis por desempenhar tarefas que promovem a manutenção da colônia, incluindo alimentação da cria e da rainha, construção de favos, coleta e processamento do alimento, defesa e limpeza da colônia, entre outras. Elas são facultativamente estéreis, seu aparelho reprodutor é pouco desenvolvido e parcialmente substituído pelo aparelho ferroador, o que as incapacita de serem fecundadas. As operárias apresentam características morfológicas que não são encontradas em rainhas de sua espécie, incluindo órgãos de defesa e sensoriais, além dos ligados às mudanças comportamentais, relacionados com as tarefas que desenvolverão ao longo de suas vidas, como a coleta de pólen, por exemplo (Wilson, 1971; Michener, 1974). Elas estão presentes normalmente em dezenas de milhares por colônia e apresentam habilidades cognitivas sofisticadas (Witthöft, 1967).

Nesta espécie de abelha, considerada modelo para desenvolvimento de castas e divisão de trabalho em Hymenoptera sociais, o principal fator responsável pelo dimorfismo das fêmeas é a nutrição diferencial da larva, durante os primeiros dias de desenvolvimento pós-embrionário. Uma mesma larva pode dar origem a uma rainha ou a uma operária. Dependendo do tipo e da quantidade recebida pela larva, o alimento exerce seu papel disparando uma resposta endócrina característica, que se manifesta por elevados títulos de hormônio juvenil (HJ) em larvas que se tornarão rainhas (Rachinsky *et al.*, 1990). Até o segundo estágio larval, todas as larvas recebem geléia real como alimento, após este período, as larvas destinadas a se tornarem rainhas continuam recebendo uma dieta composta por este produto da glândula mandibular de

operárias até o final do período de alimentação, o final do estágio larval, enquanto que aquelas destinadas a se tornarem operárias têm sua dieta substituída por uma mistura de secreções glandulares, mel e pólen (Rembold, 1987; Laidlaw, 1992). Além disto, as larvas que se tornarão rainhas recebem 10 vezes mais alimento que as larvas que se tornarão operárias (Jung-Hoffmann, 1966). No final do terceiro estágio larval, os *corpora allata* das larvas de rainhas prospectivas tornam-se bem maiores que aqueles encontrados nas larvas destinadas a serem operárias (Dogra *et al.*, 1977). Estes órgãos são responsáveis pela síntese do hormônio juvenil, que começa a apresentar níveis substancialmente mais altos nas larvas cujo destino é se tornarem rainhas (Rachinsky *et al.*, 1990). O período entre o terceiro e o quarto estágio larval (96 horas após emergência) é crítico na determinação de castas e está caracterizado pela divergência dos programas de diferenciação de rainhas e operárias (Goewie, 1978), marcada pela expressão gênica diferencial (Barchuk *et al.*, 2007).

Conceitualmente, o processo de diferenciação de castas envolve dois tipos de alterações no modelo original de desenvolvimento: (I) alterações que afetam o crescimento geral do corpo ou de órgãos específicos, dando origem a rainhas. Este crescimento pode ser exemplificado pelos ovários, que apresentam de 150 a 180 ovários em rainhas adultas, enquanto que, em operárias adultas é composto por apenas 2 a 12 ovários funcionais, este número pode variar, dependendo da linhagem considerada. (II) alterações no estado de caráter que resultam na presença ou ausência de estruturas específicas, como o aparelho coletor de pólen, a corbícula, presente no terceiro par de pernas das operárias e ausente em rainhas, assim como outras estruturas, como as glândulas de cera, por exemplo, também características de operárias. Os dois tipos de alterações fazem parte das respostas aos níveis de HJ que, altos em rainhas e baixos em operárias, controlam a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento de órgãos específicos e na especificação do plano corporal geral.

Após o período em que o destino larval é decidido, não apenas as características morfológicas passam a diferenciar rainhas de operárias, a fisiologia, o comportamento e os padrões de expressão gênica também serão muito distintos entre as castas (Severson *et al.*, 1989; Corona *et al.*, 1999; Evans & Wheeler, 1999; 2001; Hepperle & Hartfelder, 2000; Guidugli *et al.*, 2004; Corona *et al.*, 2005, Barchuk *et al.*, 2007; Maleszka, 2008). Estes autores, entre outros, tem contribuído para a construção de um modelo que pretende explicar a determinação e desenvolvimento das castas de *A. mellifera*.

1.2 MODELO UNIFICADO DA DETERMINAÇÃO DE CASTAS EM *Apis mellifera*

Barchuk *et al.* (2007) propuseram um modelo para a determinação de castas em *A. mellifera* baseado na análise da expressão gênica diferencial entre rainhas e operárias durante o período crítico do desenvolvimento, entre o terceiro e o quarto instar larval. Estes autores propõem que o estímulo nutricional é captado pelo sistema nervoso estomatogástrico (Boleli *et al.*, 1998), que envia a informação ao cérebro e ao sistema endócrino. Então, ocorre a regulação da atividade dos *corpora allata* (CA) e dos tecidos alvos por moléculas da via insulina/IGF (*insulin-like growth factor*), provavelmente secretadas pelas células neurosecretores do gânglio cerebral larval (Wheeler *et al.*, 2006). O corpo gorduroso recebe a informação através da hemolinfa, o que, em rainhas, resultará na ativação dos sistemas insulina/IGF e TOR (*target of rapamycin*) que são sensíveis à disponibilidade de nutrientes e níveis de energia e controlando assim a divisão celular e crescimento, segundo modelo proposto por Colombani *et al.* (2003) e Oldham & Hafen (2003). Desta maneira, nos *corpora allata*, a ativação da via de TOR pode levar à síntese de HJ, um dos reguladores centrais do desenvolvimento dos insetos, ativando a via de comunicação sistêmica mediada por ALS (o ortólogo de mamíferos da *acid labile subunit*), no corpo gorduroso, que sinaliza para outros tecidos larvais, de maneira dependente de PI3K (*phosphoinositide-3-kinase*), a situação nutricional favorável do organismo (Colombani *et al.*, 2003). Outros órgãos sensíveis a esta sinalização são os ovários, que respondem com proliferação celular ao ambiente nutricional (Drummond-Barbosa & Spradling, 2001).

Em resposta aos altos títulos de HJ as rainhas prospectivas regulam positivamente a expressão de genes fisiometabólicos que, juntamente com os nutrientes provenientes da geléia real, determinam o padrão de crescimento corporal. O alimento oferecido às operárias, por outro lado, afeta a via insulina/IGF de uma maneira menos pronunciada e pode não promover o aumento nos níveis de HJ acima de um limiar específico (Barchuk *et al.*, 2007). Portanto, o desenvolvimento de rainhas e operárias pode estar condicionado por altos e baixos sinais de AmTOR durante o período larval, fato demonstrado por Barchuk e colaboradores (2007) e Patel e colaboradores (2007) que determinaram níveis de mRNA codificador de AmTOR como sendo duas vezes maiores em rainhas que os apresentados por larvas destinadas a serem operárias neste mesmo estágio. A regulação positiva de *tor* em larvas de rainhas pode ser vista como um determinante da taxa de crescimento diferencial podendo

constituir um dos componentes principais dos mecanismos genéticos responsáveis pela determinação de castas em *A. mellifera* (Figura 1).

Maleszka (2008) propôs um modelo que adiciona elementos ao acima descrito, a metilação diferencial do DNA nas castas femininas. Para ele, as alterações fenotípicas fundamentais à organização social em insetos, com certas exceções (Hartfelder *et al.*, 2006), são determinadas pelo ambiente (Wilson, 1971; Hartfelder & Engels, 1998; Evans & Wheeler, 2001). A determinação ambiental então implicaria na existência de um controle epigenético, que foi analisado através do silenciamento de uma enzima responsável pela transferência de um radical metil ao DNA, a Dnmt3 (DNA metiltransferase-3) (Maleszka, 2008). A diminuição dos níveis de transcrição desta enzima induziu o desenvolvimento dos ovários e a redução da metilação das ilhas CpG. Adicionalmente, análises por *microarrays* utilizando as amostras *knockdown* para Dnmt3 mostraram a regulação positiva de genes envolvidos no crescimento e metabolismo (genes fisio-metabólicos). Portanto, de acordo com Maleszka (2008), a diminuição nos níveis desta enzima mimetizou os efeitos da geléia real, sobre os processos envolvidos no desenvolvimento larval que determina o destino das fêmeas de *A. mellifera*. Estes resultados provêm uma evidência experimental de que a metilação do DNA é utilizada para armazenar informação epigenética e controla, nesta abelha, os estados herdáveis de expressão gênica. Desta maneira, o autor conclui que grande parte da determinação comportamental em *A. mellifera* é epigenética e envolve a integração de redes disparadas pelo estímulo nutricional diferencial que determinarão o destino larval (Figura 2).

Recentemente, foi descoberta uma proteína componente da geléia real, responsável pelo desenvolvimento de caracteres específicos de rainhas, adicionando mais um componente ao modelo de determinação de castas. Esta proteína, *royalactin*, possui efeitos semelhantes ao *egf* (*epidermal growth factor*) (Kamakura *et al.*, 2001; Kamakura, 2002) e além disto, foi observado que em abelhas ela é capaz de reduzir o tempo de desenvolvimento e elevar o peso do adulto, o tamanho dos ovários e ainda os títulos de HJ, sugerindo que o efeito da *royalactin* na determinação de castas não é apenas nutricional, mas sim morfogênico, e que esta proteína é o principal fator ativo neste processo desencadeado pela geléia real (Kamakura, 2011) (Figura 3).

Figura 1: Modelo de diferenciação de castas proposto por Barchuk *et al.* (2007). Espessura das setas indica os níveis relativos de ação dos fatores considerados.

Figura 2: Eixo nutrição-cérebro-reprodução no desenvolvimento de abelhas *Apis mellifera*. O alimento larval é reconhecido pelo epitélio intestinal e metabolizado no corpo gorduroso. Sinais são enviados ao cérebro pela via de insulina levando à liberação de Hormônio Juvenil (HJ) pelas células dos *corpora allata*. Os níveis de HJ são altos em larvas prospectivas de rainhas e baixos em larvas que se tornarão operárias. Em contraste, os níveis de metilação do DNA são mais elevados em operárias. Os resultados fenotípicos são manifestados por características anatômicas e fisiológicas contrastantes nas castas. Como as operárias estéreis são as responsáveis pela produção do alimento larval, o processo como um todo forma um ciclo firmemente controlado. (Maleszka, 2008).

Figura 3: Modelo de determinação de castas baseado no que foi proposto por Kamakura (2011), em que a *royalactin* exerceria um papel fundamental no destino larval, favorecendo o desenvolvimento de rainhas agindo de forma semelhante ao *egf* (*epidermal growth factor*) na determinação do tamanho corporal e, além disto, acelera o desenvolvimento de um modo geral, o desenvolvimento dos ovários e o aumento significativo nos títulos de Hormônio Juvenil.

1.3 GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA DETERMINAÇÃO DE OPERÁRIAS EM *Apis mellifera*

A recente descoberta da *royalactin* mostra seu papel na determinação de castas, especialmente seu envolvimento em processos que culminam na diferenciação de rainhas (Kamakura, 2011). Porém, pouco se sabe sobre possíveis genes ou vias de sinalização que direcionam o desenvolvimento de uma larva para que esta se torne uma operária. Expressão gênica diferencial durante o período larval em abelhas tem sido relatada há algum tempo (Severson *et al.*, 1989), mas a identificação de genes envolvidos neste processo é relativamente recente (Evans & Wheeler, 1999; Corona *et al.*, 1999; Hepperle & Hartfelder, 2000; Barchuk *et al.*, 2007). Estes genes estão possivelmente envolvidos em processos característicos do surgimento de castas, entre eles estão os processos metabólicos, nutricionais e de sinalização durante o desenvolvimento (Evans & Wheeler, 2000; Barchuk *et al.*, 2007), apoptose ou desenvolvimento de tecidos reprodutivos e a taxa de desenvolvimento (Evans & Wheeler, 2001).

Através de experimentos de expressão gênica diferencial em larga escala (*microarrays*), foram encontrados 240 genes diferencialmente expressos nas castas de *A. mellifera*. Entre estes genes estão *ultraspiracle* (*usp* - GB16648), *cryptocephal* (*crc* - GB19338) e *RfaBp* (*RfaBp* - *retinoid- and fatty acid-binding protein* ou *lipoforina lp* - GB11059), positivamente regulados em operárias (Barchuk *et*

al.; 2007). A presença nestes genes de sítios de ligação para os receptores nucleares USP e EcR (Christianson *et al.*, 1992; Perera *et al.*, 2005) pode estar envolvida com sua regulação positiva em operárias além de sugerir uma ação conjunta destes genes. Estes resultados indicam a possível atuação de *usp*, *crc* e *RfaBp* na determinação de operárias, desempenhando um importante papel na regulação de mudanças fenotípicas essenciais na diferenciação de castas em abelhas. Além destes, o gene codificador da esterase do hormônio juvenil (*jhe*) foi também sugerido como possível determinante de operárias, com base nos resultados obtidos durante a execução deste trabalho e também na função deste gene na regulação dos níveis de HJ, fundamental para o desenvolvimento e determinação de castas em *A. mellifera*.

1.3.1 *cryptocephal* - *crc*

O gene *crc* codifica uma proteína membro da família CREB/ATF4 de fatores de transcrição bZIP (basic-leucine zipper), que participa de um mecanismo conservado sensor de privação de aminoácidos e indutor de estresse (Jousse *et al.*, 2004) e que age como reguladora do desenvolvimento de pernas (Kojima, 2004). Além disto, está envolvida no mecanismo de emergência da cabeça em insetos, que ocorre normalmente pela contração da musculatura abdominal da pré-pupa que ocasiona a emersão da cabeça prospectiva (Fristrom, 1965).

Em *Drosophila*, *crc* é um gene de cópia única que codifica pelo menos seis mRNAs e três proteínas diferentes (isoformas). Estas isoformas possuem funções distintas, mas que se sobrepõem. Este gene se expressa diferencialmente nos tecidos e órgãos, sendo mais expresso nos discos imaginais e no sistema nervoso central (Hewes *et al.*, 2000). CRC desempenham importante papel na regulação da muda larval em *Drosophila* e sugere-se que ela possa estimular a biossíntese da ecdisona nas células da glândula protorácica e exercer seu papel em tecidos que respondem a este hormônio (Hewes *et al.*, 2000). Além da ecdisona, *crc* parece controlar os níveis de outros hormônios como, por exemplo, o ETH (*ecdysis triggering hormones*) estimulando também sua síntese (Gauthier & Hewes, 2006). Foi observado que *crc* em abelhas é preferencialmente expresso em operárias e que juntamente com *tor* e *creg*, pode constituir um sistema duplo de regulação do crescimento em resposta a alimentação diferencial (Barchuk *et al.*, 2007).

1.3.2 *retinoid- and fatty acid-binding protein* ou *lipoforina* (*RfaBp* ou *lp*)

A Lipoforina (Lp) é uma lipoproteína que, em insetos, é reconhecida principalmente por sua capacidade de transportar lipídios (Van Heusden & Law, 1989) e vários outros ligantes hidrofóbicos, como por exemplo, o HJ (Trowell, 1992; Engelmann & Mala, 2005) e retinóides (Kutty *et al.*, 1996) entre os diversos tecidos, através da hemolinfa. A Lp participa também dos processos reprodutivos dos insetos, principalmente na ovogênese, agindo como molécula transportadora de lipídios entre o corpo gorduroso e os ovários e como proteína do ovo acumulada nos ovócitos (Kawooya & Law, 1988; Telfer *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 1994; Engelmann & Mala, 2005; Colonello-Frattini *et al.*, 2010). Lp é composta por lipídios e duas apolipoproteínas, a apoLp – I (210-250 kDa) e a apoLp – II (70-85 kDa) (Ryan *et al.*, 1984; Venkatesh *et al.*, 1987; Weers *et al.*, 1993; Van Heusden *et al.*, 1998; Sevala *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2004). Em *Drosophila*, a proteína RfaBp possui características relacionadas a lipoforinas, tais como ser composta por subunidades, capacidade de se ligar tanto com retinóides quanto com lipídeos com alta afinidade, conter ácidos graxos endógenos, como algumas proteínas desta família, por exemplo a RfaBG (*retinoid- and fatty acid-binding glycoprotein*). O gene codificador desta proteína tem sua expressão dependente dos níveis de hormônio e é expresso preferencialmente na amnioserosa, corpo gorduroso e apodeme (uma estrutura interna ao exoesqueleto que suporta órgãos internos e provê pontos onde os músculos se inserem) de embriões de *Drosophila*. Assim como a Lp, RfaBp desempenha um importante papel no transporte de lipídeos, incluindo retinóides e ácidos graxos (Kutty *et al.*, 1996). Em operárias de *A. mellifera*, este gene é considerado um marcador da fase alimentadora. Quando este gene é regulado positivamente, a operária continua dentro da colônia desempenhando o papel de cuidado com as crias, ao invés de ir pra campo realizar a atividade forrageira (Whitfield *et al.*, 2006).

1.3.3 *ultraspiracle* (*usp*)

O gene *usp*, pertence à superfamília dos receptores nucleares de hormônios. Receptores nucleares são fatores de transcrição ligante-dependentes responsáveis por controlar diferenciação, crescimento e desenvolvimento em eucariotos mais derivados (Grad *et al.*, 2002; Patrick *et al.*, 2001).

Eles fornecem aos organismos uma maneira de controlar diretamente a expressão gênica em resposta a uma grande variedade de estímulos fisiológicos e ambientais e sinais hormonais (Chawla *et al.*, 2001). *usp* dá origem a uma proteína que pode ser dividida em quatro ou cinco módulos conhecidos como domínios com funções distintas, mas complementares (Mangelsdorf *et al.*, 1995; Henrich *et al.*, 1995; Giguère, 1999; Umesono & Evans, 1989; Grad *et al.*, 2002; Zechel *et al.*, 1994; Perlmann *et al.*, 1993; Billas *et al.*, 2003; Evans, 1988; Green & Chambon, 1988; Beato, 1989).

Os receptores nucleares, para se tornarem ativos, formam complexos homodiméricos e/ou heterodiméricos que reconhecem sequências específicas no DNA que estão dispersas pelo genoma e regulam a expressão de genes adjacentes em combinação com outros fatores de transcrição (Truss & Beato, 1993; Cherbas, 1993). USP de insetos é ortólogo ao receptor de retinóide X (RXR) de vertebrados (Oro *et al.*, 1990). Assim como RXR e outros receptores nucleares, para se tornar um receptor ativo USP se heterodimeriza com o receptor de ecdisona (EcR), formando o complexo USP/EcR, essencial na ligação da ecdisona, que controla o desenvolvimento, reprodução, muda e metamorfose (Yao *et al.*, 1993).

Em *Apis mellifera*, *usp* (*Amusp*) está presente como um gene de cópia única que dá origem a dois transcritos diferentes por *splicing* alternativo (um com aproximadamente 4kb e outro com aproximadamente 5kb). Estes transcritos são considerados isoformas de USP e se expressam diferencialmente no corpo do animal. A sequência da proteína de AmUSP possui a típica organização protéica dos membros da superfamília dos receptores nucleares e, além disso, tem um alto nível de similaridade com USP de outros insetos (Jindra *et al.*, 1997; Kapitskaya *et al.*, 1996; Vöggtli *et al.*, 1999).

usp desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e metamorfose (Sasorith *et al.*, 2002), integrando múltiplos caminhos de sinalização (Hall & Thummel, 1998). Ele era considerado um receptor órfão (Tsai & O'Malley, 1994), mas estudos recentes sugerem sua capacidade ativação da transcrição por meio da união com HJ (Xu *et al.*, 2002; Barchuk *et al.*, 2004). Visto que o desenvolvimento de todos os artrópodes é hormonalmente regulado de uma maneira semelhante por ecdisteróides, hormônios juvenis e seus precursores, estas observações permitem aventar a hipótese de USP ser um receptor de HJ (Iwema *et al.*, 2007).

Através de estudo envolvendo expressão gênica diferencial, foi observado que, entre outros genes, *usp* é diferencialmente expresso entre rainhas e operárias nas fases L3 (instar larval 3) e L4 (instar larval 4) (Barchuk *et al.*, 2007) fases chave na determinação de castas em *A. mellifera*. De acordo com o que foi observado, ele é regulado positivamente em operárias e pode estar regulando outros genes, como *cryptocephal (crc)* e *retinoid- and fatty acid-binding protein (RfaBp)*, também preferencialmente expressos nesta casta (Evans & Wheeler, 1999, 2000; Barchuk *et al.*, 2007).

1.3.4 esterase do hormônio juvenil (*jhe*)

O Hormônio Juvenil (HJ), juntamente com o ecdisteróide, 20-hidroxiecdisona (20E), está entre os principais hormônios que regulam o desenvolvimento de insetos. Ele age modulando a ação de 20E e prevenindo a metamorfose (Riddiford, 1996). Além disso, como mencionado anteriormente, HJ desempenha um papel fundamental na determinação de castas em *A. mellifera*, apresentando níveis elevados em larvas destinadas a se tornarem rainhas (Rachinsky *et al.*, 1990). Durante a metamorfose, e no processo de determinação de castas, os níveis de HJ na hemolinfa são modulados principalmente pelos processos de síntese e degradação (Gilbert *et al.*, 2000), em momentos precisos do desenvolvimento.

A regulação da síntese é considerada de extrema importância e, em insetos, esta via envolve a formação de dois importantes precursores, o mevalonato, e o farnesil difosfato (Bellés *et al.*, 2005). A degradação, outro importante processo modulador dos níveis de HJ, ocorre através de uma intensa atividade hidrolítica que retira o hormônio de circulação (Hinton & Hammock, 2001), em momentos cruciais do desenvolvimento e determinação de castas. A esterase do HJ (JHE) e a epóxido hidrolase do HJ (JHEH) são as principais enzimas de degradação do HJ. A JHE está presente na hemolinfa e nos tecidos, enquanto a JHEH está ligada a tecidos específicos e primariamente associada à fração microssomal (de Kort & Granger, 1996; Mackert *et al.*, 2008).

A esterase do Hormônio Juvenil (JHE) desempenha um papel crucial no metabolismo deste hormônio e tem sido estabelecida há longo tempo como regulador negativo de seus títulos (Sparks *et al.*, 1983; Hammock, 1985). Os altos níveis de HJ durante estágios específicos do desenvolvimento

parecem ativar a expressão de *jhe* no corpo gorduroso, principal órgão de síntese da proteína que é liberada na hemolinfa, onde hidrolisa o HJ (Weirich *et al.*, 1973). Devido à sua alta especificidade por este hormônio, mesmo em pequenas quantidades a JHE é suficiente para hidrolisar o HJ presente na hemolinfa (Ward *et al.*, 1992). À JHE foi atribuída a função de reguladora dos títulos de HJ modulando a taxa de degradação (Hammock, 1985), mas visto que os níveis máximos de *jhe* ocorrem apenas após o declínio dos títulos de HJ, de acordo com o que foi observado para *Manduca sexta* (Baker *et al.*, 1987; de Kort & Granger, 1996) e *A. mellifera* (Mackert *et al.*, 2008), podemos sugerir que a JHE seja importante para eliminar os traços remanescentes de HJ na hemolinfa, processo necessário para preparação para a metamorfose (Baker *et al.*, 1987; De Kort & Granger, 1996).

Como já mencionado anteriormente, além de seu papel crucial na metamorfose, JHE pode também desempenhar um papel fundamental, juntamente com outros genes, na diferenciação das castas em *A. mellifera*, regulando os níveis de HJ. Este gene, juntamente com aqueles descritos anteriormente, *RfaBp*, *usp* e *crc*, pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento diferencial das castas em *A. mellifera*. Eles parecem atuar na regulação de mudanças fenotípicas no desenvolvimento destas abelhas influenciando vias de sinalização disparadas anteriormente pela alimentação diferencial. Portanto, informações sobre o mecanismo de ação destes genes, sobretudo nestas vias sinalizadoras nas quais possivelmente atuam, seria vantajoso na compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pelo surgimento de diferentes fenótipos a partir de um mesmo genótipo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Determinar fatores moleculares potencialmente envolvidos no processo de determinação castas em *Apis mellifera*, com ênfase naqueles que participam da via responsável pela diferenciação de operárias;
- Analisar a participação de genes específicos neste processo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar expressão gênica diferencial em rainhas e operárias durante a determinação de castas através de *microarrays*;
- Descrever e analisar o perfil de expressão dos genes *crc*, *RfaBp*, *usp* e *jhe* de *Apis mellifera* durante o desenvolvimento das castas femininas de *A. mellifera*;
- Analisar o papel de cada um destes genes no processo de desenvolvimento e determinação de castas através de silenciamento gênico;
- Avaliar a influência do *knockdown* sobre a expressão dos outros genes relacionados;
- Buscar moléculas reguladoras de *jhe* (microRNAs) que possam explicar a expressão diferencial da *jhe* nas castas fêmeas de *Apis mellifera*;
- Análise do perfil de expressão dos miRNAs sugeridos como reguladores de *jhe* em rainhas e operárias;
- Validação dos miRNAs em amostras *knockdown* para *jhe*;
- Avaliação da expressão diferencial por sequenciamento em larga escala dos miRNAs de amostras *knockdown* para o gene *jhe* e amostras controle;
- Análise funcional dos miRNAs diferencialmente expressos de acordo com o sequenciamento em larga escala.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 4: Organização do desenvolvimento da metodologia utilizada na realização deste trabalho, contendo as principais técnicas utilizadas na tentativa de se alcançar os objetivos propostos.

3.1 ANÁLISE *IN SILICO*

Uma versão disponível do genoma de *A. mellifera* (versão 4.0 - <http://zulu.fmrp.usp.br/beelab/>), bastante completa e com sequências codificadoras preditas (*Official Set* - <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>) facilitou a anotação dos genes de interesse. Como *crc*, *RfaBp* ainda não foram descritos em abelhas, os GBs destes genes e o grupo ao qual pertencem foram obtidos com base na sequência preditas destes genes e com o auxílio de suas ESTs (*Expressed Sequence Tag*) de *Drosophila* (*RfaBp* - <http://flybase.bio.indiana.edu/cgi-bin/getseq.html?source=dmel&id=FBgn0087002&chr=4&dump=PrecompiledFasta&targetset=gene> e *crc* - <http://flybase.bio.indiana.edu/cgi-bin/getseq.html?source=dmel&id=FBgn0000370&chr=2L&dump=PrecompiledFasta&targetset=gene>)

Para os genes *usp* e *jhe*, cujas sequências encontram-se disponíveis no GenBank, os seus GBs grupos foram obtidos utilizando estas sequências (*usp* - número de acesso no GenBank NP_001011634; *jhe* - número de acesso no GenBank NP_001011563.1). Tais informações relativas a cada um destes genes eram obtidas utilizando a ferramenta BLAST (http://zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab/bioinfo_blast), e as sequências relativas aos GBs e grupos encontrados eram obtidas por outra ferramenta disponível neste site (http://zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab/bioinfo_extraiseq). A partir destas sequências, a proteína correspondente era mapeada no genoma, novamente através de um BLAST e a partir destas informações a anotação era feita utilizando o programa *Artemis* (Sanger Institute <http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>), que nos permitia visualizar a conformação em íntrons e éxons do gene, bem como o número de nucleotídeos que compunha cada um (Anexo 1).

3.2 DESENHO DE *PRIMERS*

Foram desenhados *primers* específicos para cada gene estudado e também de acordo com o experimento em que foi utilizado. O design destes *primers* foi feito utilizando as sequências anotadas destes genes, levando em consideração os diferentes éxons, isto é, sempre que possível um par de *primers* era desenhado utilizando dois ou mais éxons diferentes para que, como era utilizado apenas cDNA nos experimentos, uma possível contaminação com DNA genômico pudesse ser descartada. O programa Primer3 (v 0.4.0 - <http://frodo.wi.mit.edu/primer3>), disponível *online*, foi utilizado no design de todos os *primers* utilizados neste trabalho e suas sequências encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: *Primers* utilizados nos diversos experimentos realizados neste trabalho. A região sublinhada nos primers utilizados para síntese de dsRNA corresponde à cauda T7. Para os *primers* utilizados para quantificação relativa dos níveis de expressão dos microRNAs (miRNAs), encontramos somente o *primer forward* (F), pois como *primer* reverso (R) é utilizado um *primer* universal fornecido pelo kit utilizado neste experimento.

NOME DO PRIMER	UTILIZAÇÃO	SEQUÊNCIA
crc 5' -F	Sequenciamento	5' TCCAATCAGGACCAGGACAG 3'
crc 5' - R		5' AGATCATCCTACTCGTGCACAA 3'
crc 3' - F		5' CCACTCTTACACCCCTCAA 3'
crc 3' - R		5' AATGAAGTACGCGTATGGCA 3'
crc final - F		5' TGGTATGGTAGTTCCAGAGGAAA 3'
crc final - R		5' GACCCTTAGCTTTAAATAAATCTCTCA 3'
RfaBp 2 - F		5' ATAGCCAACCAACCAACAGC 3'
RfaBp 2 - R		5' AGCTGCTTCTTTGGGATGAA 3'
crc -F	PCR – Real Time	5' GGAGATGTGGAAGCTTGTC A 3'
crc - R		5' ATGGTTGTACTGGTTGTAAAGT-3'
RfaBP - F		5' TGCAAAGGCTGACGCTCAC-3'
RfaBP - R		5' TGCCATCGCTGGTGACAGT 3'
USP – RT2 – F		5' CGATATTCGACCGTGTCCCTC 3'
USP – RT2 – R		5' AGCAGGGTCACTTCCTGGAT 3'
jhe-RT –F		5' CGTTACCTCCAGTTGGGAAA 3'
jhe-RT –R		5' CAATCTTCGGCACCTTCAAT 3'
EcR-A -F		5' CCAACAGCAACAACGGCTAC 3'
EcR-B - F		5' ACAGTGTGCCAACGGTCAC 3'
MFE - F		5' GGAATCATTCTTGCGGAGA 3'
MFE - R		5' GTTATGCGCGCTATGGAAAT 3'
EcR-A/B - R		5' - AAAGAGCCAGGCTGCGACAA - 3'
RP-49 - F	PCR – Real Time	5' CGTCATATGTTGCCAACTGGT - 3'
RP-49 - R		5' TTGAGCACGTTCAACAATGG - 3'
eIFS-8 -F		5' TGAGTGTCTGCTATGGATTGCAA 3'
eIFS-8 - R		5' TCGCGGCTCGTGGTAAA 3'
ame-miR-1-F		5' TGGAATGTAAAGAAGTATGGAG 3'

NOME DO PRIMER	UTILIZAÇÃO	SEQUÊNCIA
ame-miR-8-F		5' TAATACTGTCAGGTAAAGATGTC 3'
ame-miR-12-F		5' TGAGTATTACATCAGGTACTGGT 3'
ame-miR-34-F		5' TGGCAGTGTTGTTAGCTGGTTG 3'
ame-miR-278-F		5' TCGGTGGGACTTTCGTCCGTTT 3'
ame-miR-989-F		5' CGTGATGTGACGTAGTGGTTCT 3'
ame-let-7-F		5' TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT 3'
ame-miR-263b-F		5'CTTGGCACTGGAAGAATTAC 3
ame-miR-2796-F		5'GTAGGCCGGCGGAAACTACTTGC 3'
U6 - F		5'CAGGGGGCCATGCTAATCTTCT 3'
dscrc-F	Síntese de dsRNA	5' TAATACGACTCACTATAGGGCGAAGATCATCCTACTCGTGCACAA 3'
dscrc-R		5' TAATACGACTCACTATAGGGCGATTGAGGGGGTGTAAGAGTGG 3'
dsRfaBp-F		5' TAATACGACTCACTATAGGGCGACACCGTTGATCCCAGAAATC 3'
dsRfaBp-R		5' TAATACGACTCACTATAGGGCGAACACCGCTTGTTCAGAATG 3'
dsusp-F		5' TAATACGACTCACTATAGGGCGAGCGAAGAGAAATCCTGCATC 3'
dsusp-R		5' TAATACGACTCACTATAGGGCGAGCCCTGAGCAGAAGTACCTG 3'
dsJhe-F		5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGATAATCCATT</u> CACACCGTTTCG 3'
dsJhe-R		5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGATTGCATTCTAGCTGCTTTTCA</u> 3'
dsGFP-F		5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGA</u> AGTGAGAGGGTGAAGGTGA 3'
dsGFP-R		5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGAGGT</u> AAAAAGGACAGGGCCATC 3'

3.3 SEQUENCIAMENTO

3.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Operárias de *Apis mellifera* na fase pupal, foram coletados no Apiário do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.3.2 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

As extrações de RNA total foram feitas pelo método de TRIzol[®] Reagent (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento de RNA total, Cat. No. 15596-018, Invitrogen)

utilizando indivíduos inteiros e seguindo-se o protocolo disponibilizado pelo fabricante. Após a extração, o RNA total foi quantificado por espectrofotometria e tratado com DNase. Posteriormente, o RNA total (2,0 µg) foi utilizado para transcrição reversa (RT) usando-se SuperScript® II Reverse Transcriptase (Cat. No. 18064-022, Invitrogen) e Oligo dT₁₂₋₁₈ (Cat. 18418-012, Invitrogen) como *primer*. Para utilização em reações de amplificação, o cDNA produzido foi diluído 1:10 em água estéril.

3.3.3 AMPLIFICAÇÃO POR PCR

As amplificações de fragmentos dos genes *crc* e *RfaBp* de *A. mellifera* foram feitas misturando-se 2,0 µl de *primer forward* (específico para cada gene – Tabela 1) na concentração de 10 µM; 2,0 µl de *primer reverse* (específico para cada gene – Tabela 1) na concentração de 10 µM; 2,5 µl de cDNA diluído 1:10; 18,5 µl água Mili-Q estéril; 25 µl de MaterMix (2,5X) (Promega - cat. M7502). Para as amplificações foi utilizado o termociclador GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, assim programado: uma fase de desnaturação a 94°C por 2 minutos; em seguida 35-40 ciclos a 94°C (desnaturação) por 30 segundos; XX°C (*) por 30 segundos (fase de anelamento dos *primers*); e 72°C por 40 segundos (fase de extensão das novas fitas de DNA); e terminavam com 10 minutos a 72°C para finalizar as extensões. Os produtos da amplificação foram analisados em géis de agarose 1% e recuperados utilizando QIAquick® Gel Extraction Kit (250) (Cat. 28706, Lot. 127150235 - QIAGEN).

(*) Esta temperatura varia de acordo com o *primer* utilizado, mas geralmente se aproxima dos 60°C.

3.3.4 LIGAÇÃO DO FRAGMENTO AO VETOR DE CLONAGEM

O produto da PCR referente ao gene de interesse foi inserido no vetor plasmidial utilizando-se o Kit pGEM® - T Easy Vector System I (Promega - Cat. A1360, Lot. 206971). A reação de ligação foi feita com 3,0 µl do produto da PCR adicionado de 5,0 µl de 2X Rapid Ligation Buffer (tampão de ligação), 1,0 µl de pGEM® - T Easy Vector (50 ng/µl) e 1,0 µl de T4 DNA ligase, seguida de incubação desta mistura à 4°C, *overnight*.

3.3.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA E MINI-PREPARAÇÕES

Para a transformação bacteriana foram utilizados 5,0 µl de solução plasmidial de cada gene, obtidos como no item anterior, contendo o fragmento de DNA clonado. A solução plasmidial foi adicionada às células competentes (Subcloning EfficiencyTM DH5αTM chemically Competent *E. coli* - Invitrogen cat.18265-017) e incubada em gelo por 30 minutos. Posteriormente, a suspensão foi submetida a choque térmico a 42°C por 30 segundos, seguido de resfriamento em gelo por 90 segundos, após os quais foram adicionados 250 µl de meio de cultivo líquido (LB). Esta solução foi incubada a 37°C, sob agitação de 160 rpm por 1 hora, e posteriormente utilizada para semear uma placa de Petri com meio sólido contendo X-Gal, IPTG e ampicilina. Após o período de incubação de 16 horas a 37°C em estufa, as colônias que continham o inserto de interesse foram cultivadas em tubos plásticos estéreis contendo 5,0 ml de LB com antibiótico (Ampicilina) a 37°C, sob agitação de 160 rpm, por aproximadamente 16 horas. As células bacterianas resultantes foram submetidas à mini-preparações, para extração do DNA plasmidial, utilizando o IllustraTM plasmidPrep Mini Spin Kit (Cat. 28-9042-70, Lot. 359092) seguindo-se as orientações do fabricante.

3.3.6 DIGESTÃO DO DNA PLASMIDIAL

Os produtos das mini-preparações foram digeridos com EcoR-I para verificar se o inserto estava presente na amostra. Para digestão utilizou-se 3,0 µl de DNA plasmidial; 2,0 µl de solução tampão para EcoR I (*Buffer* 3); 14,5 µl de água destilada estéril; 0,5 µl de EcoR I, os quais foram misturados e incubados durante 60-90 minutos a 37°C. Posteriormente, os produtos de digestão foram separados em géis de agarose 1%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

3.3.7 SEQUENCIAMENTO GÊNICO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

O sequenciamento parcial de *crc* e *RfaBp* foi feito pelo método Sanger *et al.* (1977) com DNA fíla dupla marcado com fluorescência usando-se o kit BigDye Terminator v3 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems). Para marcação do DNA foi feita reação de PCR e para sequenciamento foi usado o aparelho ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As duas fitas

(*forward* e *reverse*) foram sequenciadas usando-se os *primers* universais M13-F (5'– CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT –3') e M13-R (5'– CAG GAA ACA GCT ATG AC –3').

As sequências de nucleotídeos obtidas foram submetidas ao programa Sequencher 4.7 – DNA Sequencig Software, para obtenção de um *contig* com os fragmentos resultantes. A sequência dos *contigs* (*forward* e *reverse*) foi traduzida em aminoácidos (<http://www.justbio.com> e <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) e analisada usando o programa BLAST, do banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para obtenção da sequência genômica, correspondente ao fragmento amplificado, foram feitas análises comparativas consultando o banco de dados do genoma de *A. mellifera* (<http://zulu.fmrp.usp.br/beelab>). Com a sequência completa correspondente foram feitos alinhamentos com a sequência predita dos genes e com as sequências destes genes de outras espécies, utilizando o programa ClustalW (<http://align.genome.jp/>) (Para resultados veja Anexo 2).

3.4 PARA OS ESTUDOS DE EXPRESSÃO DOS GENES

3.4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para a análise dos perfis de expressão dos genes de interesse, foram utilizadas rainhas e operárias nas fases de desenvolvimento embrionário, pós-embrionário e indivíduos adultos recém emergidos. As fases estudadas e sua descrição encontram-se na tabela 2. As abelhas, independente da fase, foram coletadas no Apiário do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, sendo que as operárias foram obtidas através de postura controlada de 6-8 horas eram coletadas diretamente dos favos, e as rainhas, pela grande quantidade a ser utilizada, foram artificialmente produzidas. As fases de desenvolvimento foram identificadas de acordo com Michelette & Soares(1993) e Rembold *et al.* (1980).

Tabela 2: Características do desenvolvimento larval e pupal de rainhas e operárias de *Apis mellifera* africanizadas, incluindo o número de horas correspondente a cada uma das fases de desenvolvimento, contadas após a eclosão da larva. L1: 1º estágio larval; L2: 2º estágio larval; L3: 3º estágio larval; L4: 4º estágio larval; L5F: 5º estágio larval, fase de alimentação (*feeding*) 1 (F1), 2(F2) e 3 (F3); L5S: 5º estágio larval, fase de tecelagem do casulo 1 (S1), 2 (S2) e 3 (S3); PP: pré-pupa. Adaptado de Rembold *et al.* (1980), Michelette & Soares (1993), Barchuk *et al.* (2004) e Nunes-Silva *et al.* (2006).

Fases do Desenvolvimento	Característica para reconhecimento da fase		Horas após eclosão	
	Rainha	Operária	Rainha	Operária
OVO	Fase embrionária			
L1	peso – 0,0001 a 0,0003 g		0-20	
L2	peso – 0,0003 a 0,001 g		20-35	
L3	peso – 0,0015 a 0,004 g		35-55	
L4	0,0045-0,03g	peso – 0,004 a 0,0248 g	55-85	
(L5)F1	0,026-0,063g	peso – 0,029 a 0,06 g	85-120	
(L5)F2	0,063-0,15g	peso – 0,06 a 0,11 g		
(L5)F3	> 0,15g	peso – 0,11 a 0,16 g		
(L5)S1	intestino – totalmente cheio		120-155	120-165
(L5)S2	intestino – parcialmente cheio			
(L5)S3	intestino – totalmente vazio			
PP1	pouco movimento, cabeça para cima e comprimento tibia-tarso= 1,4 a 1,99 mm, ainda bem transparente permitindo a visualização do intestino		155-190	165-220
PP2	imóvel, cabeça para cima e comprimento tibia-tarso =2,0 a 2,6 mm			
PP3	imóvel, cabeça para cima e comprimento tibia-tarso> 2,6 mm. A larva é opaca			
Pw	pupa de olho branco (<i>white</i>)		190-210	220-260
Pp	pupa de olho rosa (<i>pink</i>)		210-245	260-300
Pdp	pupa de olho rosa-escuro (<i>dark-pink</i>)			
Pb	pupa de olho marrom (<i>brown</i>)		245-270	300-335
Pbl	pupa de olho marrom, com pigmentação cuticular leve (<i>light</i>)		270-285	335-360
Pbm	pupa de olho marrom , com pigmentação cuticular média (<i>medium</i>)		285-300	360-385
Pbd	pupa de olho marrom, com pigmentação cuticular intensa (<i>dark</i>)		300-305	385-400
RN	adultos recém-nascidos ou recém-emergidos		305	400

3.4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA (qPCR) OU PCR REAL-TIME

Indivíduos inteiros nas fases acima citadas foram utilizados para extração de RNA e posterior síntese de cDNA como descrito no item 3.3.2. Para cada amostra utilizada para análise quantitativa por

PCR em tempo real (Real-Time PCR) foram utilizadas três amostras de cDNA (tréplicas biológicas) e para cada uma delas foram feitas tréplicas experimentais, usando-se para detecção da amplificação SYBR® Green I Dye (Applied Biosystems) e ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System (SDS) (Applied Biosystems). As amostras foram preparadas utilizando-se 10 µl do SYBR Green PCR Master Mix; 0,8 µl de *primer forward* 10 µM (Tabela 1); 0,8 µl de *primer reverse* 10 µM (Tabela 1); 1,0 µl de cDNA diluído 1:10 e 7,4 µl de água estéril. A quantificação dos transcritos de cada um dos genes de interesse foi calculada a partir da diferença dos valores de Ct (threshold PCR cycle) em relação aos transcritos do gene calibrador, *rp-49* (*ribosomal protein-49*; Lourenço *et al.*, 2008), de acordo com instruções do User Bulletin #2 (Applied Biosystem) sendo que estes valores foram utilizados para a quantificação relativa da expressão. Os resultados destas quantificações foram utilizados para comparação estatística entre as os perfis de expressão nas castas.

3.4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises da expressão diferencial em operárias e rainhas e em amostras tratadas com dsRNA e controle, os dados obtidos por Real-Time PCR foram analisados estatisticamente por meio do programa BioEstat (versão 4.0), utilizando o Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$).

3.5 PARA OS MICROARRAYS

3.5.1 MATERIAL BIOLÓGICO E PROTOCOLO DOS EXPERIMENTOS

Larvas de rainhas e operárias de *A. mellifera* em 4º instar (L4), proveniente do apiário do Laboratório de Ecologia Química da Universidade da Pensilvânia nos Estados Unidos (Chemical Ecology Lab, The Pennsylvania State University, State College – PA, USA) foram utilizadas nos experimentos de expressão gênica em larga escala, *microarrays*. Esta fase foi escolhida, pois marca o início diferenciação das trajetórias de desenvolvimento seguidas por rainhas e operárias (Goewie, 1978). Rainhas e operárias foram obtidas e identificadas quanto à fase de desenvolvimento como descrito no item 3.4.1. Para cada uma das castas foram feitas oito amostras, sendo cada uma composta

por um *pool* contendo 5 larvas, que foram hibridadas em 8 lâminas com dois corantes (*design dye-swap*) (Tabela 3) - sendo 4 hibridadas com uma reação contendo uma amostra de rainha marcada com Cy3 e uma de operária marcada com Cy5, e as outras 4 eram o contrário, as rainhas eram marcadas com Cy5 e as operárias com Cy3. Este tipo de delineamento de *microarrays* torna todas as amostras comparáveis.

Amostras biológicas referentes operárias nas fases de PP (pré-pupa) e Pbl (pupa de olho marrom com leve pigmentação no corpo) injetadas com um fragmento de RNA de *gfp* em fita dupla (gene utilizado como controle em experimentos de RNAi) e controles (sem injeção) foram analisadas por *microarrays*. Para cada uma das duas fases de estudo foram feitas 8 amostras de pré-pupas (4 controles e 4 tratadas com dsGFP) e 8 amostras de pupas de olho marrom (Pbl) (4 controles e 4 tratadas com dsGFP), sendo que cada amostra continha apenas um indivíduo. Com estas amostras foram feitos 16 *microarrays* em design de loop (Figura 5). Este tipo de delineamento de *microarrays* é utilizado para que todas as amostras possam ser comparadas entre si (Para Resultados ver Anexo 3).

As lâminas de *microarrays* utilizadas (BeeOligo121106; http://www.biotech.uiuc.edu/centers/Keck/Functional_genomics/Honey%20Bee%20Oligo.htm) foram desenhadas pelo Dr. Gene E. Robinson (Universidade de Illinois, Urbana, EUA). Tais lâminas contêm 28.800 sequências de oligos de 60-69 nucleotídeos. Os *spots* presentes nas lâminas são referentes a praticamente todos os genes anotados na versão 4.0 do genoma de *A. mellifera* (sintetizados pela Invitrogen - <http://www.ebi.ac.uk/aerep/result?queryFor=PhysicalArrayDesign&aAccession=A-MEXP-755>).

3.5.2 SÍNTESE DE cDNA A PARTIR DO RNA NÃO-AMPLIFICADO

Das amostras biológicas foi extraído o RNA como descrito no item 3.3.2, seguido de purificação com os kits RNeasy Mini Kit (50) (QIAGEN - cat. 74104) e RNase-Free DNase Set (50) (QIAGEN - cat. 79254). A síntese de cDNA foi feita utilizando o kit MessageAmp™ II aRNA (AmbionR . cat.AM1751). Para isto foi adicionado X µl de RNA (X= volume contendo 750 ng, mas que não ultrapasse 5,0 µl) a Y µl de água livre de nuclease (Y = volume para completar 5,0 µl) e a 1,0 µl de DT-T7. Esta mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos e, em seguida, colocada no gelo. Foram adicionados mais 1,0 µl de 10X 1st strand buffer; 2,0 µl dNTP 10mM; 0,5 µl RNase Inhibitor; 0,5 µl

MessageAmp/Arraysript RT; incubou-se a 42°C por 2 horas. Após a incubação foram acrescentados: 32 µl de H₂O; 5,0 µl de 10X 2nd strand buffer; 2,0 µl dNTP 10 mM; 1,0 µl de DNA polimerase e 0,5µl de RNaseH, esta mistura foi incubada a 16°C por 2 horas. Após incubação, adicionou-se 250 µl de cDNA *Binding Buffer* seguido de purificação em coluna que foi posteriormente lavada com 500 µl de *Wash buffer*. O aRNA purificado foi eluído em 20 µl de água pré-aquecida a 55°C e submetido a secagem no SpeedVac (Thermo Savant SC110A Speed Vac Plus) até um volume final de 8,0 µl.

3.5.3 AMPLIFICAÇÃO DO RNA COM T7

Para amplificação do aRNA, obtido como descrito no passo anterior, foi utilizado o kit MEGAclean™ (AmbionR - cat.AM1908). Aos 8,0 µl de RNA obtidos como descrito no item anterior foram adicionados 8,0 µl de dNTPs (dATP, dGTP, dUTP, dCTP – 2,0 µl de cada), 2,0 µl de 10X T7 buffer, 2,0 µl da mistura de enzimas (*enzyme mix*), posteriormente a reação foi incubada a 37°C por 5 horas. Em seguida, foram acrescentados 80 µl de H₂O; 350 µl de aRNA *binding buffer* e 250 µl de etanol 100%. Este conteúdo foi purificado em coluna e submetido a lavagens com 600 µl de *Wash buffer* seguida de 650 µl de etanol 80%. O aRNA presente na membrana da coluna foi eluído em 100 µl de água estéril pré-aquecida a 55°C e sua concentração foi determinada no NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

3.5.4 MARCAÇÃO POR ULS™ (UNIVERSAL LINKAGE SYSTEM), PURIFICAÇÃO E FRAGMENTAÇÃO DO aRNA

A marcação das amostras foi feita utilizando-se o kit ULS™ aRNA Labeling (com Cy3 e Cy5 - Kretech - cat.EA-006). A partir deste ponto, todos os procedimentos foram realizados em ambiente com pouca iluminação para evitar degradação dos fluoróforos cianina 3 (Cy3 - *cyanine*) e cianina 5 (Cy5 - *cyanine*). Para cada reação foram adicionados: 4,0 µg de aRNA (com um volume máximo de 32 µl); 4,0 µl de Cy3- ou Cy5-ULS; 4,0 µl de 10x *labeling solution* (solução de marcação) e água livre de nuclease suficiente para completar 40 µl, que foram incubados a 85°C por 30 minutos, após o período de incubação, a concentração de cada uma das soluções foi determinada utilizando-se o aparelho Nanodrop. Em seguida, os aRNAs marcados foram misturados dois a dois: um marcado com Cy3 correspondente a uma das castas e outro marcado com Cy5 correspondente a outra casta (rainhas

versus operarias em L4). Esta mistura de aRNAs marcados foi purificada utilizando-se as colunas KREApure do kit KREApure *purification columns* (Kreatech - cat. KP-050) em seguida foram concentradas no SpeedVac para um volume final de 9,0 µl. Utilizando-se o kit RNA *Fragmentation Reagents* (AmbionR - cat. AM8740) os 9,0 µl de aRNA marcado foi fragmentado acrescentando-se 1,0 µl de 10X *fragmentation buffer* e incubando-se a 70°C por 15 minutos e acrescentando posteriormente 1,0 µl de Solução *Stop* (*Stop Solution*).

3.5.5 PREPARAÇÃO, PRÉ-HIBRIDAÇÃO E HIBRIDAÇÃO DAS LÂMINAS DE MICROARRAYS

Primeiramente as lâminas de *microarrays* foram limpas com ar comprimido para eliminar qualquer tipo de poeira existente. Posteriormente, vapor d'água era utilizado para umedecer as lâminas levemente que em seguida eram secas sobre o termobloco pré-aquecido. As lâminas secas foram tratadas com luz UV (ultravioleta) durante 5 minutos. Antes da pré-hibridação, as lâminas foram submersas em uma cuba contendo SDS 0,2%, pré-aquecido a 55°C, e imediatamente submetidas a vigorosa agitação manual por 2 minutos, para prevenir ou minimizar a formação de "cometas". Em seguida as lâminas foram lavadas em água Mili-Q, em dois banhos de 30 segundos sob agitação manual e um terceiro banho de 15 segundos e secas por centrifugação (500 rpm por 3 minutos). Estas lâminas foram incubadas em solução de pré-hibridação* a 42°C por 90 minutos, em seguida lavadas em três banhos rápidos com água Mili-Q e secas por centrifugação (500 rpm por 3 minutos).

O tampão de hibridação¹ foi utilizado na preparação da solução de hibridação² que foi incubada a 80°C por 10 minutos, após os quais era despejada na lâmina de *microarrays*, já coberta por uma lamínula própria que continha um orifício por onde a solução era despejada. Em seguida, as lâminas foram submetidas à incubação no MAUI Mixer A4 Hybridization Chambers (Cat N°. 02-A008-25 BioMicro Systems, Inc.) por 15-17 horas, sob temperatura (42°C) e umidade controladas.

* Solução de Pré-Hibridação: 12,5 ml de 20X SSC + 0,5 ml de SDS 10% + 0,5 g de I-Block (Applied Biosystems. cat. T2015) + 37 ml de água livre de nuclease.

¹ Tampão de hibridação: 5,0 ml de formamida (Promega . cat. H5051) + 5,0 ml de SSC 20X (Promega – cat. V4261) + 200 µl de SDS 10% (Promega . cat.V6551).

² Solução de Hibridação: 27,5 µl de formamide hyb buffer 2X + 11 µl da solução dos aRNA marcados (um com Cy3 e o outro com Cy5) + 13,75 µl de KREAblock (ULS. aRNA Labeling Kit -with Cy3 and Cy5)+ 2,75 µl de água livre de nuclease.

3.5.6 LAVAGENS PÓS-HIBRIDAÇÃO

Após 15-17 horas de incubação as lamínulas foram removidas das lâminas de *microarrays* por imersão em solução de lavagem 1 (100 ml de SSC 20X + 20 ml de SDS 10% + 880 ml de água Mili-Q) a 42°C e descolamento manual. As lâminas foram submetidas a lavagens sequenciais na solução 1 (a 42°C), solução 2 (100 ml de SSC 20X + 900 ml de água Mili-Q) e na solução 3 (10 ml de SSC 20X + 990 ml de água Mili-Q) na ausência de iluminação, sob agitação por 10 minutos cada uma e secas por centrifugação (500 rpm por 3 minutos). Os resultados foram lidos pelo GenePix 4000B - Microarray Scanner.

3.5.7 ANÁLISES DOS RESULTADOS DOS *MICROARRAYS*

Os arquivos de imagem gerados foram analisados inicialmente pelo programa do próprio equipamento, GenePix 4000B, para o cálculo das medianas (F635 *Median* - B635 e F532 *Median* -B532), que correspondem aos valores de expressão encontrados para cada *spot*. Estes valores eram organizados em uma planilha em formato para análise pelo programa JMP (<http://www.jmp.com/uk/software/genomics/index.shtml>). Todos os *spots* com valores menores que a mediana calculada para as amostras sem oligos (chamadas de brancos), que são designadas como ruído de fundo da preparação foram removidos da análise. Transcritos (*spots*) com menos de 6 medidas, entre as 8 possíveis também foram removidos da análise. Os dados que passaram por esse critério foram transformados em valores logarítmicos e analisados utilizando ANOVA modelo-misto como abordagem implementada no software SAS (SASR 9.2 Software - <http://www.sas.com/software/sas9/>) (Wolfinger *et al.* 2001, Ayroles & Gibson, 2006; Kocher *et al.*, 2008). Os valores de P (P-values) foram corrigidos utilizando-se múltiplos testes para o ajuste por taxa de descoberta de falsos positivos (FDR - *false discovery rate*). O valor limite de FDR utilizado foi de 0.01 (FDR01), supondo que apenas 1% dos transcritos significativos deve ser constituído por falsos positivos.

3.5.8 ANÁLISE DOS GENES COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL ENTRE AS CASTAS

Ao final das análises descritas acima e usando FDR01 obtivemos uma lista de genes diferencialmente expressos que foi utilizada para as análises de Gene Ontology (GO). Estas análises foram

feitas utilizando a ferramenta de anotação gênica funcional DAVID (Dennis *et al.*, 2003 - <http://david.abcc.ncifcrf.gov/gene2gene.jsp>). Esta análise resultou em uma lista de genes diferencialmente expressos e dentre estes foram escolhidos os “*top ten*” preferencialmente expressos em operárias de acordo com os valores ESTIMATE (que compara os níveis de expressão de uma casta *versus* a outra).

Tabela 3: Desenho experimental de *microarrays* para comparação de rainhas e operárias em fase L4 em relação à expressão gênica diferencial. **Array:** número de arrays feitos; **Cy3:** amostras marcadas com cianina 3; **Cy5:** amostras marcadas com cianina 5; W:operárias; Q: rainhas. No array 1 a amostra W2, marcada com Cy3 (W2) foi hibridada juntamente com a amostra marcada com Cy5 (Q2) e assim por diante até o array 8.

Array	Cy3	Cy5
1	W2	Q2
2	W3	Q5
3	W4	Q7
4	W5	Q8
5	Q9	W6
6	Q10	W7
7	Q11	W8
8	Q1	W1

Figura 5: Diagrama do experimento de *microarray* para a análise dos efeitos de dsGFP usado como controle nos experimentos de silenciamento gênico em *A. mellifera*. **Setas vermelhas:** amostras marcadas com cianina 5 (Cy5); **Setas verdes:** amostras marcadas com cianina 3 (Cy3); **C1-C4:** amostra controle que não receberam RNA dupla-fita 1-4; **G1-4:** amostras que receberam RNA dupla-fita para o gene *gfp*; **PP:** amostras coletadas na fase de desenvolvimento pré-pupa; **P:** amostras coletadas na fase de desenvolvimento Pbl (pupa de olho marrom, com leve pigmentação corporal).

3.6 PARA OS ESTUDOS DE SILENCIAMENTO UTILIZANDO INTERFERÊNCIA POR RNA (RNAi)

3.6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para o silenciamento utilizando o método de interferência por RNA (RNAi) foram utilizadas pupas para a síntese do RNA de fita dupla (dsRNA) para os genes alvos. A síntese do dsRNA para o gene utilizado como controle, *gfp*, foi feita a partir de clones que continham uma sequência deste gene, gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman. Para o tratamento com o dsRNA, independente do gene alvo ou controle, eram utilizadas larvas em 2º estágio (L2) obtidas e identificadas de acordo com o descrito no item 3.4.1. As abelhas utilizadas nesta etapa foram obtidas do Apiário do Laboratório de Ecologia Química da Universidade da Pensilvânia nos Estados Unidos (Chemical Ecology Lab, The Pennsylvania State University, State College – PA, USA) no caso dos experimentos realizados com o gene *usp* e do Apiário do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para os experimentos feitos com os demais genes.

3.6.2 PRIMERS

Foram desenhados *primers* específicos para cada gene a ser silenciado, *crc*, *usp*, *RfaBp* e *jhe* (Tabela 1) e para o gene utilizado como controle, o *gfp*, de acordo com o que foi descrito no item 3.2. Dois tipos de *primers* eram desenhados para cada gene, um deles utilizado na síntese de dsRNA e o outro destinado a análise da eficiência do silenciamento por PCR quantitativa (qPCR) ou Real-Time. À sequência *primers* utilizados na síntese de dsRNA era adicionada a cauda T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGA - 3') necessária para o sucesso na utilização no kit de síntese. Os demais *primers* eram comuns e desenhados em uma região diferente dos anteriores, para assegurar que não amplificariam os fragmentos utilizados no tratamento de interferência por RNA.

3.6.3 AMPLIFICAÇÃO POR PCR

Anterior à síntese de dsRNA propriamente dita, foram feitas PCRs com volume total de 50 µl misturando-se 2,0 µl de *primer forward* (específico para cada gene– Tabela 1) na concentração de 10 µM; 2,0 µl de *primer reverse* (específico para cada gene - Tabela 1) na concentração de 10 µM; 2,5µl de cDNA; 18,5µl água Mili-Q estéril; 25 µl de MaterMix (2,5X) (Promega - cat. M7502). As amplificações, análise e recuperação dos produtos amplificados se seguiram como no item 3.3.3. Também de acordo com o que já foi descritos em itens anteriores, foi feita ligação dos fragmentos aos vetores de clonagem (item 3.3.4), transformação bacteriana e mini-preparações (item 3.3.5), digestão do DNA plasmidial (item 3.3.6) e visualização dos fragmentos utilizando géis de agarose.

3.6.4 SUPER PCR

Para cada um dos genes de interesse, foi feita uma “Super-PCR” com oito tubos para cada amostra com um volume de 40 µl cada um, na seguinte proporção: 2,0 µl de *primer forward* (específico para cada gene – Tabela 1) na concentração de 10 µM; 2,0 µl de *primer reverse* (específico para cada gene - Tabela 1) na concentração de 10 µM; 2,0 µl de cDNA; 9,0 µl água Mili-Q estéril; 25 µl de Eppendorf MaterMix (2,5X), em seguida procedeu-se a amplificação dos genes de interesse por PCR, utilizando o programa como descrito no item 3.3.3. Os produtos de cada uma das oito amostras foram colocados em um único tubo, totalizando um volume final de 320 µl. Deste total, 300 µl foram purificados (QIAquick PCR Purification kit [250] - QIAGEN - cat.28106) e 20 µl foram armazenado a -20°C e utilizados em géis de agarose para verificação em passos seguintes, junto com cada produto produzido segundo estes passos.

3.6.5 SÍNTESE DO RNA DE FITA DUPLA (dsRNA)

O dsRNA foi sintetizado para cada gene de interesse (*crc*, *RfaBp*, *usp* e *jhe*) e para o controle (*gfp*) utilizando o kit RiboMax™ Large Scale RNA Production System . T7 (cat.1300 - Promega). Foram utilizados 9,0 µg de DNA, purificado da “Super-PCR” descrita anteriormente, e seguindo-se as instruções do fabricante do kit. Adicionou-se, nesta ordem*, 20 µl de T7 transcription 5X *buffer*, 30 µl de rNTPs (25 mM cada - misturar 7,5 µl de cada um a 100 mM - U,A,C e G - para que estejam a 25

* Nas especificações do fabricante está destacado que a ordem em que os reagentes são adicionados é muito importante para sucesso na síntese.

mM no final), 40 µl de DNA molde (9,0 µg DNA obtido através da Super-PCR + água para completar 40 µl, quando necessário) e 10 µl da mistura de enzimas. Posteriormente, a reação foi incubada a 37°C por 8 horas. A integridade, assim como a presença de apenas uma banda correspondente ao fragmento de interesse, foi novamente verificada através de gel de agarose.

3.6.6 PURIFICAÇÃO DO dsRNA UTILIZANDO TRIzol®

Aos 100 µl de dsRNA obtidos foram adicionados a 150 µl de água livre de nuclease e 750 µl de TRIzol®. Essa mistura era mantida em temperatura ambiente por 5 minutos e então se seguia o protocolo de extração com TRIzol® como no item 3.3.2. Ao final da extração, o dsRNA era ressuspendido em 30 µl de água livre de nuclease, mantido a 50°C no termobloco por 5 minutos e renaturado a 98°C por 5 minutos seguidos de incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. Uma alíquota de 1,0 µl deste dsRNA recém sintetizado era adicionado a 9,0 µl de água livre de nuclease para quantificação e para última verificação em gel de agarose, no qual nenhuma banda menor que o fragmento de interesse deve ser visualizada. O restante da amostra foi alíquotado e armazenado a -80°C até sua utilização.

3.6.7 TRATAMENTO COM dsRNA

As larvas de segundo estágio (L2) foram tratadas com dsRNA. O dsRNA era aplicado no alimento larval diretamente no favo (Figura 6), que posteriormente era devolvido à colônia e mantido nela até a coleta dos indivíduos na fase de interesse (Nunes & Simões, 2009). Para este experimento foi aplicado 1,0 µl de dsRNA na concentração de 5,0 µg/µl, para os genes *usp* e *jhe* e 1,0 µg/µl para os genes *crc* e *RfaBp*. Para estes dois últimos, a quantidade administrada de dsRNA foi menor, pois com quantidades maiores os indivíduos não sobreviviam ou eram retirados da colônia. Inicialmente o dsRNA para o gene *green fluorescent protein (gfp)*, era utilizado como controle por não ter um correspondente no genoma de *A. mellifera*, e portanto, esperava-se que não causasse efeito na expressão gênica desta espécie. Contrariamente a isto, o que observamos ao longo dos experimentos de RNAi utilizando este controle, foi um efeito deste na expressão dos genes alvo (Ver Anexo 4 para resultados), o que foi corroborado com outros procedimentos experimentais (Anexo 3A), então apenas o controle para o qual nenhum tipo de dsRNA foi administrado, foi utilizado para as análises finais.

3.6.7.1 esterase do hormônio juvenil -*jhe*

Para este gene 12 indivíduos foram tratados com o dsRNA (*dsjhe*) e 12 indivíduos que não receberam dsRNA foram utilizados como controle. Foram obtidas 4 amostras correspondentes ao tratamento e 4 amostras correspondentes ao controle, cada uma delas formada por um pool de 3 indivíduos. Os indivíduos foram coletados em S1 (5º instar larval, fase de *spinning* 1), fase em que *jhe* apresentava altos níveis de expressão, de acordo com perfil parcial obtido anteriormente.

3.6.7.2 ultraspiracle -*usp*

Para o silenciamento de *usp* 3-4 indivíduos foram tratados com o dsRNA (*dsusp*) e 3-4 indivíduos que não receberam dsRNA foram utilizados como controle. A partir destes indivíduos foram obtidas as amostras para cada grupo. Os indivíduos foram coletados em duas diferentes fases do desenvolvimento, 3 indivíduos no início da fase Pré-pupal (PP) e 4 indivíduos no final do estágio Pupal (Pbl – pupa de olho marrom com leve pigmentação no corpo). Portanto são no total, 14 indivíduos, 6 em PP e 8 em Pbl. No período pré-pupal os níveis de expressão de *usp* estão elevados, de acordo com perfil de expressão obtido, e por isto foi escolhido, enquanto que indivíduos em Pbl, foram coletados para sabermos a duração do efeito do RNAi, assim como a influência no desenvolvimento de abelhas.

3.6.7.3 *cryptocephal* - *crc* e *retinoid- and fatty acid-binding protein* - *RfaBp*

Foram tratados 8 indivíduos para *crc* e 10 indivíduos para *RfaBp* com o dsRNA correspondente (*ds crc* e *dsRfaBp*). Além disto, indivíduos que não receberam em sua dieta nenhum tipo de tratamento, foram utilizados como controle. A fase de desenvolvimento em que ambos foram coletados foi L5S1 (5º instar larval – 1º fase de *spinning* ou tecelagem do casulo). Esta fase foi escolhida, pois, os níveis de expressão do gene eram relativamente altos, segundo o perfil determinado anteriormente.

3.6.7.4 PARA VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO SILENCIAMENTO

O material coletado teve o RNA total extraído e posterior síntese de cDNA se seguia como no item 3.3.2). Este cDNA era utilizado em qPCR (item 3.4.2) utilizando *primers* para os genes alvo e

para os genes utilizados para normalização (*ribosomal-protein 49 – rp-49* e *elongation-factor S-8 – eIFS-8* - Tabela 1) desenhados como descrito no item 3.2. Os resultados eram analisados para determinar a eficiência do silenciamento do gene de interesse por interferência de RNA através da quantificação dos transcritos realizadas como descrita acima (item 3.4.2). Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$), programa BioEstat versão 4.0.

Além da verificação do próprio gene em relação ao seu silenciamento, analisamos também a influencia do silenciamento destes genes sobre a expressão dos demais genes aqui estudados e ainda acrescentamos o gene *EcR* (receptor de ecdisona), com suas variantes A e B, nas análises, por ser este o parceiro heterodimérico de *usp* no receptor de ecdisona, podendo então ter seus níveis de transcrito modificados pelos níveis de seu parceiro e também por genes que exercem seu efeito sobre ele. Tais análises foram feitas da mesma maneira que aquela feita para o gene, utilizando quantificação dos transcritos por qPCR e análises como descrito acima.

Figura 6: Demonstração do procedimento utilizado para administrar RNA de fita dupla (dsRNA) na dieta natural de larvas no segundo estágio de abelhas *Apis mellifera* em experimentos de interferência por RNA (RNAi). (Nunes & Simões, 2009).

3.7 IDENTIFICAÇÃO DOS miRNAs CANDIDATOS A REGULADORES DO GENE DA *esterase do hormônio juvenil (jhe)*

3.7.1 PREDIÇÃO DOS microRNAs REGULADORES DO GENE DA *esterase do hormônio juvenil (jhe)*

Para identificar os miRNAs candidatos a reguladores do gene *jhe*, a região 3' não-traduzida do gene *jhe* foi submetida a uma busca por sítios de ligação para os miRNAs de *A. mellifera* recuperados da versão 18 do miRBase (www.mirbase.org/). Essa predição foi realizada pelo programa RNAhybrid (Rehmsmeier *et al.* 2004), considerando pareamento na região da *seed* (2-7 nt), valores de energia livre inferiores a -15 kcal/mol e *p-value* menor que 0.05. Este gene foi escolhido pelo papel que desempenha na degradação do HJ, um dos principais fatores envolvidos na determinação de castas.

3.7.2 VALIDAÇÃO DA PREDIÇÃO DOS microRNAs REGULADORES DO GENE *jhe*

Para avaliar os níveis de expressão relativa dos miRNAs sugeridos como reguladores de *jhe*, dois conjuntos de amostras foram utilizados: 1) RNA extraído de larvas tratadas com *dsjhe* e de larvas controle; 2) RNA de rainhas e operárias nas fases L5F3 (fase em que as operárias apresentam maior nível de transcritos de *jhe*), L5S2 (fase em que rainhas apresentam maior nível de transcritos de *jhe*) e Pb (fase em que ambas operárias e rainhas apresentam níveis basais de transcritos de *jhe*). Do total de miRNAs sugeridos como reguladores de *jhe*, elegemos os miRNAs *let-7*, *miR-1*, *miR-8*, *miR-12*, *miR-34*, *miR-278* e *miR-989*, *miR-263b* para validação por PCR em tempo real. Além destes, o *miR-2796* foi incluído na validação por apresentar expressão altamente diferencial entre as castas, com expressão preferencial em rainhas (comunicação pessoal de Zayed, A.). A validação dos miRNAs candidatos a reguladores do gene *jhe* foi realizada com base na função canônica dos miRNAs de reduzir os níveis dos transcritos-alvos através do pareamento da *seed* com a região 3' não-traduzida do gene-alvo. Assim, foram considerados os valores de expressão do gene *jhe* e dos miRNAs eleitos nos pontos do desenvolvidos escolhidos de operárias e rainhas. Calculou-se o coeficiente de Pearson (*r*) (informações em Bieguelman, 2002) entre os valores de Ct do gene *jhe* e dos miRNAs. Os pares de miRNA:gene-alvo que apresentaram $-1.0 < r < -0.8$ foram apontados como forte candidatos por possuírem perfis antagônicos de expressão.

3.7.2.1 SÍNTESE DE cDNA A PARTIR DE miRNAs E QUANTIFICAÇÃO POR PCR REAL-TIME

O cDNA utilizado para verificação dos níveis de transcritos dos miRNAs selecionados para validação foi sintetizado a partir do RNA total (obtido conforme descrito na seção 3.6.7.4) usando NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis qRT-PCR Kit (Invitrogen™ – cat. MIRC-50), seguindo-se as especificações do fabricante. Foram utilizados dois *primers* na síntese do cDNA: um *primer reverse* universal (fornecido pelo NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis qRT-PCR Kit) e o outro *forward* específico para cada miRNA. Para obter a sequência do *primer* específico, as sequências dos miRNAs maduros foram recuperadas a partir do miRBase e as mesmas tiveram as bases uracila (U) substituídas por timina (T) (Tabela 1). As quantidades de cada reagente utilizadas em cada reação foram: 10 µl do SYBR Green PCR Master Mix; 0,4 µl de *primer* específico 10 µM (Tabela 1); 0,4 µl de *primer* universal 10 µM; 2,0 µl de cDNA (diluído 1:10); 7,2 µl de água Mili-Q estéril. A quantificação dos transcritos dos miRNAs foi normalizada com a expressão do gene codificador do pequeno RNA nuclear U6. A quantificação relativa dos transcritos foi calculada utilizando o método comparativo Ct (Applied Biosystems, User bulletin # 2). Também foram realizadas análises da curva de dissociação para testar a especificidade e a qualidade das reações de PCR em tempo real. Os níveis de expressão dos miRNAs em rainhas e operárias, em cada fase do desenvolvimento estudada (Anexo 6), assim como aqueles encontrados para tratamento com *dsjhe* e controle, foram analisados estatisticamente com ajuda do programa BioEstat (4.0), utilizando o teste Mann-Whitney ($p < 0,05$).

3.8 IDENTIFICAÇÃO DOS MIRNAS AFETADOS PELO SILENCIAMENTO DO GENE CODIFICADOR DA *esterase do hormônio juvenil – jhe*

3.8.1 SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA DE PEQUENOS RNAs

Com a finalidade de identificar os miRNAs afetados pelo silenciamento do gene *jhe*, amostras de RNA coletadas no experimento de silenciamento do gene *jhe* (conforme procedimento descrito no item 3.6.7.4) foram submetidas a um sequenciamento em larga escala. Três amostras de RNA extraído

de larvas tratadas com *dsjhe* e três amostras de RNA obtidas de larvas controle foram enviadas a *facility* da Universidade da Carolina do Norte (*High-Throughput Sequencing Facility*, na cidade de Chapel Hill, EUA), onde foram preparadas e sequenciadas na plataforma Illumina (Genome Analyzer II, Life Sciences). O responsável pelo sequenciamento isolou moléculas de RNAs menores que 200 nucleotídeos, fração de RNA que contém as moléculas de miRNAs, seguindo o protocolo do fabricante (TruSeq™ Small RNA Sample Preparation Guide, Illumina, Life Sciences).

3.8.2 ANÁLISE DAS BIBLIOTECAS GERADAS PELO SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA

Os arquivos contendo as sequências curtas (*reads*) geradas pelo sequenciamento foram enviadas ao servidor do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas onde foram processados em colaboração com a doutoranda Flávia Cristina de Paula Freitas. A ferramenta Cutadapt (<http://code.google.com/p/cutadapt/>) foi utilizada para remover a sequência dos adaptadores (utilizados no preparo das bibliotecas) e para filtrar *reads* com qualidade Phred maior que 20 (que reflete um acerto de 99% no reconhecimento das bases ou *base calling*, (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998). Em seguida, utilizando *script* desenvolvido em linguagem Python (www.python.org), foi calculada a distribuição das *reads* por comprimento (nt), com a finalidade de caracterizar as bibliotecas.

Após a remoção dos adaptadores, as *reads* foram mapeadas contra um banco de sequências expressas composto por sequências de rRNA (RNA ribossômico), tRNA (RNA transportador), miRNAs (microRNAs), outros RNAs não-codificadores, RNAs codificadores de proteínas e RNAs de patógenos de abelhas *A. mellifera* (Tabela 4). O mapeamento foi realizado pelo programa BWA (*Burrows-Wheeler Aligner*, Li & Durbin, 2009). O programa BWA gera arquivos no formato SAM que apresentam diversas informações sobre o mapeamento das *reads*. *Scripts* em linguagem Python foram desenvolvidos para analisar os arquivos SAM e identificar as entidades genéticas expressas nas bibliotecas. Para as análises seguintes, as *reads* que mapearam nas sequências de miRNAs de abelhas foram contabilizadas e essa contagem normalizada pelo número de *reads* mapeadas (segundo a normalização sugerida em Mortazavi *et al.*, 2008). O cálculo da expressão diferencial dos miRNAs

entre as amostras tratadas e controle foi realizado pelo pacote edgeR (Robinson, *et al.* 2010) do Bioconductor (plataforma R, www.bioconductor.org/packages/2.9/bioc/html/edgeR.html).

3.8.3 PREDIÇÃO DOS GENES REGULADOS PELOS MIRNAS AFETADOS PELO SILENCIAMENTO DO GENE CODIFICADOR DA *esterase do hormônio juvenil - jhe*

Para identificar os miRNAs candidatos a reguladores do gene *jhe*, procedeu-se uma busca por sítios de ligação para os miRNAs diferencialmente expressos entre os indivíduos tratados com *dsjhe* e controles na região 3' não-traduzida dos 11062 genes preditos para *A. mellifera* (Official Gene Set 2, HONEYBEE GENOME CONSORTIUM, 2006). Esta predição foi conduzida com auxílio do programa RNAhybrid (Rehmsmeier *et al.* 2004), considerando pareamento na região da *seed* (2-7 nt), valores de energia livre inferiores a -20 kcal/mol e *p-value* menor que 0.05.

Em seguida, recuperou-se os ortólogos de *Drosophila melanogaster* (www.flybase.org/) dos genes candidatos a alvo desses miRNAs de *A. mellifera*. A recuperação dos ortólogos nos permitiu identificar os processos biológicos (*Gene Ontology*; www.geneontology.org/) aos quais os genes candidatos estão associados. A identificação dos processos biológicos foi realizada através do *plug in* Bingo (Maere *et al.*, 2005) executado na plataforma Cytoscape (www.cytoscape.org/).

Tabela 4: Identificação dos bancos de dados utilizados para mapear as *reads* das bibliotecas de pequenos RNAs extraídos de larvas tratadas com *dsjhe* e larvas controle de *A. mellifera*.

Sequências Expressas	Base de dados	Organismos	Número de Sequências	Referência
Genes codificadores	Official Gene Set (OGS 2 - versão 4.0 genoma)	<i>A. mellifera</i>	11062	http://genome.ucsc.edu/
miRNA	miRBase	<i>A. mellifera</i>	168	http://www.mirbase.org/
rRNA	SILVA	Insetos	6820	http://www.arb-silva.de/
tRNA	GtRNadb	Insetos	726	http://gtRNadb.ucsc.edu/
Outros ncRNAs	NONCODE	Eucariotos	423904	http://www.noncode.org/NONCODERv3/
Patógenos	NCBI	Bactérias, Fungos e Vírus causadores de doenças em abelhas	933	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

4. RESULTADOS

4.1 PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA

4.1.1 *cryptocephal* (*crc*)

Transcritos de *crc* são observados em rainhas e operárias em todas as fases do desenvolvimento analisadas (Figura 7). Nota-se, ao mesmo tempo, semelhanças e diferenças em relação à flutuação expressão de *crc* entre as castas. Nos estágios larvais iniciais, anteriores ao período crítico de determinação de castas (L4), os níveis de expressão de *crc* são basais. A partir de L4, os níveis de transcritos se elevam gradativamente e se diferem entre as castas, sendo mais elevados em operárias durante todo o período. Os níveis de *crc* são máximos em rainhas no 2º estágio pré-pupal (PP2). Em operárias, o pico de expressão de *crc* ocorre no 3º estágio pré-pupal (PP3). Observamos que o pico de expressão de *crc* em rainhas é menos pronunciado e está adiantado em relação àquele encontrado em operárias. Em ambas ocorre uma queda nos níveis de expressão deste gene a partir das fases imediatamente posteriores aos níveis máximos encontrados. A expressão de *crc* nas castas se mantém relativamente baixa até o final do estágio pupal, quando começam a subir novamente atingindo novos picos em Pbd em rainhas e em operárias recém-emergidas (RN). É interessante ressaltar que os níveis máximos de expressão do *crc*, tanto em rainhas quanto em operárias, são observados em períodos pré-metamórficos. São encontradas diferenças estatísticas significativas entre rainhas e operárias desde L5F1 até recém nascidas (RN), com exceção das fases, L5S3 e PP2 (Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Figura 7: Expressão relativa do gene codificador de *cryptocephal* (*crc*) em diferentes estágios do desenvolvimento de operárias e rainhas de *Apis mellifera*. Os níveis de expressão do gene codificador de RP-49 foram utilizados como controle endógeno para normalizar os níveis de expressão de *crc*. Os valores para cada estágio correspondem à média da expressão encontrada nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$). Ver Tabela 2 para fases do desenvolvimento.

4.1.2 retinoid- and fatty acid-binding protein - *RfaBp*

O perfil de expressão de *RfaBp* de rainhas e operárias de *Apis mellifera* mostra que este gene é expresso durante todo o desenvolvimento, apresentando muita semelhança entre ambas, exceto pelo 5º instar larval (L5F e L5S). Assim como foi visto no perfil de *crc*, os níveis de transcritos de *RfaBp* são praticamente basais nos estágios iniciais onde ainda não ocorreu a determinação de castas (Figura 8). Em rainhas, a partir do 3º estágio larval (L3), os níveis de transcritos começam a apresentar um aumento gradativo até L5F3, após o qual apresenta uma queda em L5S1 e subsequente elevação até atingir seus níveis máximos na fase L5S3 (Figura 8). Após esta fase, os níveis de mRNA de *RfaBp* caem novamente em rainhas, e se mantêm baixos até a emergência do adulto. Em operárias, os níveis de *RfaBp* começam a aumentar a partir do 4º estágio larval (L4), atingindo níveis máximos em L5F3. A partir de L5S1 os níveis de *RfaBp* em operárias diminuem gradativamente e atingem níveis relativamente baixos desde o final do estágio pré-pupal até a emergência do adulto. Observamos que o pico de expressão de *Rfabp* em operárias é adiantado em relação ao observado em rainhas e que os níveis de expressão deste gene encontrados desde a fase L5F2 até recém-nascidas (RN), com exceção de L5S2 e Pbd, são estatisticamente diferentes entre as castas, de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Figura 8: Expressão relativa do gene codificador de *retinoid- and fatty acid-binding protien* (*RfaBp*) em diferentes estágios do desenvolvimento de operárias e rainhas de *Apis mellifera*. Os níveis de expressão do gene codificador de RP-49 foram utilizados como controle endógeno para normalizar os níveis de expressão de *RfaBp*. Os valores para cada estágio correspondem à média da expressão encontrada nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$). Ver Tabela 2 para fases do desenvolvimento.

4.1.3 *ultraspiracle (usp)*

Observamos que a transcrição do gene codificador de *usp* ocorre durante todo o desenvolvimento, tanto em rainhas quanto em operárias. O perfil de expressão de *usp* é muito semelhante entre as castas, exceto nas fases L5F e PP3 (Figura 9), em que operárias apresentam níveis relativamente mais altos que rainhas. Em operárias, na fase PP3, podemos observar o mais pronunciado pico de expressão de *usp*, após o qual, os níveis do gene sofrem uma queda e voltam a subir no final do estágio pupal. Em rainhas, os maiores níveis de expressão de *usp* ocorrem em L5S2, sofrendo uma queda no estágio subsequente (L5S3) e voltando a subir em PP, onde apresenta níveis equivalentes aos encontrados em L5S2. Após esta fase começa a cair, atingindo um mínimo em Pb. Assim como observado em operárias, no final do estágio pupal os níveis de *usp* em rainhas sobem e atingem um outro pico em Pbd e caem novamente em RN. Encontramos diferença estatística significativa (Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$), em relação aos níveis de expressão de *usp* encontrados, para rainha e operária nas fases de desenvolvimento L3, L5F2, L5F3, L5S1, PP3, Pb e Pbd.

Figura 9: Expressão relativa do gene codificador de *ultraspiracle (usp)* em diferentes estágios do desenvolvimento de operárias e rainhas de *Apis mellifera*. Os níveis de expressão do gene codificador de RP-49 foram utilizados como controle endógeno para normalizar os níveis de expressão de *usp*. Os valores para cada estágio correspondem à média da expressão encontrado nas amostras ($n=3$). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$). Ver Tabela 2 para fases do desenvolvimento.

4.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL POR MICROARRAYS

Visando encontrar genes diferencialmente expressos envolvidos na diferenciação de castas, foram realizados estudos de expressão gênica em larga escala usando a tecnologia de *microarrays*. Foram comparadas amostras de rainhas e operárias de *A. mellifera* em L4, fase imediatamente posterior ao período crítico de determinação de castas. Um total de 8.244 transcritos está expresso nas amostras estudadas e foram incluídos em nossas análises subsequentes. Ao nível significância FDR01 (False Discovery Rate 0,01%), encontramos 670 transcritos diferencialmente expressos entre os grupos (Anexo 5), sendo que para 432 destes genes foram encontrados ortólogos em *Drosophila*. Observamos que a maioria dos genes diferencialmente expressos encontrados apresentam expressão preferencial em operárias, 438 contra 231 preferencialmente expressos em rainhas dentre os 670 encontrados (Anexo 5A). Foi realizado um agrupamento hierárquico (*Hierarchical Cluster*) destes genes diferencialmente expressos, considerando genes inibidos ou ativados em uma das castas em relação à outra. Conforme ilustrado na Figura 10, houve separação das amostras em dois diferentes grupos, um deles constituído pelas amostras de rainhas e outro pelas amostras de operárias. Análises funcionais com base nos termos do *Gene Ontology* (GO), utilizando o programa DAVID, agruparam os genes diferencialmente expressos entre as castas em 59 grupos (ou *clusters*) distintos, indicando processos biológicos nos quais estes genes estão envolvidos (Tabela completa – Anexo 5B). Foram feitas análises de GO individuais para os genes preferencialmente expressos em cada uma das castas, por meio das quais podemos destacar 22 categorias de processos biológicos (Tabela 5). A categoria de genes relacionados à resposta imune, preferencialmente expressos em operárias foi a mais representativa entre elas. Outros processos biológicos também se mostraram representativos, entre eles metamorfose, neurogênese, morte celular, regulação da transcrição, reprodução, regulação de processos de biossíntese e crescimento (Tabela completa – Anexo 5B).

Como o objetivo deste trabalho reside em encontrar fatores moleculares determinantes de operárias, propusemos uma “*Top list*” contendo genes que apresentaram expressão preferencial nesta casta (Tabela 6). Eles estão envolvidos em processos biológicos como morte celular programada (apoptose), neurogênese, degradação de hormônio juvenil, aprendizagem olfativa, composição do citoesqueleto, entre outros. Entre os genes da “*top list*”, encontramos o codificador da *esterase do hormônio juvenil* (*jhe*) e decidimos incluí-lo em análises subsequentes.

Figura 10: Dendrograma mostrando o agrupamento hierárquico, de acordo com os níveis de expressão diferencial entre rainhas (Q) e operárias (W) de *Apis mellifera* no quarto estágio larval (L4). Blocos azuis representam genes inibidos e blocos vermelhos representam genes ativados de acordo seus níveis de expressão determinados por análises de *microarrays*.

Tabela 5: Análises de GO realizadas no programa DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) mostrando os processos biológicos nos quais estão envolvidos a maior parte dos genes diferencialmente expressos entre rainhas e operárias no estágio L4 (obtidos por análises de *microarrays*). **Células cinza escuro:** categorias mais representativas em rainhas de acordo com genes preferencialmente expressos, **células cinza claro:** categorias mais representativas em operárias de acordo com genes preferencialmente expressos; **células sem preenchimento:** categorias igualmente representadas em ambas as castas.

Processo Biológico
Respiração Celular
Morfogênese pós-embrionária
Organização e modificação da cromatina
Adesão celular
Localização celular
Resposta imune
Óxido-Redução
EGF
Homeostase
Morte Celular
Processos de crescimento e tamanho celular
Metamorfose
Processos de desenvolvimento
Neurogênese
Reprodução
Regulação de processos biossintéticos
Regulação da Transcrição
Transporte celular

Tabela 6: “Top list” dos genes preferencialmente expressos em operárias no 4º estágio larval (L4). Função biológica determinada de acordo com o banco de dados Gene Ontology, associados à espécie *Drosophila melanogaster* (disponível no portal FlyBase – www.flybase.org). Em negrito o gene da esterase do hormônio juvenil, incluído nas análises feitas neste trabalho por apresentar expressão diferencial entre as castas e por atuar na degradação do HJ.

GB/nome do gene	Processo Biológico
GB16903 - cathD	Morte celular autofágica
GB17380 - failed axon (fax)	Axogênese
GB17541	Regulação positiva da apoptose
GB15327 – esterase do hormônio juvenil (jhe)	Catabolismo de Hormônio Juvenil*
GB11753 – Atf3	Desenvolvimento do sistema nervoso
GB19301- PGRP-SC2	Resposta imune
GB11509 - futsch	Aprendizagem olfativa, organização do citoesqueleto, regulação negativa da apoptose neuronal, morfogênese dendrítica, axonogênese; transporte de carga nos axônios; regulação do crescimento sináptico nas junções neuro-musculares

* Processo biológico determinado experimentalmente por Mackert *et al.* (2008), mas ainda não incorporado ao banco de dados de Gene Ontology (GO) do FlyBase.

4.3 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE CODIFICADOR DA *esterase do hormônio juvenil (jhe)*

Análises comparativas entre os níveis de mRNA de *jhe* realizadas durante todo o desenvolvimento rainhas e operárias de *A. mellifera* mostraram alta expressão desse gene durante o período L5 (L5F e L5S), momento este que são observadas diferenças entre as castas. Nas fases anteriores e posteriores a este período os níveis de *jhe* são basais tanto em rainhas quanto em operárias (Figura 11). As operárias apresentam os maiores níveis de expressão que rainhas de L5F1 a L5S1 (segundo o Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$), enquanto a abundância de mRNA de *jhe* em rainhas é maior que em operárias em L5S2. Encontramos diferença estatística significativa entre os níveis de expressão de *jhe* em rainhas e operárias para os estágios de desenvolvimento posteriores a L3, excetuando-se L5S3, PP2 e Pbd (Figuras 10A e 10B) (segundo o Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Na mesma linha de investigação de genes relacionados ao metabolismo de HJ, determinamos os níveis de expressão do gene codificador da enzima responsável pela última etapa da síntese do HJ, a metil-farnesoato-epoxidase (MFE). Tal quantificação foi realizada nas fases em que os níveis de expressão da *jhe*

eram os mais altos em operárias, L5F3, e em rainhas, L5S2, e em uma fase onde eram basais em ambas (Pb) (Figura 12). Em L5F3 e L5S2 os níveis de expressão de *mfe* em rainhas são mais altos que em operárias e, em Pb os níveis deste gene são basais em ambas as castas. As diferenças encontradas entre rainhas e operárias nas fases F3 e S2 são estatisticamente significativas (Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$).

(A)

(B)

Figura 11: Expressão relativa do gene codificador da esterase do hormônio juvenil (*jhe*) em diferentes estágios do desenvolvimento de operárias e rainhas de *Apis mellifera*. (A) Níveis de *jhe* em todas as fases de desenvolvimento estudadas. (B) Níveis de *jhe* a partir da segunda fase do estágio Pré-pupal até o final do estágio pupal, evidenciando a diferença existente entre os níveis de expressão do gene nas fases. Os níveis de expressão do gene codificador de RP-49 foram utilizados como controle endógeno para normalizar os níveis de expressão de *jhe*. Os valores para cada estágio correspondem à média da expressão encontrado nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$). Ver Tabela 2 para fases do desenvolvimento.

Figura 12: Expressão relativa do gene codificador da metil-farnesoato-epoxidase (*mfe*) em diferentes estágios do desenvolvimento de operárias e rainhas de *Apis mellifera*. Os níveis de expressão do gene codificador de RP-49 foram utilizados como controle endógeno para normalizar os níveis de expressão de *mfe*. Os valores para cada estágio correspondem à média da expressão encontrado nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$). Ver Tabela 2 para fases do desenvolvimento.

4.4 SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNAi

Nesta etapa, nosso intuito foi analisar a possível participação de *ultraspiracle* (*usp*), *cryptocephal* (*crc*), *retinoid- and fatty acid-binding protein* (*RfaBp*) e da *esterase do hormônio juvenil*, (*jhe*) no processo de desenvolvimento de castas. Em particular, procuramos investigar se tais genes atuam em redes de expressão gênica que favorecem a determinação de operárias, analisando seus papéis sobre a expressão de um em relação ao outro, além de outro gene potencialmente relacionados a este processo, o *EcR*.

4.4.1 *cryptocephal* - *crc*

Para os indivíduos tratados com o RNA de fita dupla para o gene *crc* (*dscrc*) não foram observadas alterações visíveis na morfologia e nem em relação ao *timing* do desenvolvimento. Observamos uma queda de 20%, que representa a média dos níveis de expressão de *crc* encontrados individualmente nas amostras tratadas (n=8) em relação ao controle (n=3) (Figura 13). A comparação entre as médias encontradas para o grupo-controle e o grupo-tratamento não apresentaram diferença estatística (Segundo Teste Mann-Whitney - $p < 0,05$). Os níveis de expressão de *RfaBp*, *usp*, *jhe*, *EcR-A* e *EcR-B* foram analisados nas amostras do experimento acima. Observamos um aumento nos níveis de expressão de *RfaBp* e *EcR-A* ($p < 0,05$) nas amostras tratadas relação aos controles (Figura 14).

Figura 13: Quantificação relativa de mRNAs do gene codificador *cryptocephal* (*crc*) em larvas de operárias de *Apis mellifera*, no estágio de desenvolvimento L5-S1 sem tratamento (Controle, n=3) e tratadas no segundo estágio larval, L2 com 1,0 µg de *dscrc* (n=8). Os valores de expressão obtidos para o gene codificador de RP-49 foram utilizados para normalização da expressão de *crc*. Os dados de cada grupo correspondem à média da expressão das amostras. As linhas representam o desvio padrão. A expressão relativa foi calculada de acordo com o que foi proposto por Livak & Schmittgen (2001). Não houve diferença estatística significativa de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$) entre as amostras tratadas e controle.

Figura 14: Quantificação relativa de mRNAs dos genes codificadores de *EcR* variante A (*EcR-A*); *EcR* variante B (*EcR-B*); *ultraspiracle* (*usp*); *retinoid- and fatty acid-binding protein* (*RfaBp*) e *esterase do hormônio juvenil* (*jhe*); em amostras tratadas com 1,0 µg de *dscrc* (n=5) e controles sem tratamento (n=3). Os valores obtidos para o gene codificador de RP-49 foram utilizados para normalização. Os dados de cada grupo correspondem à expressão da média das amostras, e as linhas representam o desvio padrão. A expressão relativa foi calculada de acordo com o que foi proposto por Livak & Schmittgen (2001). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$) entre as amostras tratadas e controle.

4.4.2 *retinoid- and fatty acid-binding protein - RfaBp*

Os indivíduos tratados com dsRNA para o gene *RfaBp* não apresentaram diferenças morfológicas observáveis, nem em relação ao tempo de desenvolvimento, quando comparados com os indivíduos do grupo controle. Gráficamente, notamos uma diminuição de aproximadamente 60% nos níveis de *RfaBp* nas amostras tratadas com *dsRfaBp* (Figura 15). Foi observada diferença estatística entre controle e tratamento com *dsRfaBp*, de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$). Outras análises, em relação aos níveis de expressão, foram realizadas utilizando os genes *crc*, *usp*, *jhe*, *EcR-A* e *EcR-B*. Notamos que os níveis de expressão de *RfaBp* são capazes de influenciar negativamente a transcrição de *jhe* ($p < 0,05$) (Figura 16).

Figura 15: Quantificação relativa de mRNAs do gene codificador de *retinoid- and fatty acid-binding protein* (*RfaBp*) em larvas de operárias de *Apis mellifera*, no estágio de desenvolvimento L5S1 sem tratamento (Controle, n=3) e tratadas no segundo estágio larval, L2 com 1,0 µg de *dsRfaBp* (n=10). Os valores de expressão obtidos para o gene codificador de RP-49 foram utilizados para normalização da expressão de *RfaBp*. Os dados de cada grupo correspondem à média da expressão das amostras. As linhas representam o desvio padrão. A expressão relativa foi calculada de acordo com o que foi proposto por Livak & Schmittgen (2001). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$) entre as amostras tratadas e controle.

Figura 16: Quantificação relativa de mRNAs dos genes codificadores de *EcR* variante A (*EcR-A*); *EcR* variante B (*EcR-B*); *ultraspiracle* (*usp*); *cryptocephal* (*crc*) e *esterase do hormônio juvenil* (*jhe*); em amostras tratadas com 1,0 µg de *dsRfaBp* (n=5) e seus controles (n=3) para os quais nenhum dsRNA foi administrado. Os valores obtidos para o gene codificador de RP-49 foram utilizados para normalização. Os dados de cada grupo correspondem à média da expressão da média das amostras. As linhas representam o desvio padrão. A expressão relativa foi calculada de acordo com o que foi proposto por Livak & Schmittgen (2001). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$) entre as amostras tratadas e controle.

4.4.3 *ultraspiracle* - *usp*

Foram realizados experimentos de interferência por RNA para o gene *usp*. Os indivíduos tratados com *dsusp* e controle foram coletados em duas diferentes fases do desenvolvimento PP e em Pbl. Para os indivíduos coletados em PP não foram observadas diferenças morfológicas visíveis quando se comparou indivíduos tratados e controle, e diferenças em relação ao *timing* do desenvolvimento também não foram observadas. Quando comparamos os níveis de expressão de *usp* nas amostras obtidas a partir destes indivíduos, observamos uma queda de 50% em média no tratamento (n=3) em relação ao controle (n=3) (Figura 18A), apresentando diferença estatística significativa (Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$). Diferentemente do que foi observado para os indivíduos em PP, os indivíduos tratados que deveriam ser coletados em Pbl estavam em fase de desenvolvimento anterior, Pw (Figura 17). Este atraso observado corresponde a aproximadamente 140 horas em relação aos indivíduos controles que, como esperado, estavam na fase Pbl. Quando comparamos os resultados obtidos para as médias das amostras controle (n=4) e tratamento, (n=3) observamos um decréscimo nos níveis de transcritos *usp* nas amostras tratadas de aproximadamente 30% (Figura 18B). Para esta fase podemos dizer que os grupos amostrais são marginalmente diferentes ($p = 0,07$), segundo Teste Mann-Whitney.

Figura 17: Pupas de operárias de *Apis mellifera* nas quais se observa um atraso no desenvolvimento, sendo os dois grupos provenientes da mesma postura que foi feita de maneira controlada e mantidas em caixa com tela excludora para evitar que a rainha botasse novamente. TRATAMENTO: operárias tratadas em L2 (2º instar larval) com 5µg de RNA dupla-fita para o gene *usp* (*dsusp*); CONTROLE: operárias para as quais nenhum tipo de tratamento foi administrado.

(A)

(B)

Figura 18: Quantificação relativa de mRNAs do gene codificador de *ultraspiracle* (*usp*) em larvas de operárias de *Apis mellifera*, em PP sem tratamento (Controle, n=3) e tratadas no segundo estágio larval, L2 com 5,0 µg de *dsusp* (n=3) e em Pbl sem tratamento (Controle, n=3) e tratadas no segundo estágio larval, L2 com 5,0 µg de *dsusp* (n=4). Os valores de expressão obtidos para o gene codificador de eIFS-8 foram utilizados para normalização da expressão de *usp*. Os dados de cada grupo correspondem à média da expressão das amostras. As linhas representam o desvio padrão. A expressão relativa foi calculada de acordo com o que foi proposto por Livak & Schmittgen (2001). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$) entre as amostras tratadas e controle.

4.4.4 esterase do hormônio juvenil - *jhe*

Os indivíduos tratados com *dsjhe* apresentaram um ligeiro adiantamento no desenvolvimento em relação aos indivíduos controle. Deveriam, de acordo com o número de horas após a eclosão, estar em L5S1, mas já se encontravam em fase posterior, em L5S2 ou L5S3 (resultado não mostrado). As análises utilizando a média dos resultados obtidos para cada amostra controle (n=4) e tratada (n=4) mostraram uma queda média de 60% nos níveis de expressão de *jhe* (Figura 19), estatisticamente significativa, segundo Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Foram determinados também os níveis de transcritos de *EcR-A*, *EcR-B*, *crc*, *RfaBp* e *usp* nas amostras tratadas com *dsjhe* e controle. Observamos alterações relativas aos níveis de expressão para todos os genes estudados. Da mesma forma como foi visto para os níveis de expressão de *EcR-A* em amostras *dscrc*, os níveis deste gene também aumentaram em amostras *dsRfaBp* em relação ao controle (Figura 20). Os genes *RfaBp* e *crc* também apresentaram aumento nos níveis de transcritos nas amostras tratadas em relação às amostras controle (Figura 20) e para *EcR-B* e *usp*, o tratamento com *dsjhe* causou diminuição em seus níveis de transcrição em relação ao controle (Figura 20). Observamos diferença estatística significativa entre controle e tratamento com *dsjhe* para os genes estudados com exceção de *crc* e *EcR-B* (Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Foi feita uma comparação evidenciando o efeito do silenciamento por RNAi dos genes estudados sobre os níveis de expressão de seu respectivo gene alvo e dos demais genes testados. Esta comparação mostra o efeito do silenciamento em seu gene alvo e também nos demais genes testados em relação ao aumento ou diminuição nos níveis de expressão de cada gene, mostrando em que situação os níveis destes apresentaram aumento ou diminuição (Tabela 7). *EcR-A* apresenta aumento nos níveis de expressão para todos os tratamentos em que foi testado e *jhe*, contrariamente, mostra queda nos seus níveis de mRNA em todas. Podemos também observar um padrão contrário nos efeitos encontrados para *crc* e *EcR-B*, e para *RfaBp* e *usp*. *crc* teve seus níveis diminuídos pelo tratamento com o seu respectivo dsRNA, e aumentados pelo tratamento com *dsRfaBp* e *dsjhe*, enquanto em *EcR-B* observamos o oposto para os tratamentos citados (Tabela 7). A relação oposta encontradas para *RfaBp* e *usp* é observada em seus níveis em relação aos tratamentos, *RfaBp* apresenta diminuição em seus níveis de transcritos estimulada pelo tratamento com seu próprio dsRNA enquanto que este tratamento faz com que os níveis de *usp* aumentem. Já os tratamentos com *dscrc* e *dsjhe* estimulam a expressão de *usp* enquanto inibem a expressão de *RfaBp*. Os demais, como apresentado nos resultados anteriores e na tabela 7, mostram queda ou diminuição de acordo com o gene silenciado.

Figura 19: Quantificação relativa de mRNAs do gene codificador da esterase do hormônio juvenil (*jhe*) em larvas de operárias de *Apis mellifera*, no estágio de desenvolvimento L5-S2 ou L%-S3 sem tratamento (Controle, n=4) e tratadas no segundo estágio larval, L2 com 5,0 µg de *dsjhe* (n=4). Os valores de expressão obtidos para o gene codificador de RP-49 foram utilizados para normalização da expressão de *jhe*. Os dados de cada grupo correspondem à expressão da média de amostras contendo um pool de 3 indivíduos cada, e as linhas representam o desvio padrão das amostras, obtido de acordo com o que foi proposto por Livak & Schmittgen (2001). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$) entre as amostras tratadas e controle.

Figura 20: Quantificação relativa de mRNAs dos genes codificadores de *EcR* variante A (*EcR-A*); *EcR* variante B (*EcR-B*); *ultraspiracle* (*usp*); *cryptocephal* (*crc*) e *retinoid- and fatty acid-binding protein* (*RfaBp*); em amostras tratadas com 5,0 µg de *dsjhe* (n=4) e seus controles (n=4) para os quais nenhum dsRNA foi administrado. Os valores obtidos para o gene codificador de RP-49 foram utilizados para normalização. Os dados de cada grupo correspondem à expressão da média das amostras, e as linhas representam o desvio padrão das amostras, obtido de acordo com o que foi proposto por Livak & Schmittgen (2001). Asteriscos representam diferença estatística significativa de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$) entre as amostras tratadas e controle.

Tabela 7: Análise do efeito do silenciamento gênico por RNAi dos genes-alvos *crc*, *RfaBp* e *jhe* sobre a expressão de outros genes (*crc*, *RfaBp*, *usp*, *jhe*, *EcR-A*, *EcR-B*) por qPCR. (+) representa aumento nos níveis de expressão dos genes nas amostras silenciadas em relação ao controle. (-) representa queda nos níveis de expressão dos genes.

GENE SILENCIADO	GENE TESTADO					
	<i>crc</i>	<i>RfaBp</i>	<i>usp</i>	<i>jhe</i>	<i>EcR-A</i>	<i>EcR-B</i>
<i>crc</i>	-	+	-	-	+	+
<i>RfaBp</i>	+	-	+	-	+	-
<i>jhe</i>	+	+	-	-	+	-

4.5 BUSCA POR microRNAs REGULADORES DE *jhe*

Os resultados obtidos nos experimentos de expressão diferencial entre rainhas e operárias indicaram o gene codificador da esterase do hormônio juvenil, *jhe*, como preferencialmente expresso operárias, podendo exercer um importante papel na determinação de castas. Como o hormônio juvenil, alvo da ação da enzima JHE, desempenha papel fundamental no processo de determinação de castas, decidimos realizar estudos complementares. Estes estudos envolveram a predição moléculas possivelmente envolvidas na regulação deste gene, os microRNAs. Esta predição foi feita através de uma análise criteriosa da região 3' não traduzida (3' UTR) do *jhe*, que mostrou a presença de sítios de ligação para 22 microRNAs, possíveis reguladores deste gene (Tabela 8).

Tabela 8: MicroRNAs sugeridos como possíveis reguladores do gene da esterase do hormônio juvenil (*jhe* – GB15327) encontrados através de busca em banco de dados disponíveis utilizando o programa RNAhybrid e tendo como critério de inclusão: energia livre ≤ -15 Kcal/mol, p-value <0.05 e complementaridade total da região *seed* (2-7). Em negrito miRNAs para os quais já existe função descrita na literatura.

RNAhybrid		
miRNA	GB	energia
<i>ame-miR-1</i>	GB15327	-16.8
<i>ame-miR-12</i>		-15.6
<i>ame-miR-278</i>		-17.9
<i>ame-miR-8</i>		-15.4
<i>ame-let-7</i>		-17.6
<i>ame-miR-34</i>		-19.7
<i>ame-miR-263b</i>		-16.8
<i>ame-miR-985</i>		-16.6
<i>ame-miR-989</i>		-16.9
<i>ame-miR-3752</i>		-18.6
<i>ame-miR-3772</i>		-19.2
<i>ame-miR-3776</i>		-17.8
<i>ame-miR-3786</i>		-16.6
<i>ame-miR-3787</i>		-15.1
<i>ame-miR-3789</i>		-17.7
<i>ame-miR-3792</i>		-19.5
<i>ame-miR-3794</i>		-15.4
<i>ame-miR-3728</i>		-16.5
<i>ame-miR-3715</i>		-15.4
<i>ame-miR-3716a</i>		-15
<i>ame-miR-3739</i>		-17.5
<i>ame-miR-3740</i>		-16.2

4.6 VALIDAÇÃO DE miRNAs SUGERIDOS COMO REGULADORES DE *jhe*

4.6.1 ESTUDOS DE EXPRESSÃO DOS miRNAs EM RAINHAS E OPERÁRIAS

A função canônica dos miRNAs é reduzir os níveis de tradução dos genes-alvos, ou seja, um controle pós-transcricional. Isso ocorre em decorrência do pareamento imperfeito do miRNA à região 3' não-traduzida do mRNA-alvo. A predição das interações miRNA-mRNA foi baseada na complementaridade da seed, que corresponde ao pareamento perfeito da extremidade 5' de um miRNA ao alvo, ou seja, nas suas posições 1-8, 1-7, 2-8, e/ou 2-7. Os perfis dos miRNAs candidatos a reguladores de *jhe* (gene-alvo) foram avaliados em três diferentes pontos no desenvolvimento. Estes pontos correspondem aos maiores níveis de transcrição do gene *jhe* em operárias (L5F3), em rainhas (L5S2) e em uma fase em que os níveis eram basais para ambas (Pb). Os resultados encontrados para cada miRNA estudado podem ser encontrados no Anexo 6. Em seguida, foi calculada a correlação entre estes perfis dos miRNAs candidatos e o perfil de expressão de *jhe*, tendo sido considerados como perfis antagônicos aqueles cuja correlação foi igual o menor que -0.8 ($r \leq -0.8$). Três miRNAs apresentaram perfil antagônico em relação ao perfil de *jhe* e provavelmente estão de acordo com o que foi encontrado na abordagem computacional. Assim, a presença de sítios de ligação para os miRNAs *let-7*, *miR-263b* e *miR-989* na região 3' não-traduzida de *jhe* e os perfis de expressão destes miRNAs os apontam como fortes candidatos a reguladores do gene *jhe*. Além destes, o *miR-2769* emergiu como forte candidato a regulador de *jhe* por apresentar perfil antagônico em rainhas e operárias ($r = -0.89$ e $r = -0.91$, respectivamente) e por possivelmente estar associado à determinação de castas em *A. mellifera*, de acordo com Zayed, A. (comunicação pessoal). A Figura 21 mostra os perfis de expressão dos miRNAs *ame-let-7*, *ame-miR-263b*, *ame-miR-989* e *ame-miR-2796* e do gene-alvo *jhe*.

Figura 21: Perfis de expressão relativa do gene codificador da *esterase do hormônio juvenil* (JHE) e dos miRNAs candidatos a reguladores nas fases larvais L5F3 e L5S2 e pupal Pb de rainha e operária de *A. mellifera*. Os valores de expressão ($2^{\Delta\Delta CT}$) estão plotados no eixo y e as fases do desenvolvimento no eixo x. (A) Perfil de expressão antagonístico entre JHE e *ame-let-7* em rainhas ($r = -0.95$). (B) Perfil de expressão antagonístico entre JHE e *ame-let-7* em operárias ($r = -0.95$). (C) Perfil de expressão antagonístico entre JHE e *ame-miR-263b* em rainhas ($r = -0.9$). (D) Perfil de expressão antagonístico entre JHE e *ame-miR-263b* em operárias ($r = -0.83$). (E) Perfil de expressão antagonístico entre JHE e *ame-miR-989* em rainhas ($r = -0.97$). (F) Perfil de expressão antagonístico entre JHE e *ame-miR-989* em operárias ($r = -1$). (G) Perfil de expressão antagonístico entre JHE e *ame-miR-2796* em rainhas ($r = -0.89$). (H) Perfil de expressão antagonístico entre JHE e *ame-miR-2796* em operárias ($r = -0.91$).

4.6.2 ESTUDOS DE EXPRESSÃO DOS miRNAs EM AMOSTRAS *KNOCK-DOWN* PARA *jhe*

Como mencionado anteriormente, análises computacionais da região 3' UTR do gene codificador da esterase do hormônio juvenil, o *jhe*, sugeriram alguns miRNAs reguladores para este gene. Estudos anteriores utilizando interferência por RNA (RNAi) para *jhe*, mostraram queda nos níveis de expressão deste gene nas amostras tratadas em relação ao controle sem tratamento. As amostras tratadas foram utilizadas nesta etapa para avaliar a influência dos níveis de *jhe* na expressão dos seus possíveis reguladores. Os resultados mostraram aumento nos níveis de expressão de *ame-let-7*, *ame-miR-1*, *ame-miR-12*, *ame-mi-34*, *ame-miR-278* e *ame-miR-989* nas amostras tratadas em relação ao controle (Figura 22). Contrariamente, o *ame-miR-263b* (Figura 22) mostrou queda nos níveis de expressão nas amostras tratadas com *dsjhe*, e para o *ame-miR-8* e *ame-miR-2796* os níveis encontrados são praticamente os mesmos para os dois grupos de amostras (Figura 22). Foi encontrada diferença estatística entre controle e tratamento para *ame-miR-1*, segundo teste Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Figura 22: Quantificação relativa de microRNAs *ame-let-7*; *ame-miR-1*; *ame-miR-12*; *ame-miR-34*; *ame-miR-278*; *ame-miR-989*; *ame-miR-2796*; *ame-miR-8* e *ame-miR-263b* em amostra tratadas com dsjhe (n=4) e controle (n=4). Os valores obtidos para o pequeno RNA nuclear U6 foram utilizados para normalização. Os dados de cada grupo correspondem à expressão da média das amostras, e as linhas representam o desvio padrão das amostras, obtido de acordo com o que foi proposto por Livak & Schmittgen (2001). Asteriscos representam diferença estatística significativa entre amostras tratadas com dsjhe e controle (Teste Mann-Whitney $p < 0,05$).

4.7 SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA DOS PEQUENOS RNAs

4.7.1 CARACTERIZAÇÃO DAS BIBLIOTECAS OBTIDAS ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DE PEQUENOS RNAs

Visando um estudo mais aprofundado da regulação do gene codificador da esterase do hormônio juvenil, enviamos amostras resultantes do experimento de silenciamento de *jhe* (descrito na seção 4.4.4 dos RESULTADOS) para uma *facility* na Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill, EUA. Moléculas de RNAs pequenos (RNAs menores que 200 nt, faixa onde se encontram os microRNAs precursores ou maduros) foram isoladas de três amostras extraídas de indivíduos tratados com *dsjhe* e três amostras extraídas de indivíduos controles foram sequenciadas na plataforma Illumina. Cada amostra (grupo “tratamento” e “controle”) foi formada por um *pool* de três operárias na fase L5-S, obtidas como descrito na seção 3.6.7.1. Os arquivos contendo o resultado do sequenciamento foram analisados para caracterizar as bibliotecas resultantes das seis amostras e identificar os miRNAs diferencialmente expressos entre os dois grupos amostrais.

Após a remoção dos adaptadores e filtragem das *reads* de baixa qualidade, foram consideradas para as etapas seguintes apenas as *reads* que apresentavam um comprimento maior ou igual a 10 bases. A Figura 23 mostra a distribuição do comprimento de *reads* para as bibliotecas “tratamento” e “controles”. Ao comparar as distribuições encontradas para as bibliotecas “tratadas” e “controles”, foram encontradas algumas diferenças. A proporção de *reads* que apresenta de 19 a 24 nt é em torno de 9% na bibliotecas “tratadas” e 25% nas bibliotecas “controle”. O inverso foi encontrado para a faixa de 10 a 18 nt. Aproximadamente 68% das *reads* das bibliotecas “tratamento” e 6% das *reads* das bibliotecas “controle” apresentam de 10 a 18 nt.

As *reads* que compõem as bibliotecas foram mapeadas contra um banco de dados de sequências expressas. A análise desse mapeamento permitiu identificar quais tipos de transcritos compõem cada uma das bibliotecas. A Tabela 9 apresenta o número de *reads* de cada biblioteca e os valores de *reads* unicamente mapeadas e a Figura 24 apresenta a porcentagem de *reads* mapeadas em cada entidade genética que compõe o banco de dados. Novamente foram encontradas proporções diferentes entre as

bibliotecas “tratamento” e “controle”. As bibliotecas “controle” apresentam maior proporção de miRNAs (5%) e de rRNA (47%) em relação as bibliotecas “tratamento” (2% e 17% para miRNA e rRNA, respectivamente). Além disso, as bibliotecas “tratamento” apresentam aproximadamente três vezes mais *reads* provenientes de genes codificadores (30%) do que as bibliotecas “controle” (9%).

4.7.2. IDENTIFICAÇÃO DOS miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NAS BIBLIOTECAS “TRATAMENTO” E “CONTROLE”

Após a caracterização das bibliotecas, foram selecionadas apenas as *reads* que mapearam em sequências de miRNAs de *Apis mellifera*. Assim, foram identificados os miRNAs expressos nas bibliotecas e a o cálculo da expressão digital foi obtida através da contagem do número de *reads* mapeadas em cada um dos miRNAs de *A. mellifera*. Essa contagem foi normalizada pelo tamanho das bibliotecas, de acordo com a normalização sugerida por Mortazavi *et al.* (2008).

Uma tabela relacionando a expressão digital de cada miRNA em cada biblioteca serviu de entrada para o pacote estatístico edgeR. O objetivo da análise foi identificar os miRNAs diferencialmente expressos nas bibliotecas “tratamento” e “controle”. Foram identificados 14 miRNAs afetados pelo silenciamento de *jhe* (Tabela 10). Os miRNAs *ame-miR-3728*, *ame-miR-3727*, *ame-miR-3759*, *ame-miR-3793*, *ame-miR-3720*, *ame-miR-3477* e *ame-miR-316* apresentaram maior expressão nas bibliotecas “tratamento” e os miRNAs *ame-miR-317*, *ame-miR-3719*, *ame-miR-996*, *ame-miR-100*, *ame-miR-13b*, *ame-miR-306* e *ame-miR-263b* apresentaram menores níveis de expressão nas bibliotecas “tratamento”. Dentre os 14 miRNAs diferencialmente expressos, quatro já foram descritos em outras espécies e as informações estão listadas na Tabela 11.

Com o objetivo de identificar os processos biológicos sob regulação dos miRNAs afetados pelo silenciamento da *jhe*, seguimos os seguintes passos. Foi realizada uma predição dos potenciais genes-alvo dos 14 miRNAs diferencialmente expressos nas bibliotecas “tratamento” e “controle”. Foram encontradas 1.011 interações putativas entre os 14 miRNAs diferencialmente expressos e todos os genes preditos para *A. mellifera*. Em seguida, os ortólogos de *D. melanogaster* desses genes candidatos a alvo foram recuperados. Das 1.011 interações, 562 envolvem genes com ortólogos conhecidos em *D. melanogaster*. Esse passo que recupera os ortólogos da mosca-das-frutas é essencial

para a identificação dos processos biológicos dos quais os genes candidatos a alvo fazem parte (usando os termos de GO), uma vez que essa associação ainda não foi estabelecida para as abelhas *A. mellifera*. As Tabelas 12 e 13 apresentam os processos biológicos associados aos genes candidatos a alvo dos miRNAs mais expressos e menos expressos nas bibliotecas “tratamento” em relação as “controle”, respectivamente.

(A)

(B)

Figura 23: Número de *reads* por comprimento para cada uma das bibliotecas. (A) das amostras tratadas com dsRNA para o gene da esterase do hormônio juvenil (*dsjhe*) e (B) das amostras controle utilizadas nas análise para o tratamento com *dsjhe*. C1: amostra controle número1; C2: amostra controle número 2; C3: amostra controle número 3; T1: amostra número 1 tratada com *dsjhe*; T2: amostra número2 tratada com *dsjhe*; T3: amostra número 3 tratada com *dsjhe*.

Tabela 9: Número de *reads* geradas pelo sequenciamento em larga escala de amostras de operárias de *A. mellifera* tratadas com RNA de fita dupla para o gene da esterase do hormônio juvenil, *jhe* e amostras controle que não receberam nenhum dsRNA. T1, T2, T3: tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente; C1, C2, C3: controles 1, 2 e 3, respectivamente.

AMOSTRA	NÚMERO TOTAL DE <i>READS</i>	NÚMERO DE <i>READS</i> MAPEADAS
T1	24.472.891	1.556.321
T2	26.152.456	1.448.677
T3	26.332.658	1.799.089
C1	29.198.697	2.881.252
C2	28.431.810	2.976.428
C3	6.196.478	3.026.035

Figura 24: Gráficos mostrando a composição das bibliotecas de pequenos RNAs obtidas pelo sequenciamento em larga escala de amostras de operárias em fase L5-S silenciadas com *dsjhe* e operárias-controle. (A) Porcentagem da composição das bibliotecas “Tratamento”. (B) Porcentagem da composição das bibliotecas “Controle”.

Tabela 10: MicroRNAs encontrados como diferencialmente expressos entre as amostras tratadas com dsRNA para o gene da esterase do hormônio juvenil (*dsjhe*) e controle de acordo com sequenciamento em larga escala (RNA-Seq). *LogFC* (*log fold change*): valores positivos indicam maior expressão nas bibliotecas “Tratamento” em relação as bibliotecas “Controle”; valores negativos indicam menor expressão nas bibliotecas “Tratamento” em relação as bibliotecas “Controle”.

miRNAs	logFC	PValue	FDR
ame-miR-3728	5.64	2.07E-35	3.48E-33
ame-miR-3727	4.88	3.28E-33	2.75E-31
ame-miR-3759	3.94	7.82E-23	4.38E-21
ame-miR-3793	3.98	1.50E-17	6.29E-16
ame-miR-3720	2.07	6.57E-15	2.21E-13
ame-miR-3477	1.66	4.66E-09	1.31E-07
ame-miR-316	1.58	1.68E-07	4.04E-06
ame-miR-317	-1.48	2.54E-07	5.32E-06
ame-miR-3719	-1.23	3.73E-05	6.95E-04
ame-miR-996	1.01	6.54E-05	1.10E-03
ame-miR-100	-1.94	1.76E-04	2.69E-03
ame-miR-13b	-0.82	6.82E-04	9.54E-03
ame-miR-306	-0.76	9.70E-04	1.25E-02
ame-miR-263b	-1.22	9.71	1.00E-01

Tabela 11: MicroRNAs encontrados como diferencialmente expressos entre as amostras tratadas com dsRNA para o gene da esterase do hormônio juvenil (*dsjhe*) e controle de acordo com sequenciamento em larga escala (RNA-Seq), para os quais temos disponível na literatura função atribuída ou informação sobre níveis de expressão.

miRNA	Função/Expressão	PubMed ID
<i>miR-100</i>	Envolvido na proliferação celular relacionada ao câncer em mamíferos	21109969; 20421599; 19396866
<i>miR-13b</i>	Expresso em larvas <i>Bombyx mori</i> , possivelmente envolvido com apoptose em <i>Drosophila</i>	18507836; 14691535
<i>miR-306</i>	Preferencialmente e abundantemente expresso em adultos de <i>Bombyx mori</i>	20089182
<i>miR-263b</i>	Envolvido na regulação negativa de apoptose em <i>Bombyx mori</i>	20563308; 20122259

Tabela 12: Processos biológicos, obtidos por análises de GO (*Gene Ontology*), nos quais os genes candidatos a alvo dos miRNAs regulados negativamente nas amostras tratadas com *dsjhe* (n=3) em relação às amostras controle (n=3) estão relacionados, de acordo com o sequenciamento em larga escala.

GO ID	Função Biológica	p-val
65007	Regulação biológica	1.19E-20
50789	Regulação de processos biológicos	2.77E-20
50794	Regulação de processos celulares	1.61E-18
60255	Regulação do processo metabólico de macromoléculas	5.52E-16
19222	Regulação do processo metabólico	1.02E-15
80090	Regulação do processo metabólico primário	1.46E-15
10468	Regulação da expressão gênica	3.06E-15
48869	Processo celular de desenvolvimento	3.31E-15
9653	Morfogênese anatômica de estruturas	4.94E-15
35107	Morfogênese de apêndices	8.79E-15
19219	Regulação do processo metabólico de nucleobase, nucleosídeo, nucleotídeo e ácido nucléico	9.27E-15
51171	Regulação do processo metabólico de compostos nitrogenados	1.04E-14
48736	Desenvolvimento de apêndices	1.25E-14
31323	Regulação do processo metabólico celular	1.72E-14
48731	Desenvolvimento de sistemas	4.20E-14
35114	Morfogênese de apêndices derivados de discos imaginais	4.45E-14
30154	Diferenciação celular	5.46E-14
48737	Desenvolvimento de apêndices derivados de discos imaginais	6.26E-14
35120	Morfogênese pós-embrionária de apêndices	8.89E-14
51252	Regulação do processo metabólico de RNA	1.78E-13

Tabela 13: Processos biológicos, obtidos por análises de GO (*Gene Ontology*), nos quais os genes candidatos a alvo dos miRNAs regulados positivamente nas amostras tratadas com *dsjhe* (n=3) em relação às amostras controle (n=3) estão relacionados, de acordo com o sequenciamento em larga escala.

GO ID	Função Biológica	p-val
50789	Regulação de processos biológicos	3.04E-08
50794	Regulação de processos celulares	4.55E-08
51301	Divisão celular	2.27E-07
32501	Processos multicelulares do organismo	2.92E-07
65007	Regulação biológica	3.12E-07
7275	Desenvolvimento multicelular do organismo	5.61E-07
48646	Formação de estrutura anatômica envolvida na morfogênese	5.76E-07
9790	Desenvolvimento embrionário	1.88E-06
7548	Diferenciação do sexo	1.95E-06
48477	Oogenese	2.07E-06
32502	Processos de desenvolvimento	2.27E-06
7292	Geração do gameta feminino	2.49E-06
35215	Desenvolvimento do disco genital	2.78E-06
7293	Formação da câmara do ovo derivada do germário	3.22E-06
8356	Divisão celular assimétrica	3.63E-06
7276	Geração de gameta	3.71E-06
3	Reprodução	4.32E-06
22414	Processo reprodutivo	4.32E-06
19953	Reprodução sexual	6.62E-06
32504	Reprodução multicelular do organismo	7.53E-06

5. DISCUSSÃO

Ao desenvolver este projeto demonstramos que inúmeros fatores ativados pela alteração da nutrição durante estágios iniciais do desenvolvimento larval coordenam a manifestação do dimorfismo de castas em *A. mellifera*, neste caso específico, a diferenciação em operárias. Nossos resultados permitiram associar a análise da expressão gênica diferencial com a determinação das castas em abelhas e propor uma rede de regulação destes eventos que, ainda que parcialmente, esclarecem aspectos importantes do dimorfismo das castas.

5.1 GENES ESPECIALMENTE ENVOLVIDOS NA DETERMINAÇÃO DE CASTAS

5.1.1 *cryptocephal* - *crc*

Assim como observado em outras espécies de insetos, por exemplo, em *D. melanogaster* (Hewes *et al.*, 2000), *crc* é expresso durante todo o desenvolvimento pré-imaginal de *A. mellifera*. Os níveis de expressão de *crc* encontram-se baixos e muito semelhantes em rainhas e operárias até L3. A partir de L4, ocorrem diferenças nos níveis de expressão deste gene, os quais são mais elevados em operárias. O momento crítico da determinação de castas ocorre entre o terceiro e o quarto estágio larval (Goewie, 1978; Nijhout, 1994) o que pode estar relacionado com o fato de encontrarmos níveis de *crc* semelhantes em rainhas e operárias em fase anterior a este período. Após L4, o destino larval já está determinado e consequentemente cascatas gênicas distintas são disparadas de acordo com a casta que a larva irá se diferenciar. O gene *crc* apresenta um padrão de expressão específico de operárias, que é coincidente, em L4, com os dados descritos por Barchuk e colaboradores (2007). Verificamos também que em operárias esta expressão específica se estende até a vida adulta, provavelmente mantendo o estado de operária.

Os níveis de transcritos de *crc* parecem ter uma correspondência, tanto em rainhas como em operárias, com o primeiro pico de ecdisteróides encontrado em abelhas *A. mellifera*. Os títulos deste hormônio começam a se elevar no início do quinto estágio larval (L5F) e culminam em L5S2 em ambas as castas (Feldlaufer *et al.*, 1985; Rachinsky *et al.*, 1990). Durante este período, os níveis de *crc* começam a se elevar em rainhas e operárias, embora não sejam estes os valores máximos em cada

casta. A partir daí, não é possível estabelecer uma relação clara entre os níveis de expressão deste e os títulos de ecdisteróides, pois durante os maiores níveis de expressão de *crc* nas castas (fase PP2 em rainhas e PP3 em operárias), encontram-se os níveis mais baixos de ecdisteróides (Feldlaufer *et al.*, 1985; Rachinsky *et al.*, 1990, Zufelato *et al.*, 2000). Nestas fases, também se observam baixos títulos de HJ (Rembold, 1987; Rachinsky *et al.*, 1990) o que pode estar contribuindo, juntamente com os títulos baixos de ecdisteróides, para o incremento nos níveis de transcrição de *crc*. Os títulos de ecdisteróides após as fases PP2 e PP3 aumentam, atingindo seu máximo em Pdp. A partir de Pb os títulos destes hormônios começam a cair e permanecem relativamente baixos até o final do estágio pupal (Rembold, 1987). De maneira oposta, os níveis de *crc* começam cair gradativamente a partir de PP, atingindo um mínimo em Pdp e em seguida, subindo novamente para atingir novos picos de expressão em rainhas Pbd e operárias recém-emergidas (RN). A partir destas informações podemos sugerir que os ecdisteróides atuam de maneira diferente dependendo da fase de desenvolvimento em que as abelhas se encontram. Entre as fases L4 e L5S, os ecdisteróides atuam estimulando a transcrição de *crc* e a partir de PP agem de maneira oposta, indicando que estes hormônios provavelmente não atuam diretamente sobre a transcrição de *crc*, como poderíamos esperar, já que este gene está envolvido na muda e metamorfose (Hewes *et al.*, 2000), mas provavelmente em genes iniciais (*early genes*) e genes tardios (*late genes*) da cascata de expressão gênica estimulada por estes hormônios (Burtis *et al.* 1990; Segraves & Hogness 1990; DiBello *et al.* 1991) que irão de alguma forma alterar os níveis de expressão de *crc*, dependendo da fase do desenvolvimento.

Os principais picos de expressão deste gene encontram-se nos estágios pré-metamórficos, o que constitui uma indicação, que assim como em *Drosophila*, ele atua nos processos de muda e metamorfose (Hewes *et al.*, 2000). Podemos observar que o pico de expressão mais importante encontrado em rainhas é adiantado em relação ao maior pico de expressão encontrado em operárias, isto pode estar relacionado ao fato de que rainhas e operárias apresentam diferenças no *timing* do desenvolvimento (Michelette & Soares, 1993). Adicionalmente, os níveis alcançados pelo pico de expressão de *crc* em operárias são bem mais elevados que aqueles observados para o correspondente em rainhas. Além disto, a diferença estatística encontrada na maioria das fases estudadas, quando se comparam os níveis de transcritos deste gene entre as castas, fornece mais uma forte indicação do

importante envolvimento deste gene no processo de desenvolvimento das castas em *A. mellifera*, como proposto por Barchuk *et al.* (2007).

5.1.2 *retinoid- and fatty acid-binding protein - RfaBp*

Semelhante ao que foi observado para o gene *crc*, os perfis de expressão encontrado para *RfaBp*, em rainhas e operárias de *A. mellifera*, apresentam níveis praticamente basais desde embrião (ovo) até o terceiro estágio larval (L3). A partir de L3 até L5F3 os níveis de expressão do gene aumentam gradualmente em ambas as castas, atingindo o maior pico de expressão em operárias L5F3, dado concordante com o descrito por Guidugli-Lazzarini (2006), e em rainhas L5S3. A proteína RFABP tem a capacidade de transportar lipídios (Van Heusden & Law, 1989) inclusive o HJ (Trowell, 1992; Engelmann & Mala, 2005), portanto o gene codificador desta proteína pode estar atuando como um gene tardio na cascata de expressão gênica desencadeada pelo hormônio. Em rainhas os níveis de HJ e ecdisteróides encontrados na fase L5S3 são comparativamente elevados, sugerindo uma ação sinérgica sobre os níveis de expressão de *RfaBp*. A ação dos ecdisteróides aumentando os níveis de expressão do gene *lp*, já foi descrita em *Aedes aegypti* (Sun *et al.*, 2000).

Em *Drosophila*, o gene *RfaBg*, homólogo ao *RfaBp* de *A. mellifera*, apresenta semelhanças com os genes codificadores das proteínas lipoforina, apolipoforina e vitelogenina (Kutty *et al.*, 1996). A vitelogenina, uma importante proteína da reprodução, inclusive em *A. mellifera*, requer um pulso de HJ, juntamente com declínio nos níveis de ecdisteróides para sua transcrição (Shu *et al.*, 1997; Barchuk *et al.*, 2002). De forma semelhante à vitelogenina, a expressão do gene *RfaBp* durante a fase L5S3 em rainhas, pode constituir um importante fator que contribuirá para a reprodução, um dos principais processos que distinguem rainhas de operárias de abelhas *A. mellifera* (Wilson, 1971; Michener, 1974).

Nota-se que os principais picos de expressão de *RfaBp*, nas duas castas, ocorrem em um período pré-metamórfico. A metamorfose em insetos ocorre através de profundas alterações morfológicas e fisiológicas, que geralmente influenciam o conteúdo protéico encontrado na hemolinfa. Durante a fase larval, proteínas de estocagem são acumuladas na hemolinfa (Shipman *et al.*, 1987) e em seguida estocadas para serem utilizadas posteriormente na produção de outras proteínas próprias de adultos

(Levenbook & Bauer, 1984). Desta forma, como sugerido por Guidugli-Lazzarini (2006), altos níveis de *RfaBp* em L5F3 (em operárias) e L5S2 (em rainhas) podem indicar um envolvimento deste gene no fornecimento de nutrientes para a fase seguinte, atuando no transporte de lipídios ou como fonte destes compostos.

Observamos semelhança entre os perfis de *RfaBp* de rainhas e operárias, mas podemos notar o adiantamento do principal pico de expressão do gene em operárias, assim como níveis significativamente mais elevados nesta casta em fases posteriores ao maior pico de expressão do gene encontrado em rainhas. Isto provavelmente se deve a diferentes fatores determinados em fase anterior, principalmente em razão da alimentação diferencial. Em operárias de *A. mellifera* adultas, a ingestão de alimentos com composição protéica distinta promove diferenças tanto na transcrição quanto na tradução de *RfaBp* (Cunha *et al.*, 2005). Assim podemos sugerir que a alimentação diferencial de rainhas e operárias durante o período larval pode ser capaz de determinar diferenças na expressão gênica que determinam o destino larval e que podem perdurar por toda a vida da abelha.

5.1.3 *ultraspiracle* - *usp*

Os perfis de *usp* encontrados em rainhas e operárias mostram grande semelhança, exceto durante parte do quinto estágio larval e final da fase pré-pupal. A partir de L5F2 até L5S1, os níveis deste gene são significativamente mais elevados em operárias que em rainhas. Isto pode refletir a passagem dos indivíduos pelo período crítico da determinação de castas (Goewie, 1978; Nijhout, 1994), após o qual cascatas de expressão gênica distintas são estimuladas nas diferentes castas (Barchuk, *et al.*, 2007). Assim como ocorre com a expressão de *crc*, os níveis de *usp* durante o quinto estágio larval, tanto em rainhas quanto em operárias, parecem apresentar correspondência com o primeiro pico de ecdisteróides encontrado em *A. mellifera*. O mais importante pico de expressão de *usp* é encontrado em operárias PP3 e importantes níveis deste gene são encontrado em rainhas nas fases L5S2 e PP2. Os níveis de *usp* encontrados em operárias PP3 podem estar relacionados com picos anteriores dos títulos de ecdisteróides e HJ. O que pode sugerir que pulsos destes hormônios, essenciais para a muda e metamorfose (Nijhout, 1994; Riddiford, 1994; Lan *et al.*, 1999), são também requeridos para um aumento na expressão do gene durante esta fase pré-metamórfica, em razão do

papel fundamental exercido por este gene na integração de múltiplos caminhos de sinalização (Hall & Thummel, 1998; Sasorith *et al.*, 2002). Como *usp* provavelmente atua como receptor dos dois hormônios morfogenéticos (Yao *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 2002; Barchuk *et al.*, 2004; Iwema *et al.*, 2007), podemos sugerir que o mesmo pode agir como um gene tardio nas diferentes redes de expressão gênica estimulada por eles. A diferença encontrada entre rainhas e operárias em relação aos níveis e à fase em que ocorrem os maiores níveis de transcrição de *usp* pode estar relacionada aos diferentes títulos de HJ apresentado por ambas e também pode ser constituída por diferentes fatores relacionados à expressão gênica diferencial determinada no período crítico de determinação de castas. Após PP2 em rainhas e PP3 em operárias, os níveis de expressão do gene sofrem uma queda e voltam a subir no final do estágio pupal em ambas, em uma proporção semelhante, o que mais uma vez reflete sua função essencial no desenvolvimento e metamorfose em insetos (Sasorith *et al.*, 2002). Esta expressão é condizente com sua função como parceiro heterodimérico no receptor de ecdisona (Oro *et al.*, 1990; Yao *et al.*, 1992, 1993). Os níveis de *usp* em rainhas e operárias, em queda desde o início da fase pupal, começam a se elevar no final desta fase, mais uma vez em um período pré-metamórfico, indicando novamente seu papel essencial neste processo. Níveis elevados de *usp* no final do estágio pupal foram também observados *Melipona scutellaris* (Teles *et al.*, 2007).

Coincidentemente, em operárias o principal pico de expressão de *usp* ocorre na mesma fase de desenvolvimento daquele encontrado para *crc*, e os níveis de ambos nas fases subsequentes são correspondentes. Foram encontrados na sequência de *crc* motivos de ligação a *usp*, sugerindo uma possível relação entre estes genes, com *usp* atuando na ativação da transcrição de *crc* (Barchuk *et al.*, 2007), fato corroborado pela semelhança entre seus níveis de expressão. O que pode indicar a participação destes em uma rede de expressão gênica que favoreceria o desenvolvimento de operárias, visto que, mais claramente em *crc*, os níveis apresentados pelas castas são significativamente distintos principalmente nas fases posteriores ao período crítico de determinação de castas.

5.1.4 esterase do hormônio juvenil - *jhe*

O perfil de expressão de *jhe* durante o desenvolvimento de rainhas e operárias de *A. mellifera* apresenta níveis praticamente basais durante a maior parte do desenvolvimento pós-embrionário, exceto

pelo período entre o início do quinto estágio larval e o início da fase pré-pupal. Em operárias, os níveis de transcritos de *jhe* são baixos desde a fase embrionária até L4, quando começam a se elevar, resultado observado também por outros autores (Mackert *et al.*, 2008). Coincidentemente, é nesta fase que, após um pequeno pulso, os níveis de HJ começam a cair nesta casta (Rembold, 1987; Bloch *et al.*, 2002; Elekonich *et al.* 2003). Podemos então relacionar esta queda nos títulos de HJ ao aumento nos níveis de expressão do gene codificador da principal enzima de degradação deste hormônio, possivelmente estimulado por este pequeno pulso de HJ. Os níveis de transcritos de *jhe* continuam em ascensão em operárias até o final da fase L5F, quando atingem seus maiores níveis em F3. Após este estágio, começam a diminuir, voltando a níveis basais a partir de PP1, resultado também encontrado por outros autores (Mackert *et al.*, 2008) e em outras espécies como *Aedes aegypti* (Bai *et al.*, 2007), *Choristoneura fumiferana* (Feng *et al.*, 1999) e *Bombyx mori* (Hirai *et al.* 2002). Durante o período em que os níveis de expressão de *jhe* são elevados em operárias, podemos sugerir que os mesmos estejam inibindo a ação do HJ, que se encontra em níveis baixos nesta casta (Rembold, 1987; Kimura & Truman, 1990; Schmidt-Capella & Hartfelder, 1998, 2002). De acordo com dados disponíveis na literatura, podemos também sugerir uma relação inversa entre os títulos de HJ (Rembold, 1987; Elekonich *et al.*, 2003) e sua principal enzima de degradação, a JHE, durante o período acima descrito e, além disto, os níveis baixos a partir de PP1 parecem permitir um aumento nos níveis de HJ encontrado no estágio pré-pupal (Rembold, 1987; Elekonich *et al.*, 2003). Durante o estágio pupal, operárias apresentam níveis basais de *jhe*. Nesta fase é sugerido que os *corpora allata*, órgãos de síntese do HJ, cessam a produção deste hormônio (Rachinsky *et al.*, 1990) o que pode ser observado nos resultados encontrados neste trabalho para os níveis de expressão da enzima metil-farnesoato-epoxidase (MFE) em rainhas e operárias em Pb, portanto o produto de *jhe* não seria necessário nesta fase do desenvolvimento, já que o período crítico de determinação de castas já aconteceu e, além disto, a próxima muda que o inseto irá sofrer é metamórfica, ou seja controlada pelos ecdisteróides. Padrões semelhantes de expressão de *jhe*, com níveis basais nos estágios pré-pupal e pupal, foram também encontrados em *Bombyx mori* (Kinjoh *et al.*, 2007). Ainda em operárias, no final do estágio pupal, os níveis de transcritos *jhe* começam a se elevar e apresentam um pequeno pico de expressão, embora não tão elevado quanto aquele encontrado em L5F3, sendo coincidente com um pequeno e rápido aumento nos níveis de HJ. Esta

alteração hormonal ainda não está totalmente esclarecida, mas indica que HJ deve ser removido neste momento nesta casta, o que não ocorre em rainhas.

Em rainhas podemos observar níveis de expressão baixos para *jhe* desde a fase embrionária até o final do 5º estágio larval, em L5S1. Em L5S2 há um aumento significativo nos níveis de expressão deste gene, que atingem seu máximo durante esta fase, em que o HJ já desempenhou parte do seu papel, disparando cascatas de expressão gênica responsáveis pelas características próprias de rainhas (Barchuk *et al.*, 2007), além das mudanças morfológica ocasionadas por este hormônio (Rembold, 1987; Kimura & Truman, 1990) entre elas a manutenção do número de ovários (Schmidt-Capella & Hartfelder, 1998, 2002). Após L5S2, a quantidade de transcritos *jhe* cai e atinge novamente níveis basais em PP2, mantendo-se assim até a emergência do adulto. Nesta casta, os maiores títulos de HJ são observados entre L3 e L4 (Rachinsky *et al.*, 1990; Bloch *et al.*, 2002; Elekonich *et al.*, 2003), que como descrito anteriormente tem sua síntese estimulada pelo sistema insulina/IGF/TOR/Egfr iniciado, por sua vez, pelo estímulo nutricional diferencial (Colombani *et al.*, 2003; Oldham & Hafen, 2003; Barchuk *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2007; Kamakura, 2011). Altos títulos de HJ (Bloch *et al.*, 2002; Elekonich *et al.*, 2003) juntamente com a baixa expressão de *jhe* observada neste trabalho, sugerem que os níveis de síntese deste hormônio, realizada por outras enzimas (Goldstein & Brown, 1990; Bellés *et al.*, 2005), devem estar verdadeiramente elevados, determinando que os indivíduos se tornem rainhas, quando apresentam tal situação. De acordo com resultados encontrados, vimos que a enzima FME, a última no processo de síntese de HJ, apresenta níveis significativamente mais altos em rainhas nas fases em que foi estudada, constituindo mais uma indicação de que os níveis de HJ, fundamentais na determinação de castas, são determinados tanto pela sua síntese como pela sua degradação. Como mencionado acima, o pico de expressão de *jhe* em rainhas é encontrado em L5S2, fase em que os títulos de HJ encontram-se elevados, mas não na mesma proporção em que são encontrados em L3 (Bloch *et al.*, 2002; Elekonich *et al.*, 2003), sugerindo, adicionalmente, que o fator responsável por estes níveis seja provavelmente sua degradação pela enzima específica, a JHE. O que podemos concluir após análise destes resultados é que a degradação do hormônio juvenil pela sua enzima específica desempenha um papel tão importante quanto sua síntese e que um balanço entre eles em momentos precisos do desenvolvimento irá culminar na determinação de castas em *A. mellifera*,

sugerindo, portanto, que as enzimas envolvidas no balanço dos níveis de HJ, sejam também importantes neste processo.

Podemos concluir que a expressão individual destes genes é coerente com o papel atribuído a eles no processo de determinação e desenvolvimento das castas de *A. mellifera*.

5.2 EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL NAS DIFERENTES CASTAS DE ABELHAS

Apis mellifera

Muitos insetos apresentam polifenismo ou morfologias alternativas que são fundamentadas na expressão gênica diferencial ao invés de polimorfismo genético. Rainhas e operárias, as formas alternativas de fêmeas de *A. mellifera*, representam um dos exemplos mais conhecidos de polifenismo (Evans & Wheeler, 1999). Mas, apesar dos grandes esforços, ainda há muito a se descobrir sobre os mecanismos moleculares responsáveis por este processo.

A determinação de castas em *A. mellifera* envolve ativação específica de genes em operárias, assim como em rainhas. Além disto, há um maior número de genes preferencialmente expressos em operárias durante a fase larval L4 em relação ao que foi encontrado para rainhas (Evans & Wheeler, 1999). No entanto, este resultado difere do que foi encontrado em outro estudo, no qual foi observado maior número de genes preferencialmente expressos em rainhas na fase L4 (Barchuk *et al.*, 2007). Tal fato pode estar relacionado com a utilização de microarranjos com número reduzido de genes, por estes últimos autores, mas mesmo assim os resultados aqui obtido com relação aos genes diferencialmente expressos durante a determinação de castas apresentam semelhanças com aqueles obtidos por Barchuk *et al.* (2007). Entre os genes diferencialmente expressos entre as castas, podemos destacar 21 genes em comum, onze preferencialmente expressos em operárias, oito preferencialmente expressos em rainhas e dois que são preferencialmente expressos em uma das duas castas de acordo com o trabalho em questão (ver Anexo7). Sendo que, vários destes genes exercem funções biológicas importantes durante o desenvolvimento de rainhas e operárias em *A. mellifera*, como neurogênese (Witthöft, 19967; Barchuk *et al.*, 2007), regulação da apoptose (Schmidt-Capella & Hartfelder, 1998; 2002), regulação da via de insulina (Patel *et al.*, 2007). Isto reforça a ideia de cascatas gênicas

diferenciais determinantes do destino larval, pois conjuntamente os resultados apontam diferenças entre as castas com relação aos níveis de expressão de genes específicos.

Análises de *Gene Ontology* (GO) mostraram que os genes diferencialmente expressos encontrados nos *microarrays* pertencem a várias categorias de processos biológicos. Sendo que os genes preferencialmente expressos em operárias estão mais representados nas seguintes categorias: Resposta imune, Óxido-redução, crescimento e proliferação celular (*epidermal growth factor – egf*), Homeostase, Morte celular, Processos de desenvolvimento, Metamorfose, Neurogênese. Os genes preferencialmente expressos em rainhas estão envolvidos principalmente na Respiração celular, Morfogênese, Oxidação Organização e modificação da cromatina, Adesão celular e Localização celular. Foram encontradas ainda categorias que evidenciam processos biológicos compartilhados tanto por rainhas quanto por operárias, entre elas podemos citar: Reprodução, Regulação da biossíntese, Regulação da transcrição e Transporte celular, o que não significa que elas compartilham genes diferencialmente expressos, mas sim que diferentes genes encontrados em cada uma das castas participam do mesmo processo biológico, ocasionando diferenças em relação a uma mesma característica.

Como mencionado, os genes preferencialmente expressos em operárias podem ser enquadrados em várias categorias de processos biológicos, mas em sua maioria eles pertencem a categorias relacionadas à resposta imune. Estudos demonstraram que abelhas em segundo estágio larval são mais suscetíveis à infecção que abelhas em fases posteriores sugerindo assim, que elas se tornam progressivamente mais resistentes com o tempo. Provavelmente, em razão do aumento da presença de fatores relacionados ao sistema imune, principalmente o sistema inato, como por exemplo, a lisozima e peptídeos antimicrobianos (Chan *et al.*, 2009). Estes autores também sugerem que em abelhas a imunidade social é favorecida, pelo fato de que elas expressam menos genes relacionados à resposta imune que insetos solitários (conceito que poderá ser alterado no processo de re-anotação do genoma de *A. mellifera*). Isto pode em parte explicar a expressão preferencial de genes relacionado com este processo em operárias, que formam a maioria quase absoluta de indivíduos numa colônia.

Entre os demais processos biológicos relacionados aos genes preferencialmente em operárias podemos destacar a apoptose. Durante a determinação de operárias, o processo de apoptose ocorre principalmente nos ovários (Schmidt Capela & Hartfelder, 2002), importante órgão que assinala uma

das diferenças entre rainhas e operárias. Outro processo biológico, a neurogênese, é de crucial importância no desenvolvimento das operárias, visto que estas necessitam desenvolver habilidades de memória e aprendizagem. O desenvolvimento de tais habilidades está estreitamente relacionado a uma estrutura cerebral altamente desenvolvida, os corpos cogumelares (*mushroom bodies* – MB), que não apresentam tal nível de desenvolvimento em rainhas (Takeuchi *et al.*, 2002; Malun *et al.*, 2002).

Inesperadamente, dentre os processos biológicos, as categorias mais representativas em operárias estão relacionadas com o crescimento, tamanho celular e *egf*. Genes envolvidos com crescimento (genes fisiometabólicos) foram anteriormente descritos como preferencialmente expressos em rainhas (Barchuk *et al.*, 2007). As rainhas são visivelmente maiores que as operárias principalmente na região abdominal, por apresentar os ovários altamente desenvolvidos. Além disto, Kamakura (2011) afirma que a *royalactin*, em *A. mellifera*, exerce efeito semelhante ao *egf*, lembrando que *royalactin* é a principal efetora no processo de desenvolvimento de rainhas.

A análise global da expressão gênica em ambas as castas de abelhas *A. mellifera* sugere a existência de redes próprias implicadas no desenvolvimento de rainhas e operárias. Como vimos o número de genes preferencialmente expressos em operárias é quase duas vezes maior do que em rainhas, dado que indica a existência de redes gênicas mais complexas na determinação da casta operária como sugerido por outros autores (Barchuk *et al.*, 2007) e também a presença não apenas de um único gene, mais sim de um grupo de genes, como principais responsáveis pelo processo de determinação de castas em *A. mellifera*.

5.3 EFEITOS DO NOCAUTE DOS GENES ESPECIALMENTE ENVOLVIDOS NA DETERMINAÇÃO DE CASTAS SOBRE DIFERENTES PROCESSOS BIOLÓGICOS

5.3.1 *cryptocephal* - *crc*

O tratamento com RNA de fita dupla para o gene *cryptocephal* em experimentos de interferência por RNA em abelhas mostrou apenas uma discreta diminuição nos níveis do gene alvo. Esta discreta diminuição (20%) dos transcritos de *crc* pode estar relacionada com o tempo entre o

tratamento (L2) e a coleta dos indivíduos (L5S1), uma vez que pode ter havido uma queda significativa nos níveis de transcritos de *crc* logo após o tratamento que de alguma forma foi restabelecido posteriormente. Além disto, *crc* tem função nos processos de eversão da cabeça (Fristrom, 1965) e desenvolvimento de pernas (Kojima, 2004), eventos observados em fase posterior àquela em que os indivíduos foram coletados, o que pode ser o fator pelo qual não foram observadas modificações morfológicas visíveis e alterações no desenvolvimento de indivíduos tratados em relação aos indivíduos controle. De qualquer forma, mesmo esta pequena diminuição dos níveis de *crc* foi capaz de promover alterações na expressão de outros genes. Os genes *RfaBp* e *EcR-A* tiveram seus níveis significativamente elevados ($p < 0,05$) nas amostras silenciadas com *dscrc* em relação ao controle. O gene *crc* desempenha um importante papel na muda e metamorfose, principalmente através da interação com genes de resposta à ecdisona (Hewes *et al.*, 2000). Estes autores sugerem que *crc* exerce um papel central na biossíntese e secreção da ecdisona ou na determinação da resposta de tecidos alvo dos ecdisteróides, podendo estar agindo desta forma na expressão dos genes por ele afetados. Como discutido anteriormente, o gene *RfaBp* em determinadas fases dos desenvolvimento de *A. mellifera*, parece estar sob a influência de ecdisteróides, ora respondendo ao seus baixos níveis ora à sinergia destes com HJ. Em relação ao gene *EcR*, o perfil de expressão deste gene em *A. mellifera* indica uma correspondência geral com os títulos de ecdisteróides (Teles, 2007). O *EcR* atua como parceiro heterodimérico no receptor de ecdisona e também desempenha importante papel na muda e metamorfose mediando a ação dos ecdisteróides nestes processos (Yao *et al.*, 1992, 1993).

5.3.2 *retinoid- and fatty acid-binding protein – RfaBp*

A diminuição de 60% nos níveis de transcritos do gene *RfaBp* não causou alterações visíveis com relação ao *timing* do desenvolvimento e/ou a aspectos morfológicos. Fato que como ocorrido com o gene *crc*, pode ser devido a fatores como tempo entre tratamento e coleta e/ou fase de desenvolvimento em que os indivíduos foram coletados. Em contrapartida, analisando os efeitos deste silenciamento na expressão de outros genes, podemos observar uma queda significativa ($p < 0,05$) nos níveis de expressão do gene codificador da *esterase do hormônio juvenil (jhe)*. A proteína Lipoforina (Lp) ou RFABP, possui importante função no transporte de lipídios (Van Heusden & Law, 1989) e

outros ligantes hidrofóbicos, como por exemplo, o HJ (Trowell, 1992; Engelmann & Mala, 2005). Podemos postular que com a diminuição dos níveis de mRNA de *RfaBp* desencadeada pelo silenciamento também haveria uma queda na tradução da proteína, consequentemente poderia ocorrer uma deficiência no transporte de HJ entre diferentes tecidos. Deste modo, os níveis de HJ em certos órgãos e tecidos também estariam sujeitos a uma queda e, portanto a enzima que atua na regulação de seus níveis não teria seu substrato. Tal ocorrência poderia implicar na diminuição da expressão do gene codificador da *esterase do hormônio juvenil (jhe)*. Corroborando esta hipótese, há dados de que a proteína RFABP inibe o metabolismo de HJ reduzindo a atividade de JHE (Engelmann, 1990; King & Tobe, 1993; Gunawan & Engelmann, 1984). Isto ocorre pela alta afinidade do HJ por RFABP, que sequestra grande parte do hormônio circulante em todos os estágios de desenvolvimento, prevenindo então, sua degradação (Tobe & Stay, 1985). Em concordância com esta suposição temos que em baratas da espécie *Leucophaea maderae* a hidrólise de HJ pela JHE é parcialmente inibida pela redução de substrato disponível devido aos baixos níveis de Lp (Engelmann & Mala, 2005). Vimos também que os maiores níveis de expressão apresentados por operárias para os dois genes encontram-se na mesma fase de desenvolvimento (L5F3), o que sugere uma correlação entre eles, corroborada pelos atuais resultados e também observada em outras espécies (Engelmann & Mala, 2005).

5.3.3 *ultraspiracle - usp*

Operárias em segundo estágio larval (L2) foram tratados com *dsusp* e coletadas em dois momentos diferentes do desenvolvimento, na fase pré-pupal (PP) e pupal (Pbl). Quando coletados em PP, os indivíduos não apresentavam alterações visíveis em sua morfologia e nem no *timing* do desenvolvimento. Mesmo assim, foi observada nas amostras obtidas com estes indivíduos uma queda significativa ($p < 0,05$) nos níveis de expressão de *usp* de aproximadamente 50% em relação ao observado nas amostras controle. Quando as operárias tratadas com *dsusp* foram coletadas no final da fase pupal (Pbl), foi observado um atraso considerável no desenvolvimento dos indivíduos em relação aos indivíduos controle, de aproximadamente 140 horas. O silenciamento de *usp* também foi associado a um atraso no desenvolvimento de *A. mellifera* por outros autores (Barchuk *et al.*, 2008). Os níveis deste gene *usp* em pupas tratadas com *dsusp*, que estavam em Pw, apresentaram uma queda de em

média 30%. Estes níveis mostraram apenas uma diferença marginal ($p = 0,07$) em relação ao controle, o que pode ser explicado pelo fato de que os dois grupos amostrais se encontravam em fases do desenvolvimento distintas ou ainda pela variação encontrada entre os indivíduos, que já foi observada em outro trabalho envolvendo silenciamento em *A. mellifera* (Nunes & Simões, 2009). Os níveis de *usp* encontrados nas pupas Pw (fase em que estavam as operárias tratadas) são mais elevados que aqueles encontrados em Pbl (fase em que as abelhas controle estavam). Possivelmente, se comparássemos os níveis de *usp* encontrados nas amostras tratadas com controles ambas na fase Pw, provavelmente poderíamos observar uma queda mais acentuada na expressão deste.

Como podemos perceber, os níveis de *usp* foram afetados pelo tratamento com seu respectivo dsRNA o que ocasionou alterações na progressão do desenvolvimento dos indivíduos. Em acordo com a proposição de outros autores, *usp* atua em um mecanismo que regula a progressão do desenvolvimento pupal em *A. mellifera* (Barchuk *et al.*, 2008) e também, desempenha um importante papel na metamorfose (Xu *et al.*, 2010). Portanto, a queda em seus níveis proporcionaria a mediação inadequada dos ecdisteróides ocasionando, portanto um atraso no desenvolvimento. Além disto, *usp* como parceiro heterodimérico no complexo receptor de ecdisona (EcR - Oro *et al.*, 1990; Yao *et al.*, 1993) e possível receptor de Hormônio Juvenil (Barchuk *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 1998), afetaria com seus níveis diminuídos pelo silenciamento, a expressão de toda uma cascata gênica. Inclusive aquelas estimuladas por estes hormônios (Zhang *et al.*, 2010), o que afetaria consequentemente a progressão do desenvolvimento. Adicionalmente, foi visto que em indivíduos *knockdown* para o gene *usp* ocorre alteração nos níveis da enzima que participa da via de síntese de melanina, a Prophenoloxidase (Barchuk *et al.*, 2008). Sabe-se que a expressão do gene codificador desta enzima está sob o controle dos ecdisteróides em *A. mellifera* (Zufelato *et al.*, 2004), assim como em outros insetos (Muller *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 1999), então o atraso no desenvolvimento das operárias silenciadas, percebido pela pigmentação da cutícula, poderia novamente ser um indicio de que a ação dos ecdisteróides não está sendo mediada de forma adequada por *usp*. Desta forma, podemos sugerir que o fenótipo observado é uma consequência da ação conjunta de *usp* com outros genes regulatórios influenciados pela sua expressão.

Resumidamente, observamos que os experimentos de *knockdown* de *usp* em *A. mellifera* mostraram que este gene, assim como visto em outras espécies (Oro *et al.*, 1990; Koelle *et al.*, 1991; Yao *et al.*, 1992, 1993), desempenha um papel crucial no desenvolvimento pós-embrionário, especialmente durante a fase pupal (Barchuk *et al.*, 2008). Como rainhas e operárias apresentam consideráveis diferenças em relação o *timing* do desenvolvimento nesta fase (Michelette & Soares, 1994), podemos então sugerir uma atuação diferencial do gene nas vias regulatórias responsáveis pelo desenvolvimento de cada uma das castas.

5.3.4 esterase do hormônio juvenil - *jhe*

A interferência por RNA de fita dupla do gene codificador da esterase do hormônio juvenil (*jhe*) se mostrou bastante eficaz. Em média, houve uma queda de 60% dos níveis de expressão do gene nas amostras tratadas com *dsjhe*. Esta queda foi significativa ($p < 0,05$) e ocasionou um ligeiro adiantamento no desenvolvimento dos indivíduos tratados em relação aos indivíduos controle, considerando-se o número de horas após a eclosão. Estes resultados sugerem que o silenciamento da *jhe*, mesmo que parcial, pode causar uma alteração nos níveis de HJ. Este hormônio, alvo de degradação da esterase do hormônio juvenil (JHE), desempenha um papel crucial no desenvolvimento e determinação de castas (Rachinsky *et al.*, 1990; Hartfelder & Engels, 1998). Rainhas de *A. mellifera* apresentam níveis de HJ mais elevados do que aqueles apresentados por operárias (Rembold, 1987; Rachinsky *et al.*, 1990) e, além disto, completam seu desenvolvimento pós-embrionário mais rapidamente (ver Winston, 1987, Michelette & Soares, 1993, Page & Peng, 2001), indicando que o silenciamento da *jhe*, devido ao adiantamento no desenvolvimento observado, pode estar mimetizando o desenvolvimento de rainhas nestas operárias tratadas com *dsjhe*.

Adicionalmente a estes resultados, observamos a influência da diminuição dos níveis de *jhe* sobre os níveis de expressão de outros genes. Notamos um aumento significativo nos níveis de expressão de *RfaBp* e *EcR-A*, além de expressiva queda nos níveis de *usp*. RFABP, considerada uma das principais proteínas que se ligam ao HJ na hemolinfa, controla a taxa de metabolismo deste hormônio através desta ligação e deste modo assegura a manutenção de títulos adequados de HJ em fases determinadas do desenvolvimento (Engelmann & Mala, 2005). Os níveis mais baixos de *jhe* em

decorrência do silenciamento, possivelmente possibilitaram um aumento nos níveis de HJ, o que pode ter sido o fator responsável pela elevação dos níveis de *RfaBp*. Em relação ao que foi observado para o gene *usp*, é sugerido que em *A. mellifera* este gene participa da regulação de *jhe*. Esta regulação pode se dar, por exemplo, por meio da atuação de *usp* como receptor do HJ, agindo indiretamente nos processos do desenvolvimento dependentes deste hormônio e participando de cascatas de expressão gênica promovida por ele (Mackert *et al.*, 2008; Barchuk *et al.*, 2008). Desta forma, podemos sugerir uma inter-relação entre os níveis de *usp* e *jhe*, em que quando os níveis de um deles cai, o mesmo ocorre com os níveis do outro. Juntamente com *usp*, *EcR* forma o complexo receptor de ecdisona (Yao *et al.*, 1992, 1993), e desempenha importante função no desenvolvimento (Koelle *et al.*, 1991; Talbot *et al.*, 1993; Fujiwara *et al.*, 1995). Encontrar níveis conflitantes para *EcR* e *usp* nas amostras tratadas com *dsjhe* é intrigante, mas não inesperado. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de ter sido observada queda nos níveis de *EcR-A*, uma das isoformas do gene. A existência destas isoformas indica a razão pela qual um único hormônio (ecdisteróides) pode desencadear uma grande variedade de respostas específicas, pois, a expressão delas é diferencialmente regulada (Robinow *et al.*, 1993; Truman *et al.*, 1994). Portanto, *jhe*, por seu envolvimento na degradação do HJ, possivelmente desempenha um importante papel no desenvolvimento, assim como o *EcR*, por sua função no complexo receptor de ecdisona, o que de certa forma explica a relação entre seus níveis.

5.3.5 PANORAMA GERAL DAS INTERAÇÕES DESENCADEADAS PELO NOCAUTE DE GENES RELEVANTES NA DETERMINAÇÃO DE CASTAS

Em um resumo geral, os tratamentos com dsRNA produziram efeitos nos genes alvos e também nos outros genes testados. Discutimos acima as alterações que se mostraram estatisticamente significativa, mas isto não nos permite afirmar que as demais alterações encontradas não são importantes. Observamos padrões opostos nos efeitos produzido pelos tratamentos em relação aos genes testados. Como por exemplo *EcR-A* que teve seus níveis aumentados para todos os genes silenciados para os quais foi testado (*crc*, *RfaBp* e *jhe*) e *jhe* para o qual foi observado o contrário, níveis menores em todos os tratamentos. Os resultados encontrados para *crc*, queda nas amostras tratadas com seu respectivo dsRNA e aumento nas demais (*dsjhe* e *dsRfaBp*), são opostos aos

encontrados para *EcR-B*, aumento em *dscrc* e diminuição em *dsjhe* e *dsRfaBp*. E o terceiro par de resultados opostos foi observado para *usp* e *RfaBp*, com queda de *usp* nas amostras *dsjhe* e *dscrc* e aumento em *dsRfaBp* e para *RfaBp*, os resultados são antagônicos. O significado desta observação ainda é desconhecido e necessita uma análise mais detalhada. Porém, podemos novamente sugerir a existência de uma complexa rede de interação entre estes genes que atua no desenvolvimento geral e possivelmente no desenvolvimento individual das castas de *A. mellifera*, de acordo com o que já foi discutido anteriormente para cada um destes genes em relação aos seus perfis de expressão e efeitos do seu silenciamento.

5.4 ATUAÇÃO DOS microRNAs NO PROCESSO DE DETERMINAÇÃO DE CASTAS

5.4.1 POTENCIAIS miRNAs REGULADORES DE *jhe*

Os miRNAs evoluíram como uma classe de moléculas reguladoras de inúmeros processos biológicos em eucariotos, como proliferação celular, diferenciação, apoptose, resposta a estresse, tumorigênese, entre outros (Banerjee & Slack, 2002; Banerjee *et al.*, 2005; Bartel, 2004; 2009). A busca por miRNAs, potenciais reguladores de *jhe*, resultou em 22 candidatos, dos quais apenas 9 com função já descrita na literatura. Curiosamente, estes miRNAs estão envolvidos com a maioria dos processos biológicos acima citados, ou seja, em processos importantes para o desenvolvimento de insetos, especificamente, na determinação de castas em *A. mellifera*. Em destaque, temos os miRNAs *miR-34* (Sempere *et al.*, 2003) e *let-7* (Frasch, 2008; Liu *et al.*, 2010), envolvidos na regulação do *timing* de desenvolvimento em insetos, sendo ambos regulados temporalmente pelos hormônios morfogenéticos, ecdisteróides e HJ (Sempere *et al.*, 2003). Rainhas e operárias de *A. mellifera* possuem *timing* de desenvolvimento diferentes, além da regulação diferencial do desenvolvimento pelo HJ (Rachinsky *et al.*, 1990), portanto podemos sugerir que estes dois miRNAs, *miR-34* e *let-7*, possam exercer um importante papel no processo de determinação de castas através da regulação de *jhe*. Em *B. mori* *let-7* provavelmente está envolvido com histólise e histogênese durante a metamorfose (Liu *et al.*, 2007). Esta morte e renovação de tecidos são disparadas por ecdisona

(Terashima *et al.*, 2000; Beckstead *et al.*, 2005) e coordenada via *miRNAs* (Xu *et al.*, 2002; Varghese & Cohen, 2007). Estes processos estão intimamente ligados à diferenciação de castas assim, é possível que estes *miRNAs* coordenem os eventos de morte celular verificados nos ovários das operárias. Além disto, *miR-34* foi identificado em pulgões como forte candidato a um dos reguladores do polifenismo reprodutivo (Legeai *et al.*, 2010) e em *B. mori*, foi observada expressão significativa deste *miRNA*, juntamente com *let-7* em ovários (Liu *et al.*, 2010), o que também foi observado para *miR-989* (Skalsky *et al.*, 2010). Em *C. elegans*, *miR-34* está envolvido no processo de morte celular. Em abelhas, *miR-34* pode estar envolvido neste processo nos ovários de rainhas e operárias e de alguma forma, em sinergia com HJ seria permitida a manutenção ou a intensa morte celular programada verificada neste órgão, no processo de desenvolvimento das castas, como descrito por Schmidt-Capella & Hartfelder (1998, 2002). Os *miRNAs* *miR-278* e *miR-263b*, sugeridos aqui como possíveis reguladores de *jhe*, também desempenham um importante papel no controle da morte celular em *Drosophila* (Hilgers *et al.*, 2010). Em *B. mori* seus maiores níveis de expressão foram encontrados na região da cabeça (Liu *et al.*, 2010). O desenvolvimento do cérebro, fator também muito importante no processo de determinação de castas em *A. mellifera* (Roat & Cruz-Landim, 2008; Barchuk *et al.*, 2007), pode estar sendo regulado por estes *miRNAs*, através de sua atuação sobre a expressão de *jhe*, assim como de outros genes envolvidos na formação do cérebro. Além disto, o *miR-278* está envolvido no processo de crescimento em *Drosophila*, atuando no controle da homeostase energética (Teleman *et al.*, 2006). O controle da divisão celular e do crescimento está ligado à via de sinalização da insulina (Teleman *et al.*, 2006) que como já vimos, desempenha um papel crucial no processo de determinação de castas em *A. mellifera*, principalmente se considerarmos a nutrição e a curva de crescimento de cada uma (ver Colombani *et al.*, 2003; Oldham & Hafen, 2003).

Dois outros *miRNAs* (*miR-1* e *miR-8*), cujas funções já são conhecidas, também são possíveis reguladores de *jhe*. Os *miRNAs* *miR-1* e *miR-8*, em *Drosophila* (Nguyen & Frasch, 2006) e *B. mori* (Liu *et al.*, 2010) se encontram envolvidos com crescimento corporal. Análises de expressão gênica diferencial em *A. mellifera* demonstraram que em rainhas a proporção de genes fisiometabólicos regulados positivamente é bem maior que em operárias. Dentre estes genes, estão incluídas enzimas metabólicas e genes cujos produtos são conhecidos por regularem as taxas de processo de

transformação de massa e crescimento geral do organismo (como, por exemplo, o gene *tor*). Este fenômeno é uma consequência dos altos títulos de HJ em larvas de rainhas que, juntamente com a disponibilidade de nutrientes regula a expressão destes genes fisiometabólicos determinando o padrão de crescimento geral do organismo. Por outro lado, baixos níveis de HJ, combinado com quantidade limitada de nutrientes em operárias prospectivas levam ao desenvolvimento de adultos menores, neste caso sob a influência de um grupo diferente de genes, constituindo um sistema duplo de regulação do crescimento em resposta à alimentação diferencial em abelhas, tendo o HJ como um dos principais envolvidos nos processos de crescimento e desenvolvimento, e consequentemente na diferenciação de castas em *A. mellifera*. Deste modo, *miR-1* e *miR-8* seriam potenciais reguladores do processo de determinação de castas pelo seu envolvimento na regulação de *jhe* e consequentemente, dos níveis deste hormônio e secundariamente dos níveis de crescimento e atuação no estímulo cascatas de expressão gênica essenciais neste processo.

Observamos que apesar das diferentes funções desempenhadas pelos miRNAs apontados como reguladores da *jhe*, todas elas estão de alguma forma relacionadas entre si e com o processo de desenvolvimento e diferenciação. Apesar disto, para a maior parte dos miRNAs sugeridos como reguladores de *jhe*, nenhuma função foi ainda descrita, sugerindo que possivelmente são reguladores exclusivos de *A. mellifera*. Como o processo de determinação de castas nesta espécie possui peculiaridades não encontradas nem mesmo em outras espécies de abelhas, este não é um resultado surpreendente, então a análise da influência destes miRNAs sobre a expressão de *jhe*, assim como sobre outros alvos, contribuirá para uma melhor compreensão do processo de determinação de castas nesta em *A. mellifera*.

5.4.2 EXPRESSÃO DE miRNAS EM RAINHAS E OPERÁRIAS

Os microRNAs (*miRNAs*) são RNAs não codificadores de aproximadamente 22-nucleotídeos que desempenham importantes papéis na regulação pós-transcricional da expressão gênica, pareando-se com mRNAs de genes codificadores de proteínas e interferindo na estabilidade destes, em sua tradução ou em ambos (Hendrickson *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2010).

Os miRNAs *let-7*, *miR-263b* e *miR-989*, preditos como reguladores de *jhe*, apresentaram padrão de expressão antagonista em relação ao gene alvo (*jhe*). Tal correlação também foi observada entre *jhe* e o *miR-2796*, aqui incluído como importante na determinação de castas, visto que apresenta expressão altamente diferencial entre elas (Zayed, A., comunicação pessoal). Como discutido anteriormente, estes miRNAs estão envolvidos com importantes processos da diferenciação de castas em *A. mellifera*, como regulação do *timing* de desenvolvimento (Sempere *et al.*, 2003), morte celular (Liu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010; Hilgers *et al.*, 2010). A modulação entre os microRNAs e o gene alvo, observada em rainhas e operárias sugere que os miRNAs desempenham a mesma função em ambas, ainda que atuem em momentos diferentes do desenvolvimento.

5.4.3 EFEITOS DO NOCAUTE DE *jhe* NO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE miRNAS

Na tentativa de se entender melhor o complexo mecanismo de regulação da expressão de *jhe* especialmente no processo de determinação de castas, foram determinados em amostras silenciadas para este gene os níveis de expressão de miRNAs sugeridos por predição computacional como seus possíveis reguladores. Os miRNAs avaliados foram *miR-1*, *miR-8*, *miR-12*, *miR-34*, *miR-263b*, *miR-278*, *miR-989* e *let-7*, além do *miR-2796* que foi incluído nas análises por apresentar níveis de expressão altamente diferentes entre as castas (Zayed, A., comunicação pessoal). A maioria deles apresentou um padrão de expressão que mostra um aumento dos seus níveis nas amostras tratadas com *dsjhe* em relação ao observado para o controle. Entre estes miRNAs estão *miR-1*, *miR-12*, *miR-34*, *miR-278* e dois daqueles discutidos acima que apresentam correlação negativa entre expressão do gene e do miRNAs. Intuitivamente espera-se que a expressão de um miRNA e a de seu alvo sigam em padrões opostos (Liang *et al.*, 2011), isto é, quando os níveis de miRNA estão altos, espera-se que os mRNAs de seu alvo estejam baixos e vice-versa. Portanto, para os miRNAs citados acima, temos uma indicação de sua possível atuação regulando *jhe*. O *miR-263b* apresentou uma ligeira queda em seus níveis nas amostras tratadas e *miR-8* e *miR-2796* aparentam não ter sofrido alteração quando comparados nos dois grupos de amostras. Os níveis de expressão de *jhe* nas amostras tratadas com o dsRNA correspondente apresentaram um silenciamento parcial, com uma queda média de 60% nos níveis de expressão do gene, o que pode ter influenciado nestes resultados, sugerindo que esta

alteração não foi suficiente para causar alteração nos níveis de um miRNA regulador. Além disto, é sugerido que a regulação entre miRNAs e seus genes alvos é um mecanismo complexo, que um único miRNA pode regular mais de um gene alvo e um gene pode ser regulado por vários miRNAs, por isto esta relação miRNA-alvo nem sempre segue os padrões sugeridos (Liang *et al.*, 2011). Algumas vezes, a expressão dos miRNAs e seus alvos preditos se sobrepõem, mas em outras os alvos são expressos em níveis maiores que seus reguladores, assim como foi visto para os outros miRNAs aqui estudados, podendo-se sugerir que a repressão mediada por miRNAs pode agir contrariamente a outros processos regulatórios (Shkumatava *et al.*, 2009).

Os miRNAs estudados, preditos como reguladores de *jhe*, estão diretamente relacionados com funções importantes no desenvolvimento e determinação de castas em *A. mellifera*, como por exemplo *timing* do desenvolvimento (Sempere *et al.*, 2002; 2003), crescimento corporal (Nguyen & Frasch, 2006; Teleman *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010), apoptose (Hilgers *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010), reprodução (Legeai *et al.*, 2010; Skalsky *et al.*, 2010), entre outros, portanto analisar seu envolvimento na regulação de outro importante efector neste processo, representou um grande avanço em relação aos fatores moleculares envolvidos em processos fundamentais que fazem parte do desenvolvimento de *A. mellifera*.

Amostras de RNA de indivíduos tratados com *dsjhe* e controle, foram submetidas ao sequenciamento em larga escala, para análise do perfil de miRNAs em cada grupo de amostras. Observamos clara diferença entre as bibliotecas geradas pelas amostras tratadas e controle em relação à sua composição quanto ao tamanho das reads e quanto à proporção de sequências mapeadas por entidade genética. As bibliotecas “controle” apresentam uma maior proporção de *reads* com tamanho entre 19 e 24 nucleotídeos (nt) enquanto que as bibliotecas “tratamento” são compostas por uma proporção maior de *reads* de tamanho entre 10 e 18 nt. Em relação ao mapeamento, observamos que as bibliotecas “controle” apresentam maior proporção de miRNAs e de rRNA em relação as bibliotecas “tratamento”. Além disso, as bibliotecas “tratamento” apresentam aproximadamente três vezes mais *reads* que mapearam em genes codificadores do que as bibliotecas “controle”. O significado de tais resultados é ainda desconhecido, mas podemos afirmar que interferência por RNA, causa alterações não apenas nos níveis de expressão gênica do gene alvo e de genes por ele regulados,

mas também na composição de distribuição das moléculas reguladoras representadas pelos miRNAs. Isto pode ser corroborado pelo resultado apresentado pelas triplicatas biológicas. Vemos que a variação ocorre entre os grupos e não dentro de um mesmo grupo, o tamanho das *reads* e a forma como elas são mapeadas apresentam uma variação mínima dentro de um mesmo grupo, mas considerável entre eles. Divergências entre a composição de bibliotecas provenientes de diferentes grupos amostrais, já foram relatadas e sugerem uma mudança na regulação dos pequenos RNAs em diferentes condições biológicas representadas por cada grupo de amostras (Beck *et al.*, 2011). Alterações nas porcentagens de miRNAs podem ser explicadas pelo tratamento com dsRNA, que como sabemos será clivado dentro da célula, por enzimas específicas (Keene *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2008), de maneira a desempenhar sua função, modificando os níveis de mRNAs, assim como da tradução, o que pode explicar também as diferenças encontradas entre controle e tratamento em relação às porcentagens de sequências mapeadas contra sequências de genes codificadores de proteína.

As bibliotecas provenientes do sequenciamento em larga escala foram inicialmente caracterizadas através do mapeamento das *reads* nas sequências de miRNAs de *A. mellifera*, em seguida foram identificados os miRNAs diferencialmente expressos entre as bibliotecas “tratamento e controle”. Selecionamos os 14 miRNAs que mais se destacaram nas amostras tratadas em relação às controle. Entre estes, apenas quatro, *miR-100*, *miR-13b*, *miR-306* e *miR-263b* já foram descritos em outras espécies. Ao *miR-100* foi atribuída função relativa à proliferação celular relacionada ao câncer (Henson *et al.*, 2009). Analisando esta informação, este micro pode ter uma função relacionada também à proliferação celular em insetos, especialmente em *A. mellifera*, regulando os níveis de expressão de genes fisiometabólicos, importantes no desenvolvimento de rainhas (Barchuk *et al.*, 2007; Maleszka, 2008). Se pensarmos que a queda nos níveis de *jhe*, causada pelo tratamento com seu respectivo dsRNA, permitiria um aumento nos títulos de HJ mimetizando desta forma o ambiente endógeno próprio de rainhas nas operárias tratadas com *dsjhe*, poderíamos explicar esta diferença nos níveis de *miR-100* entre as amostras tratadas e controle. *miR-263b* foi um dos miRNAs preditos como possível regulador de *jhe*, e uma comparação de seu perfil com o perfil do gene alvo mostrou uma correlação antagônica o que reforçou a indicação de que este micro realmente age na regulação deste gene. Como foi também encontrado como diferencialmente expresso entre as amostras tratadas com

dsjhe e controle, podemos dizer que este é um forte candidato a regulador de *jhe*, pois passou como tal em todas as abordagens utilizadas. Adicionalmente, podemos destacar sua atuação na apoptose, como sugerido por Hilgers e colaboradores (2010), processo prevenido pelos altos níveis de HJ (Schmidt-Capella & Hartfelder, 1998; 2002), e provavelmente estimulado por altos níveis de JHE, a enzima que degrada este hormônio. O terceiro miRNA diferencialmente expresso é o *miR-13*, que de acordo com o que já foi descrito, está também relacionado com a apoptose (Stark et al., 2003), assim como *miR-263b*. Ambos podem estar agindo de maneira complementar, estimulados ou inibidos pelos níveis de *jhe* e atuando no desenvolvimento das castas em *A. mellifera*. O *miR-306* também apresentou expressão diferencial entre os dois grupos amostrais. Em *Bombyx mori* ele é expresso em todos os estágios de desenvolvimento, o que indica uma possível função em processos basais ou constitutivos (Jagadeeswaran et al., 2010), que de alguma forma foram alterados pelo tratamento com longos RNAs de fita dupla. Em *Drosophila* este miRNA está relacionado com genes de resposta imune, ainda que seu papel não esteja totalmente elucidado (Fullaondo & Lee, 2012). Para os demais miRNAs diferencialmente expressos, não temos informações que os caracterize, o que pode se dever ao fato de que o estudo dos miRNAs ser relativamente recente ou estes miRNAs podem constituir uma família de reguladores próprios de abelhas, por isto ainda não foram descritos, o que necessitaria de estudos mais detalhados para confirmarmos ou refutarmos estas hipóteses.

Para estes 14 miRNAs diferencialmente expressos em amostras tratadas com *dsjhe* e controle, foi realizada uma predição de seus potenciais genes alvos. Através desta predição, foram encontradas 1.011 interações e 562 interações quando foram utilizados somente os genes para os quais os ortólogos são conhecidos em *D. melanogaster*. Isto reforça a ideia de que um único miRNA possui múltiplos alvos (Lewis et al., 2005; Bushati & Cohen, 2007). Adicionalmente, análises de GO, com os possíveis alvos dos miRNAs diferencialmente expressos mostraram a participação dos alvos, e indiretamente dos miRNAs em processos biológicos relacionados ao desenvolvimento, como por exemplo, morfogênese, desenvolvimento de apêndices, diferenciação celular, desenvolvimento de sistemas, entre outros e também com funções relacionadas a uma das castas, por exemplo a reprodução, sugerindo que o desenvolvimento de *A. mellifera* está sob um complexo controle, envolvendo a participação destas moléculas reguladoras.

5.5 PROPOSIÇÃO DE NOVAS RELAÇÕES DENTRO DO MODELO DE DETERMINAÇÃO DE CASTAS EM ABELHAS *Apis mellifera*

Com os resultados aqui obtidos para os genes e moléculas reguladoras estudadas podemos sugerir um complexo modelo de regulação na diferenciação de castas envolvendo, além dos fatores propostos por outros autores, a participação destes novos reguladores. Propomos a influência destes fatores no importante processo que culmina na diferenciação de rainhas e operárias em *A. mellifera*, especialmente no que diz respeito às vias de sinalização que favorecem o desenvolvimento de operárias. A figura 25 representa a adição destes novos fatores de maneira a complementar ao que já se conhece sobre a regulação deste processo.

Figura 25: Modelo ilustrativo mostrando possível envolvimento dos genes (*ultraspiracle* - *usp*, *cryptocephal* - *crc*, *esterase do hormônio juvenil* - *jhe* e *retinoid- and fatty acid-binding protein* - *RfaBp*) e outros fatores estudados, na determinação de castas em *A. mellifera*, juntamente com o propostos por outros autores e para este modelo. Adaptado de Malezka (2008).

6. CONCLUSÕES

- Rainhas e operárias apresentam expressão gênica diferencial após o período crítico de determinação de castas, sendo que o número de genes preferencialmente expressos em operárias é maior que em rainhas, sugerindo um padrão de desenvolvimento mais complexo;
- Os genes *crc*, *RfaBp*, *usp* e *jhe* estão possivelmente envolvidos no desenvolvimento de operárias dada sua expressão preferencial nesta casta;
- Este gene estudado regula-se mutuamente, o que pode ser visto através dos resultados de silenciamento, o que contribui juntamente com outros fatores no estímulo ou inibição de vias que irão culminar no desenvolvimento de rainhas e operárias;
- As moléculas reguladoras da expressão gênica pós-transcricional, os miRNAs, são parte importante nestas vias que determinarão o futuro da uma larva de *A. mellifera*, agindo na regulação, em momentos específicos do desenvolvimento, especificando cada casta;
- Provavelmente não há para operárias um fator que seja o mais importante, como a *royalactin* em rainhas, mas sim um conjunto de fatores que age de maneira orquestrada em resposta aos estímulos nutricionais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, A.; Martín, D.; Manetti, A.G.O.; Han, S.J.; Lee, W.J.; Mathiopoulos, K.D.; Muller, H.M.; Kafatos, F.C.; Raikhel, A.; Brey, P.T.** (1999) Genomic structure and ecdysone regulation of the prophenoloxidase 1 gene in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 26, 14795–14800.
- Ayroles, J.F.; Gibson, G.** (2006) Analysis of variance of microarray data. *Methods Enzymol.*, 411:214-33.
- Bai, H.; Ramaseshadri, P.; Palli, S.R.** (2007) Identification and characterization of juvenile hormone esterase gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, 37(8):829-837.
- Baker, F.C.; Tsai, L.W.; Reuter, C.C.; Schooley, D.A.** (1987) In vivo fluctuations of JH, JH acid, and ecdysteroid titer, and JH esterase activity, during development of fifth stadium *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry* 17: 989-996.
- Banerjee, D.; Slack, F.** (2002) Control of developmental timing by small temporal RNAs: A paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression. *Bioessays*, 24: 119–129.
- Banerjee, D.; Kwok, A.; Lin, S.Y.; Slack, F.J.** (2005) Developmental timing in *C. elegans* is regulated by kin-20 and tim-1, homologs of core circadian clock genes. *Dev Cell*, 8(2):287-95.
- Barchuk, A.R.; Bitondi, M.M.; Simões, Z.L.P.** (2002) Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *J Insect Sci*, 2:1.
- Barchuk, A.R.; Maleszka, R.; Simões, Z.L.P.** (2004) *Apis mellifera ultraspiracle*: cDNA sequence and rapid up-regulation by juvenile hormone. *Insect Mol Biol*, 13:459-467.
- Barchuk, A.R.; Cristino, A.S.; Kucharski, R.; Costa, L.F.; Simões, Z.L.; Maleszka, R.** (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev Biol*, 7:70-89.
- Barchuk, A.R.; Figueiredo, V.L.C.; Simões, Z.L.P.** (2008) Downregulation of ultraspiracle gene expression delays pupal development in honeybees. *J Insect Physiol*, 54:1035– 1040.
- Bartel, D.P.** (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116:281–297.
- Bartel, D.P.** (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2):215-33.
- Beato, M.** (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56:335-344.

- Beck, D.; Ayers, S.; Wen, J.; Brandl, M.B.; Pham, T.D.; Webb, P.; Chang, C.; Zhou, X.** (2011) Integrative analysis of next generation sequencing for small non-coding RNAs and transcriptional regulation in Myelodysplastic Syndromes. *BMC Medical Genomics*, 4:19-35.
- Beckstead, R.B.; Lam, G.; Thummel, C.S.** (2005) The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Gen Biol*, 6:R99.
- Bellés, X.; Martín, D.; Piulachs, M.D.** (2005) The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu Rev Entomol*, 50:181-99.
- Billas, I.M.L.; Iwema, T.; Garnier, J.-M.; Mitschler, A.; Rochel, N.; Moras, D.** (2003). Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor. *Nature* 426, 91–96.
- Bloch, G.; Wheeler, D.E.; Robinson, G.E.** (2002) Endocrine influences on the organization of insects societies. In: Hormones, Brain and Behavior. Eds. Donald W. Pfaff, Arthur P. Arnold, Anne M. Etgen, Susan E. Fahrbach, Robert T. Rubin. pp. 195-235. *Elsevier Science*, USA.
- Boleli, I.C.; Simões, Z.L.P.; Hartfelder, K.** (1998) The stomatogastric nervous system of the honeybee (*Apis mellifera*) in a critical phase of caste development. *J Morphol*, 236:139-149.
- Burtis, K.C.; Thummel, C.S.; Jones, C.W.; Karim, F.D.; Hogness, D.S.** (1990) The *Drosophila* 74EF early puff contains E74, a complex ecdysone- inducible gene that encodes two ets-related proteins. *Cell*, 61:85-99.
- Bushati, N.; Cohen, S.M.** (2007) microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23:175-205.
- Campbell, C.; Keene, K.; Brackney, D.; Olson, K.; Blair, C.; Wilusz, J.; Foy, B.** (2008) *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection. *BMC Microbiol*, 8(1):47.
- Caygill, E.E.; Johnston, L.A.** (2008) Temporal regulation of metamorphic processes in *Drosophila* by the *let-7* and *miR-125* heterochronic microRNAs. *Curr Biol*, 18(13):943-50.
- Chan, Q.W.T.; Melathopoulos, A.P.; Pernal, S.F.; Foster, L.J.** (2009) The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus larva*. *BMC Genomics*, 10:387
- Chawla, A.; Repa, J.J.; Evans, R.M.; Mangelsdorf, D.J.** (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*, 294(5548):1866-70.
- Cherbas, P.** (1993) The IVth Karlson Lecture: Ecdysone-responsive genes. *Biochem. Mol. Biol.*, 23: 3-12.

- Christianson, A.M.K.; King, D.L.; Hatzivassiliou, E.; Casas, J.E.; Hallenbeck, P.L.; Nikodem, V.M.; Mitsialis, S.A.; Kafatos, F.C.** (1992) DNA binding and heteromerization of the *Drosophila* transcription factor chorion factor 1/ultraspiracle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:11503-11507.
- Chung, A.C.K.; Durica, D.S.; Clifton, S.W.; Roe, B.A.; Hopkins, P.M.** (1998) Cloning of crustacean ecdysteroïd receptor and retinoid-X receptor gene homologs and elevation of retinoid-X receptor mRNA by retinoic acid. *Mol Cell Endocrinol* 139:209-227.
- Colombani, J.; Raisin, S.; Pantalacci, S.; Radimerski, T.; Montagne, J.; Léopold, P.** (2003) A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell*, 114(6):739-49.
- Colonello-Frattini, N.A.; Guidugli-Lazzarini, K.R.; Simões, Z.L.; Hartfelder, K.** (2010) Mars is close to Venus - female reproductive proteins are expressed in the fat body and reproductive tract of honey bee (*Apis mellifera* L.) drones. *J Insect Physiol* 56(11):1638-1644.
- Corona, M.; Estrada, E.; Zurita, M.** (1999) Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. *J Exp Biol*, 202:929-938.
- Corona, M.; Hughes, K.A.; Weaver, D.B.; Robinson, G.E.** (2005) Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mech Ageing Dev*, 126(11):1230-8.
- Cunha, A.D.; Nascimento, A.M.; Guidugli, K.R.; Simões, Z.L.P.; Bitondi, M.M.G.** (2005). Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from honey bee, *Apis mellifera*. *J Insect Physiol*, 51(10):1135-1147.
- de Kort, C.A.D.; Granger, N.A.** (1996) Regulation of JH titers: The relevance of degradative enzymes and binding proteins. *Arch Insect Biochem Physiol*, 33(1):1-26.
- Dennis, G.; Sherman, B.T.; Hosack, D.A.; Yang, J.; Gao, W.; et al.** (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4(5): P3.
- DiBello, P.R.; Withers, D.A.; Bayer, C.A.; Fristrom, J.W.; Guild, G.M.** (1991). The *Drosophila* Broad-Complex encodes a family of related proteins containing zinc fingers. *Genetics*, 129:385-397.
- Dogra, G. S.; Ulrich, G. M.; Rembold, H.** (1977) A comparative study of the endocrine system of the honeybee larvae under normal and experimental conditions. *Z. Naturforsch.* 32: 637–642.
- Drummond-Barbosa, D.; Spradling, A.C.** (2001) Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol*; 231(1):265-78.
- Elekonich, M.M.; Jez, K.; Ross, A.J.; Robinson, G.E.** (2003) Larval juvenile hormone treatment affects pre-adult development, but not adult age at onset of foraging in worker honey bees (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol*, 49:359–366.

- Engelmann, F.** (1990) Hormonal control of arthropod reproduction. In: Progress in comparative endocrinology". Eds. A. Epple, C.G. Scanes, M.H. Stetson. pp.357-364. Wiley-Liss, New York.
- Engelmann, F.; Mala, J.** (2005). The cockroach *Leucophaea maderae* needs more than juvenile hormone, vitellogenin and reserves to make a yolky egg. *Journal Insect Physiology*, 51: 465-472.
- Evans, R.M.** (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240(4854):889-95. **Evans, J.; Wheeler, D.** (1999) Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:5575-5580.
- Evans, J.; Wheeler, D.** (2000) Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome biology*, 2(1):1-6.
- Evans, J.; Wheeler, D.** (2001) Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. *Bio Essays*, 23:1-7.
- Ewing, B.; Green, P.** (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*, 8:186-194.
- Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M.C.; Green, P.** (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*, 8:175-185.
- Fan, Y.; Schal, C.; Vargo, E.L.; Bagnères, A.G.** (2004) Characterization of termite lipophorin and its involvement in hydrocarbon transport. *Journal of Insect Physiology*, 50: 609-620.
- Feldlaufer, M. F.; Herbert, E. W.; Svoboda, J. A.; Thompson, M. J. & Lusby, W. R.** (1985) Makisterone A. The major ecdysteroid from the pupa of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem.*, 15(5):597-600.
- Feng, Q.L.; Ladd, T.R.; Tomkins, B.L.; Sundaram, M.; Sohi, S.S.; Retnakaran, A.; Davey, K.G.; Palli, S.R.** (1999) Spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) juvenile hormone esterase: hormonal regulation, developmental expression and cDNA cloning. *Mol Cell Endocrinol*, 148(1-2):95-108.
- Frasch M.** (2008) A matter of timing: microRNA-controlled temporal identities in worms and flies. *Genes Dev*, 22(12):1572-6.
- Fristrom, J.W.** (1965) Development of the morphological mutant cryptocephal of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 52(2):297-318.
- Fujiwara, H.; Jindra, M.; Newitt, R.; Palli, S.R.; Hiruma, K.; Riddiford, L.M.** (1995). Isolation and development expression of the ecdysone receptor gene in wings of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25:845-856.

- Fullaondo, A.; Lee, S.Y.** (2012) Identification of putative miRNA involved in *Drosophila melanogaster* immune response *Devl Comp Immunol*, 36:267–273.
- Gauthier, A.S.; Hewes, R.S.** (2006) Transcriptional regulation of neuropeptide and peptide hormone expression by the *Drosophila* dimmed and cryptocephal genes. *J Exp Biol.*; 209(10):1803-15.
- Giguère, V.** (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev*, 20(5):689-725.
- Gilbert, L.I.; Granger, N.A.; Roe, R.M.** (2000) The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem Mol Biol*, 30(8-9):617-44.
- Goewie, E. A.** (1978) *Med. Landbouwhogeschool. Wageningen*, 75:1-75.
- Goldstein, J.L.; Brown, M.S.** (1990) Regulation of mevalonate pathway. *Nature*, 343:425-30.
- Grad, I.; Kochman, M.; Ozyhar, A.** (2002) Functionality versus strength -- has functional selection taken place in the case of the ecdysteroid receptor response element? *Acta Biochim Pol.*, 49(3):747-56.
- Green, S.; Chambon, P.** (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.*, 4: 309-314.
- Guidugli, K.R.; Hepperle, C.; Hartfelder, K.** (2004) A member of the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily is a target of the ecdysone response in honey bee (*Apis mellifera*) caste development *Apidologie*, 35:37-47.
- Guidugli-Lazzarini, K.R.** (2006) Expressão gênica das proteínas vitelogenina e lipoforina e seus receptores nas fases vitelogênicas e não vitelogênicas de *Apis mellifera*. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- Gullan, P.J.; Cranston, P.S.** (1994) *The Insects: An Outline of Entomology*. Chapman and Hall, London. 491 pp.
- Gunawan, S.; Engelmann, F.** (1984) Esterolytic degradation of juvenile hormone in the hemolymph of the adult female of *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem*, 14:601–607.
- Guo, H.; Ingolia, N.T.; Weissman, J.S.; Bartel, D.P.** (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308):835–840. doi:10.1038/nature09267.
- Hall, B.L.; Thummel, C.S.** (1998) The RXR homolog *ultraspiracle* is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor. *Development.*, 125(23):4709-17.

- Hammock, B.D.** (1985) Regulation of juvenile hormone titer: Degradation. In: Kerkut GA, Gilbert LI editors. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* (Ed.), 7, 431-472. New York, Pergamon Press.
- Hartfelder, K.; Engels, W.** (1998) Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr Top Dev Biol*, 40:45-77.
- Hartfelder, K.; Makert, G.R.; Judice, C.C.; Pereira, G.A.G.; Santana, W.C.; Dallacqua, R.; Bitondi, M.M.G.** (2006) Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie* 37:144-163
- Hendrickson, D.G.; Hogan, D.J.; McCullough, H.L.; Myers, J.W.; Herschlag, D.; Ferrell, J.E.; Brown, P.O.** (2009) Concordant Regulation of Translation and mRNA Abundance for Hundreds of Targets of a Human microRNA. *PLoS Biol*, 7(11): e1000238. doi:10.1371/journal.pbio.1000238.
- Henrich, V .C.; Brown, N. E.** (1995) Insect Nuclear Receptors: A developmental and comparative perspective. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 25(8): 881-897.
- Henson, B.J.; Bhattacharjee, S.; O'Dee, D.M.; Feingold, E.; Gollin, S.M.** (2009) Decreased Expression of *miR-125b* and *miR-100* in Oral Cancer Cells Contributes to Malignancy. *Genes Chromosomes Cancer*, 48(7):569–582. doi:10.1002/gcc.20666.
- Hepperle, C.; Hartfelder, K.** (2000) Differential display PCR reveals ecdysteroid-responsive genes in the ovary of honeybee worker larvae. In *Proceedings of the International Congress of Entomology*. Edited by Gazzoni D. Londrina, Brazil: Embrapa Press, 552.
- Hewes, R.S.; Schaefer, A.M.; Taghert, P.H.** (2000) The cryptocephal gene (ATF4) encodes multiple basic-leucine zipper proteins controlling molting and metamorphosis in *Drosophila*. *Genetics*, 155(4):1711-23.
- Hilgers, V.; Bushati, N.; Cohen, S.M.** (2010) *Drosophila* microRNAs 263a/b confer robustness during development by protecting nascent sense organs from apoptosis. *PLoS Biol*, 8(6):e1000396.
- Hinton, A.C.; Hammock, B.D.** (2001) Purification of juvenile hormone esterase and molecular cloning of the cDNA from *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*, 32(1):57-66.
- Hirai, M.; Kamimura, M.; Kikuchi, K.; Yasukochi, Y.; Kiuchi, M.; Shinoda, T.; Shiotsuki, T.** (2002) cDNA cloning and characterization of *Bombyx mori* juvenile hormone esterase: an inducible gene by the imidazole insect growth regulator KK-42. *Insect Biochem Mol Biol*, 32(6):627-35.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium** (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443:931-949.

- Iwema, T.; Billas, I.M.L.; Beck, Y.; Bonneton, F.; Nierengarten, H.; Chaumot, A.; Richards, G.; Laudet, V.; Moras, D.** (2007). Structural and functional characterization of a novel type of ligand-independent RXR-USP receptor. *The EMBO Journal*; 26: 3770-3782.
- Jagadeeswaran, G.; Zheng, Y.; Sumathipala, N.; Jiang, H.; Arrese, E.L.; Soulages, J.L.; Zhang, W.; Sunkar, R.** (2010) sequencing of small RNA libraries reveals dynamic regulation of conserved and novel microRNAs and microRNA-stars during silkworm development. *BMC Genomics*, 11:52-70.
- Jindra, M.; Huang, J. Y.; Malone, F.; Asahira, M. & Riddiford, L. M.** (1997) Identification and mRNA developmental profiles of two Ultraspiracle isoforms in the epidermis and wing of the tobacco hornworm, *Manduca Sexta*. *Insect Molec. Biol.*, 6:41-53.
- Jousse, C.; Averous, J.; Bruhat, A.; Carraro, V.; Mordier, S.; Fafournoux, P.** (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.*; 313:447-452.
- Jung-Hoffmann, L.** (1966) Die Determination von Königin und Arbeiterin der Honigbiene. *Z Bienenforsch*, 8:296-322.
- Kamakura, M.; Suenobu, N.; Fukushima, M.** (2001) 57-kDa protein in royal jelly enhances proliferation of primary cultured rat hepatocytes and increases albumin production in the absence of serum. *Biochem. Biophys. Res Commun*, 282, 865-874.
- Kamakura, M.** (2002) Signal transduction mechanism leading to enhanced proliferation of primary cultured adult rat hepatocytes treated with royal jelly 57-kDa protein. *J. Biochem*, 132:911-919.
- Kamakura, M.** (2011) Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, 473(7348):478-83.
- Kapitskaya, M.; Wang, S.; Cress, D. E.; Dhadialla, T.S. & Raikhel, A. S.** (1996) The mosquito ultraspiracle homolog, a partner of ecdysteroid receptor heterodimer: cloning and characterization of isoforms expressed during vitellogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.*, 121:119-132.
- Kawooya, J.K.; Law, J.H.** (1988) Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(18): 8748-8753.
- Keene, K.M.; Foy, B.D.; Sanchez-Vargas, I.; Beaty, B.J.; Blair, C.D.; Olson, K.E.** (2004) RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (*Alphavirus*; *Togaviridae*) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(49):17240-17245.
- Kimura, K.; Truman, J.W.** (1990) Postmetamorphic cell death in the nervous and muscular systems of *Drosophila melanogaster*. *J Neuroscience*, 10:403-411.

- King, L.E.; Tobe, S.S.** (1993) Changes in the titer of a juvenile hormone III binding lipophorin in the haemolymph of *Diplopterapunctata* during development and reproduction: functional significance. *J Insect Physiol*, 39:241–251.
- Kinjoh, T.; Kaneko, Y.; Itoyama, K.; Mita, K.; Hiruma, K.; Shinoda, T.** (2007) Control of juvenile hormone biosynthesis in *Bombyx mori*: cloning of the enzymes in the mevalonate pathway and assessment of their developmental expression in the corpora allata. *Insect Biochem Mol Biol*, 37(8):808-18.
- Kocher, S.D.; Richard, F.J.; Tarpy, D.R.; Grozinger, C.M.** (2008) Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* 9:232.
- Koelle, M. R.; Talbot, W. S.; Segraves, W. A.; Bender, M. T.; Cherbas, P.; Hogness, D. S.** (1991). The *Drosophila EcR* gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell*, 67: 59–77.
- Kojima, T.** (2004) The mechanism of *Drosophila* leg development along the proximodistal axis. *Develop Growth Differ*, 46:115–129.
- Kutty, R.K.; Kutty, G.; Kambadur, R.; Duncan, T.; Koonin, E.V.; Rodriguez, I.R.; Odenwald, W.F.; Wiggert, B.** (1996). Molecular characterization and developmental expression of a retinoid- and fatty acid-binding glycoprotein from *Drosophila*. A putative lipophorin. *J Biol Chem*, 271(34): 20641-20649.
- Laidlaw, H. H.** (1992) Production of queen and package bees, pp. 989-1041. In: The hive and the honey bee (Graham J., Ed.).- Dadant & Sons, Hamilton, IL, USA.
- Lan, Q.; Hiruma, K.; Hu, X.; Jindra, M. and Riddiford, L. M.** (1999). Activation of a delayed-early gene encoding MHR3 by the ecdysone receptor heterodimer EcR-B1 – USP-1 but not by EcR-B1 – USP-2. *Molec. Cell. Biol.* 19:4897-4906.
- Laudet, V.** (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 19, 207-226.
- Legeai, F.; Rizk, G.; Walsh, T.; Edwards, O.; Gordon, K.; Lavenier, D.; Leterme, N.; Méreau, A.; Nicolas, J.; Tagu, D.; Jaubert-Possamai, S.** (2010) Bioinformatic prediction, deep sequencing of microRNAs and expression analysis during phenotypic plasticity in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *BMC Genomics*, 11:281.
- Levenbook, L.; Bauer, A.C.** (1984) The fate of the larval storage protein calliphorin during adult development of *Calliphora vicina*. *Insect Biochem*, 14: 77-86.
- Lewis, B.P.; Burge, C.B.; Bartel, D.P.** (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1):15-20.

- Li, H.; Durbin, R.** (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14):1754-6.
- Liang, Z.; Zhou, H.; Zheng, H.; Wu, J.** (2011) Expression levels of microRNAs are not associated with their regulatory activities. *Biol Direct*, 6:43.
- Liu, S.; Xia, Q.; Zhao, P.; Cheng, T.; Hong, K.; Xiang, Z.** (2007) Characterization and expression patterns of *let-7* microRNA in the silkworm (*Bombyx mori*). *BMC Dev Biol*, 25;7:88.
- Liu, S.; Gao, S.; Zhang, D.; Yin, J.; Xiang, Z.; Xia, Q.** (2010) MicroRNAs show diverse and dynamic expression patterns in multiple tissues of *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 2;11:85.
- Livak, K.J.S.; Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 25:402–408.
- Lourenço, A.P.; Mackert, A.; Cristino, A.S.; Simões, Z.L.P.** (2008) Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, 39:372-385.
- Mackert, A.; Nascimento, A.M.; Bitondi, M.M.G.; Hartfelder, K.; Simões, Z.L.P.** (2008) Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. — Expression analysis and functional assays. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 150(1): 33-44.
- Maere, S.; Heymans, K.; Kuiper, M.** (2005) BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, 21(16):3448-9.
- Malun, D.; Giurfa, M.; Galizia, C.G.; Plath, N.; Brandt, R.; Gerber, B.; Eisermann, B.** (2002) Hydroxyurea-induced partial mushroom body ablation does not effect Acquisition and Retention of olfactory differential conditioning in honeybees. *J. Neurobiol.*, 53:343–360.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and Evans, R.M.** (1995) The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, 83:835-839.
- Maleszka, R.** (2008) Epigenetic integration of environmental and genomic signals in honey bees: the critical interplay of nutritional, brain and reproductive networks. *Epigenetics*, 3(4):188-92.
- Michelette, E.R.F.; Soares, A.E.E.** (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, 24:431–440.
- Michener, C. D.** (1974) The Social Behavior of the Bees. *Harvard Univ. Press*, Cambridge.

- Mortazavi, A.; Williams, B.A.; McCue, K.; Schaeffer, L.; Wold, B.** (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, 5:621-628.
- Muller, H.M.; Dimopoulos, G.; Blass, C.; Kafatos, F.C.** (1999) A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes. *J Biol Chem*, 274:11727–11735.
- Nguyen, H.T.; Frasch, M.** (2006) MicroRNAs in muscle differentiation: lessons from *Drosophila* and beyond. *Curr Opin Genet Dev*, 16(5):533-9.
- Nijhout, H. F.** (1994) *Insects hormones*. Princeton University Press, New Jersey.
- Nunes, F.M.F.; Simões, Z.L.P.** (2009) A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. *Insect Biochem Mol Biol*, 39(2):157-160.
- Nunes-Silva, P.; Gonçalves, L.S.; Franco, T.M.; De Jong, D.** (2006) Rate of growth and development time of africanized honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers during ontogenetic development. *Braz. J. morphol. Sci*, 23(3-4):325-332.
- Oldham, S.; Hafen, E.** (2003) Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol.*, 13(2):79-85.
- Oro, A. E.; McKeown, M. & Evans, R. M.** (1990). Relationship between the product of the *Drosophila ultraspiracle* locus and the vertebrate retinoid X receptor. *Nature*, 347: 298-301.
- Page, R.E. Jr; Peng, C.Y.** (2001) Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp Gerontol*; 36(4-6):695-711.
- Patel, A.; Fondrk, M.K.; Kaftanoglu, O.; Emore, C.; Hunt, G.; Frederick, K.; Amdam, G.V.** (2007) The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. *PLoS ONE*, 2(6):509.
- Patrick, C.W. Jr; Zheng, B.; Wu, X.; Gurtner, G.; Barlow, M.; Koutz, C.; Chang, D.; Schmidt, M.; Evans, G.R.** (2001) Muristerone a-induced nerve growth factor release from genetically engineered human dermal fibroblasts for peripheral nerve tissue engineering. *Tissue Eng.* 7:303-311.
- Perlmann, T.; Rangarajan, P. N.; Umesono, K.; Evans, R. M.** (1993). Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev.* 7:1411–1422.
- Perera, S.C.; Zheng, S.; Feng, Q.L.; Krell, P.J.; Retnakaran, A.; Palli, S.R.** (2005) Heterodimerization of ecdysone receptor and ultraspiracle on symmetric and asymmetric response elements. *Arch Insect Biochem Physiol*, 60:55-70.

- Rachinsky, A.; Strambi, C.; Strambi, A.; Hartfelder, K.** (1990) Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last estágio honeybee larvae. *Gen Comp Endocrinol*, 79:31-38.
- Rehmsmeier, M.; Steffen, P.; Hochsmann, M.; Giegerich, R.** (2004) Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*, 10:1507-1517.
- Rembold H., Kremer J.-P., Ulrich G.M.** (1980) Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honeybee, *Apis mellifera* L., *Apidologie*, 11:29–38.
- Rembold, H.** (1987). Regulation of Honeybee age polyethism by juvenile hormone. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 20:329-338.
- Riddiford, L. M.** (1994) Cellular and molecular actions of Juvenile Hormone I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect Physiol.*, 24:213-274.
- Riddiford, L.M.** (1996) Juvenile hormone: the status of its "status quo" action. *Arch Insect Biochem Physiol*, 32(3-4):271-86.
- Roat, T.C.; Cruz Landim, C.** (2008) Temporal and morphological differences in post-embryonic differentiation of the mushroom bodies in the brain of workers, queens, and drones of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Micron*, 39(8):1171-8.
- Robinow, S.; Talbot, W. S.; Hogness, D. S.; Truman, J. W.** (1993). Programmed cell death in the *Drosophila* CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform. *Development* 119:1251-1259.
- Robinson, M.D.; McCarthy, D.J.; Smyth, G.K.** (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1):139-40.
- Ryan, R.O.; Schmidt, J.O.; Law, J.H.** (1984). Chemical and immunological properties of lipophorin from 7 insect orders. *Arch Insect Biochem Physiol*, 4: 375-383.
- Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *PNAS*, 74:5463.
- Sasorith, S.; Billas, I.M.; Iwema, T.; Moras, D.; Wurtz, J.M.** (2002) Structure-based analysis of the ultraspiracle protein and docking studies of putative ligands. *J Insect Sci.*, 2:25.
- Schmidt-Capella, I.C.; Hartfelder, K.** (1998) Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J Insect Physiol*, 44(5-6):385-391.

- Schmidt-Capella, I.C.; Hartfelder, K.** (2002) Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honey bee ovary. *Cell Tissue Res*; 307(2):265-272.
- Segraves, W.A.; Hogness, D.S.** (1990) The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev*, 4:204-219.
- Sempere, L.F.; Dubrovsky, E.B.; Dubrovskaya, V.A.; Berger, E.M.; Ambros, V.** (2002) The Expression of the *let-7* small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 244:170-179.
- Sempere, L.F.; Sokol, N.S.; Dubrovsky, E.B.; Berger, E.M.; Ambros, V.** (2003) Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity. *Dev Biol*, 259(1):9-18.
- Sevala, V.; Shu, S.; Ramaswamy, S.B.; Schal, C.** (1999) Lipophorin of female *Blattella germanica* (L.): characterization and relation to hemolymph titers of juvenile hormone and hydrocarbons. *J Insect Physiol*, 45: 431-441.
- Severson, D.; Williamson, J.; Aiken, J.** (1989) Caste-specific transcription in the female honeybee. *Insect Biochem*, 19:215-220.
- Shipman, B.A.; Ryan, R.O.; Schmidt, J.O.; Law, J.H.** (1987). Purification and properties of a very high density lipoprotein from the hemolymph of the honeybee *Apis mellifera*. *Biochemistry*, 26:1885-1889.
- Shkumatava, A.; Stark, A.; Sive, H.; Bartel, D.P.** (2009) Coherent but overlapping expression of microRNAs and their targets during vertebrate development. *Genes Dev*, 23: 466-481.
- Shu, S.; Park, Y.I.; Ramaswamy, S.B.; Srinivasan, A.** (1997) Hemolymph juvenile hormone titers in pupal and adult stages of southwestern Corn Borer [*Diatraea grandiosella* (Pyralidae)] and relationship with egg development. *J Insect Physiol*, 43: 719-726.
- Skalsky, R.L.; Vanlandingham, D.L.; Scholle, F.; Higgs, S.; Cullen, B.R.** (2010) Identification of microRNAs expressed in two mosquito vectors, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*. *BMC Genomics*, 11:119.
- Sparks, T.C.; Hammock, B.D.; Riddiford, L.M.** (1983) The haemolymph juvenile hormone esterase of *Manduca sexta* (L.) -inhibition and regulation. *Insect Biochemistry* 13: 529-541.
- Stark, A.; Brennecke, J.; Russell, R.B.; Cohen, S.M.** (2003) Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol*, 1(3):E60.

- Sun, J.; Hiraoka, T.; Dittmer, N.T.; Cho, K.H.; Raikhel, A.S.** (2000). Lipophorin as a yolk protein precursor in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1161-1171.
- Takeuchi, H.; Fujiyuki, T.; Shirai, K.; Matsuo, Y.; Kamikouchi, A.; Fujinawa, Y.; Kato, A.; Tsujimoto, A.; Kubo, T.** (2002) Identification of genes expressed preferentially in the honeybee mushroom bodies by combination of differential display and cDNA microarray. *FEBS Letters*, 513: 230-234.
- Talbot, W. S.; Swyryd, E. A. & Hogness, D. S.** (1993) *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*, 73:1323-1337.
- Teleman, A.A.; Maitra, S.; Cohen, S.M.** (2006) *Drosophila* lacking microRNA *miR-278* are defective in energy homeostasis. *Genes Dev*, 20: 417-422.
- Teles, A.C.A.S.** (2007) Sequência DE cDNA e modulação hormonal da expressão do receptor de ecdisona (*EcR*) em fêmeas de *Apis mellifera*. Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Teles, A.C.A.S.; Melo, T.R.P.; Barchuk, A.R.; Simoes, Z.L.P.** (2007) *ultraspiracle* of the stingless bees *Melipona scutellaris* and *Scaptotrigona depilis*: cDNA sequence and expression profiles during pupal development. *Apidologie (Celle)*, 38:462-471.
- Telfer, W.H.; Pan, M.L.; Law, J.H.** (1991). Lipophorin in developing adults of *Hyalophora cecropia*: support of yolk formation and preparation for flight. *Insect Biochemistry*, 21(6): 653-663.
- Terashima, J.; Yasuhara, N.; Iwami, M.; Sakurai, S.** (2000) Programmed cell death triggered by insect steroid hormone, 20-hydroxyecdysone, in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Genes Evol*, 210:545-558.
- Tobe, S.S.; Stay, B.** (1985) Structure and regulation of the corpusallatum. *Adv Insect Physiol*, 18:305-432.
- Trowell, S.C.** (1992). High affinity juvenile hormone carrier proteins in the hemolymph of insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 103: 795-807.
- Truman, J.W.; Talbot, W.S.; Fahrback, S.E.; Hogness, D.S.** (1994). Ecdysone receptor expression in the CNS correlates with stage-specific responses to ecdysteroids during *Drosophila* and *Manduca* development. *Development* 120:219-234.
- Truss, M.; Beato, M.** (1993) Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *End. Rev.*, 14: 459-479.

- Tsai, M.J.; O'Malley, B.W.** (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.*, 63:451-86.
- Umesono, K. and Evans, R.M.** (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*, 57: 1139-1146.
- Van Heusden, M.C.; Law, J.H.** (1989) An insect lipid transfer particle promotes lipid loading from fat body to lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 17287-17292.
- Van Heusden, M.C.; Thompson, F.; Dennis, J.** (1998). Biosynthesis of *Aedes aegypti* lipophorin and gene expression of its apolipoproteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 10: 733-738.
- Varghese, J.; Cohen, S.M.** (2007) microRNA *miR-14* acts to modulate a positive autoregulatory loop controlling steroid hormone signaling in *Drosophila* Genes Dev. 21(18): 2277--2282
- Venkatesh, K.; Lenz, C.J.; Bergman, D.K.; Chippendale, G.M.** (1987) Synthesis and release of lipophorin in larvae of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*: an *in vitro* study. *Insect Biochemistry*, 17(8): 1173-1180.
- Vögtli, M.; Imhof, M.O.; Brown, N.E.; Rauch, P.; Spindler-Barth, M.; Lezzi, M.; Henrich, V.C.** (1999) Functional characterization of two Ultraspiracle forms (CtUSP-1 and CtUSP-2) from *Chironomus tentans*. *Insect Biochem Mol Biol.*, 29(10):931-42.
- Ward, V.K., Bonning, B.C., Huang, T.L., Shiotsuki, T., Griffeth, V.M., Hammock, B.D.** (1992) Analysis of the catalytic mechanism of juvenile hormone esterase by site-directed mutagenesis. *Int J Biochem*, 24:1933–1941.
- Weers, P.M.; Van Marrewijk, W.J.; Beenakkers, A.M.; Van der Horst, D.J.** (1993) Biosynthesis of locust lipophorin. Apolipophorins I and II originate from a common precursor. *J Biol Chem*, 268: 4300-4003.
- Weirich, G.; Wren, J.; Siddall, J.B.** (1973) Developmental changes of the juvenile hormone Esterase activity in haemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem*, 3:397-407.
- Wheeler, D.E.; Buck, N.; Evans, J.D.** (2006) Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol*, 15:597-602.
- Whitfield, C.W.; Ben-Shahar, Y.; Brillet, C.; Leoncini, I.; Crauser, D.; Leconte, Y.; Rodriguez-Zas, S.; Robinson, G.E.** (2006) Genomic dissection of behavioral maturation in the honey bee. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(44):16068-75.
- Wilson, E.O.** (1971). The Insect Societies. *Harvard Univ. Press*; Cambridge.

- Witthöft, W.** (1967) Absolute Anzahl und Verteilung der Zellen im Hirn der Honigbiene. *Z Morphol Tiere*, 61:160–184.
- Winston, M.L.** (1987) The Biology of the Honey Bee. Cambridge, MA: Harvard University Press. 296 p.
- Wolfinger, R.D.; Gibson, G.; Wolfinger, E.D.; Bennett, L.; Hamadeh, H.; Bushel, P.; Afshari, C.; Paules, R.S.** (2001) Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. *Journal of Computational Biology*, 8: 625–637.
- Xu, Y.; Fang, F.; Chu, Y.; Jones, D. and Jones, G.** (2002) Activation of transcription through the ligand-binding pocket of the orphan nuclear receptor *ultraspiracle*. *Eur J Biochem*, 269(24): 6026 - 6036.
- Xu, J.; Tan, A.; Palli, S. R.** (2010) The function of nuclear receptors in regulation of female reproduction and embryogenesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *J Insect Physiol*, 56: 1471–1480.
- Yao, T.P.; Segraves, W.A.; Oro, A.E.; McKeown, M.; Evans, R.M.** (1992). *Drosophila ultraspiracle* modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, 71:63-72.
- Yao, T.P.; Forman, B.M.; Jiang, Z.; Cherbas, L.; Chen, J.D.; McKeon, M.; Cherbas, P. & Evans, R.M.** (1993) Functional ecdysone receptor is the product of EcR and *Ultraspiracle* genes. *Nature*, 366:476-479.
- Yun, H.K.; Kim, W.K.; Kim, H.R.** (1994). Analysis of lipophorin in the hemolymph, ovaries, and testes of the fall webworm, *Hyphantria cunea* (drury). *Arch Insect Biochem Physiol*, 27: 153-167.
- Zhang, Z.; Xu, J.; Sheng, Z.; Sui, Y.; Palli, S.R.** (2010) Steroid receptor co-activator is required for juvenile hormone signal transduction through a bHLH-PAS transcription factor, methoprene tolerant. *J Biol Chem*, <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110.191684>.
- Zechel, C.; Shen, X.-Q.; Chen, J.-Y.; Chen, Z.-P.; Chambon, P.; Gronemeyer, H .** (1994) The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J* 13:1425–1433.
- Zufelato, M.S.; Bitondi, M.M.G.; Simões, Z.L.P.; Hartfelder, K.** (2000) The juvenile hormone analog pyriproxyfen affects ecdysteroid-dependent cuticle melanization and shifts the pupal ecdysteroid peak in the honey bee (*Apis mellifera*) *Arthropod Structure & Development*, 29:111-119.
- Zufelato, M.S.; Lourenço, A.P.; Simões, Z.L.P.; Jorge, J.A.; Bitondi, M.M.** (2004) Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochem Mol Biol*, 34(12):1257-1268.

ANEXOS

ANEXO 1

(A)

(B)

(C)

(D)

Figura 1: Organização em éxons e íntrons dos genes (A) *cryptocephal (crc)*, (B) *retinoid- and fatty acid-binding protein (RfaBp)*, (C) *ultraspiracle (usp)* e (D) *esterase do hormônio juvenil (jhe)* determinada através de anotação gênica utilizando o pacote de programa Artemis. Os retângulos representam os éxons e as linhas entre eles representam os íntrons. Os números indicam o tamanho de cada um em pares de bases. Abaixo temos uma tabela com os tamanhos dos éxons e íntrons de *RfaBp*.

Tabela 1: Tamanho, em pares de bases, dos éxons e íntrons que compõem o gene *RfaBp*

Éxon	Tamanho	Íntron	Tamanho
1	131pb	1	1806pb
2	175pb	2	507pb
3	183pb	3	266pb
4	4.422pb	4	1354pb
5	187pb	5	90pb
6	217pb	6	172pb
7	293pb	7	84pb
8	195pb	8	129pb
9	227pb	9	149pb
10	493pb	10	112pb
11	185pb	11	79pb
12	221pb	12	803pb
13	574pb	13	504pb
14	242pb	14	477pb
15	223pb	15	350pb
16	237pb	16	481pb
17	137pb	17	112pb
18	158pb	18	680pb
19	184pb	19	288pb
20	139pb	20	903pb
21	189pb	21	728pb
22	246pb	22	126pb
23	225pb	-----	-----

ANEXO 2

Sequência_obtida	-----AATCAGGACCAGGAAAGTTGGCTATGGAAGTTCGAGCCAGTGTCTCCTAAT
Sequência_predita	ATGATATCCAATCAGGACCAGGAAAGTTGGCTATGGAAGTTCGAGCCAGTGTCTCCTAAT *****
Sequência_obtida	GGAACACTGTCCAATAAATTTGAAGATGATTGGTTTTTATTGATGATAAATCTGTAGAT
Sequência_predita	GGAACACTGTCCAATAAATTTGAAGATGATTGGTTTTTATTGATGATAAATCTGTAGAT *****
Sequência_obtida	CCTACTAAAAAATTGCTGAACCTATTATGTATGAAGATCATCCTACTCGTGCACAAGTA
Sequência_predita	CCTACTAAAAAATTGCTGAACCTATTATGTATGAAGATCATCCTACTCGTGCACAAGTA *****
Sequência_obtida	GCTACGAACTTTTGGAAAAATTAGATGAATGGATTAAAGAAGAACCTTTTTCGGATTGG
Sequência_predita	GCTACGAACTTTTGGAAAAATTAGATGAATGGATTAAAGAAGAACCTTTTTCGGATTGG *****
Sequência_obtida	TTGGAGGAGAAAATAGAATTGCCTATTTTGAAGAACTGCCAATTACTGAAAATGGACAA
Sequência_predita	TTGGAGGAGAAAATAGAATTGCCTATTTTGAAGAACTGCCAATTACTGAAAATGGACAA *****
Sequência_obtida	ATTAAACAACACCATATAATGAAATTACAAAAGCTCCCCAGCAAGATGATACACAACT
Sequência_predita	ATTAAACAACACCATATAATGAAATTACAAAAGCTCCCCAGCAAGATGATACACAACT *****
Sequência_obtida	TTGCTACAAGAATTTGAAACTGTTCTGGGAGATGTGGAAGCTTGTCATCAAATAGTCCCT
Sequência_predita	TTGCTACAAGAATTTGAAACTGTTCTGGGAGATGTGGAAGCTTGTCATCAAATAGTCCCT *****
Sequência_obtida	TCATCAAGTTCCACTCTTACACCCCTCAATCACCTCCATCACATAAACCATTAAATATG
Sequência_predita	TCATCAAGTTCCACTCTTACACCCCTCAATCACCTCCATCACATAAACCATTAAATATG *****
Sequência_obtida	GATACTCAATTACTTGTACTTTACAACCAAGTACAACCATTATATCCTAATCATCAGTCC
Sequência_predita	GATACTCAATTACTTGTACTTTACAACCAAGTACAACCATTATATCCTAATCATCAGTCC *****
Sequência_obtida	ATATATGGTATGGTAGTTCCAGAGGAAAAATCATATATAAATGAAGTACGCGTATGGCAT
Sequência_predita	ATATATGGTATGGTAGTTCCAGAGGAAAAATCATATATAAATGAAGTACGCGTATGGCAT *****
Sequência_obtida	ACAAAAATGTACCATTAGACCAGATAAACACAGATGTTGCACATGACTTAGCTGTAGTG
Sequência_predita	ACAAAAATGTACCATTAGACCAGATAAACACAGATGTTGCACATGACTTAGCTGTAGTG *****
Sequência_obtida	GATGAATATGTACGTTTACATACAAAAGATATTCCACCATCTAGTCCTTGTACCAGTTCT
Sequência_predita	GATGAATATGTACGTTTACATACAAAAGATATTCCACCATCTAGTCCTTGTACCAGTTCT *****
Sequência_obtida	GGTGGTAGCTATATTTTCATCAGAAGATTCTGTGGATGATCCAGATTGGATTTTCGAATCC
Sequência_predita	GGTGGTAGCTATATTTTCATCAGAAGATTCTGTGGATGATCCAGATTGGATTTTCGAATCC *****
Sequência_obtida	GAAAAAAAATATGAAACAATCTACTTGTATTTCAACAAAAAATCGTCAAAAACCTTAT
Sequência_predita	GAAAAAAAATATGAAACAATCTACTTGTATTTCAACAAAAAATCGTCAAAAACCTTAT *****
Sequência_obtida	TCTCGTCCTTCAATTGAAGATAAAAAAGTTCGAAAAAAGAACAAAATAAAAATGCAGCC
Sequência_predita	TCTCGTCCTTCAATTGAAGATAAAAAAGTTCGAAAAAAGAACAAAATAAAAATGCAGCC *****
Sequência_obtida	ACACGATATAGACAGAAGAAAAACAAGAAATAAAAGAAATATTAGGTGAAGAACGTGAA
Sequência_predita	ACACGATATAGACAGAAGAAAAACAAGAAATAAAAGAAATATTAGGTGAAGAACGTGAA *****

Sequência_obtida	CTTACTGAACATAATGAAAACTAAAAAATCAAGTAACAGATTTACAACGAGAAATTGGA
Sequência_predita	CTTACTGAACATAATGAAAACTAAAAAATCAAGTAACAGATTTACAACGAGAAATTGGA

Sequência_obtida	TACTTAAAAGGCTTAATGAGAGATTTATTAAAGCTAAGGCT-----
Sequência_predita	TACTTAAAAGGCTTAATGAGAGATTTATTAAAGCTAAGGCTCTTATTAAATAA

Figura 1: Alinhamento das sequências de nucleotídeos obtida através de sequenciamento (Sequência_obtida) e predita obtida pelo pacote de programas Artemis, no genoma de *Apis mellifera* (versão 4.0) de *crc* de *Apis mellifera*, destacando nos retângulos as regiões ausentes no fragmento sequenciado. (*) indicam posições que possuem um único resíduo completamente conservado.

Tabela 1: Tamanho do gene e da proteína CRC e do domínio bZIP em número de aminoácidos ou nucleotídeos.

ESPÉCIE	Quantidade		
	Aminoácidos em CRC/ATF-4	Nucleotídeos <i>crc/atf-4</i>	Aminoácidos no domínio bZIP
<i>Apis mellifera</i>	357	1074	72
<i>Nasonia vitripennis</i>	434	1302	72
<i>Tribolium castaneum</i> - iso1	318	954	72
<i>Tribolium castaneum</i> - iso2	248	744	72
<i>Drosophila melanogaster</i> – isoA	381	1143	71
<i>Drosophila melanogaster</i> – isoB	298	894	71
<i>Bombyx mori</i>	236	708	71
<i>Aedes aegypti</i>	405	1215	71
<i>Culex quinquefasciatus</i>	305	915	71
<i>Mus musculus</i>	349	1047	70
<i>Bos Taurus</i>	348	1044	70
<i>Homo sapiens</i>	351	1053	70

```

Drosophila melanogaster - isoA MDATFHQTMESLQLPKELYWDLKMEPQSPTSVLGSDLFPLTDSNDTEWLY
Drosophila melanogaster - isoB -----
Apis mellifera -----MISNQDQESWLWKFEVPSPNGTSLSNKFEDDWFLFDD-KSV
Nasonia vitripennis -----MSSDQETTMLWKVEPLSPSGTPPLDIDEEWLCFDEEKPA
Tribolium castaneum - iso1 -----MSCAPFIIWKEEPLSPLSNEEVSWSLSDDTFYQTSTEH
Tribolium castaneum - iso2 -----
Aedes aegypti -----MESFQFLDTFDWEGKMEPSSPSQHSFGEELILEDYDFCND
Culex quinquefasciatus -----
Bombyx mori -----
Homo sapiens -----MTEMSFLSSEVLVGLDMSFPDQSGLGAEESLGLLDDYLE
Mus musculus -----MTEMSFLNSEVLAGDLMSPFDQSGLGAEESLGLLDDYLE
Bos Taurus -----MAEMSFLSSEVLGGDFVSPFDQLGLGAEESLGLLDDNLE

Drosophila melanogaster - isoA DDNFANGITLIGDDEALTLEEVASLQLLSDEEMVVEIFDLKDEECLLDQK
Drosophila melanogaster - isoB -----MSTYIFMQAYECLLDQK
Apis mellifera DPTKKIAEPIMYEDHPTRAQVAT---KLEKLD--EWIKEEPFSDWLEEK
Nasonia vitripennis VIESNGEESALYEEHLTRAQVAT---KFLEELKSWIKEESFADWLEEK
Tribolium castaneum - iso1 EHIKFEDDLVPCESKAEVASLML---ENLENLINLDELIKEEPSFLLDEK
Tribolium castaneum - iso2 -----MAVCYEPSFLLDEK
Aedes aegypti GLFNNALFDIVVETKPVIKSDDL---KDTTMVVVALPVEKVEKDQWLGEK
Culex quinquefasciatus -----
Bombyx mori -----
Homo sapiens VAKHFKPHGFSSDKAKAGSSEWLAVDG-LVSPSNNSKEDAFSGTDWMLEK
Mus musculus VAKHLKPHGFSSD--KAGSSEWPAMDDGLASASDTGKEDAFSGTDWMLEK
Bos taurus VAKHFKHHGFSCDKAKAGSSEWLAVDW--LVSDNSKEDAFSGTDWMVLEK

Drosophila melanogaster - isoA ATLNCIDYDSNSFQPNINVITQAIVPANKVQFG-----
Drosophila melanogaster - isoB ATLNCIDYDSNSFQPNINVITQAIVPANKVQFG-----
Apis mellifera IELPIFEELPITENGQIKTTPYNEITKAPQ-----
Nasonia vitripennis IDLPIFEELPAPECQGNRAVVYPNIVKPPPGQHVIIGQHQQQQQQQHQC
Tribolium castaneum - iso1 ILPNILDDVDQARAILPPPTKLEYVP-----
Tribolium castaneum - iso2 ILPNILDDVDQARAILPPPTKLEYVP-----
Aedes aegypti LKIPQLSAVAGGYVSAPAAPSALVGIAPELG-----PFPN
Culex quinquefasciatus ----MPQLAGSYVQSAVVP---LIAPEIG-----PFQP
Bombyx mori -----MSCRAMVSP---SRTARAG-----AVLA
Homo sapiens MDLKEFDLLDALLGIDDLTMP-----
Mus musculus MDLKEFDLFDALFRMDLDTMP-----
Bos Taurus MDLKEFDLFDILFSKDDLTMP-----

Drosophila melanogaster - isoA -----ASSDAASLPSAADYQLNDGPSLILQ-----QLTPPQSPPPQFDA
Drosophila melanogaster - isoB -----ASSDAASLPSAADYQLNDGPSLILQ-----QLTPPQSPPPQFDA
Apis mellifera -----DDTQTLLEQFETVLGDVEACHQIVPS-SSSTLTTPQSPPSHKF
Nasonia vitripennis HQQLLQVDATQSLLEFETVLGDVEACHQISASGVVSTLTTPQSPPPIVK
Tribolium castaneum - iso1 -----NTDTQFLLKEFENVYDVVELTH-----ETLTTPQSP-----
Tribolium castaneum - iso2 -----NTDTQFLLKEFENVYDVVELTH-----ETLTTPQSP-----
Aedes aegypti QRPVPKVQNTTEELMEFDYVYENVELTH-----LTTPQTTPPQEDQ
Culex quinquefasciatus Q-PAKVQNTTEELMEFDCYENVELTH-----LTTPQTTPPQEV
Bombyx mori SSPFVTSQPTTEELREFETVYGAVELTH-----LTTPQSPPGP--
Homo sapiens -----DDLTTLLDDTCDLFAPLVQETNKQ-----PPQTVNPIGH
Mus musculus -----DELLTTLLDDTCDLFAPLVQETNKE-----PPQTVNPIGH
Bos Taurus -----DELLATLDDTCDLFQPLVQETNKE-----PPQIVNPIGH

* : ***

Drosophila melanogaster - isoA YKQAGDAQPKPVLVKAQKQVQCYTPDVTHAASATPFN-----
Drosophila melanogaster - isoB YKQAGDAQPKPVLVKAQKQVQCYTPDVTHAASATPFN-----
Apis mellifera LNMDTQLLVTLQPVQPLYPNHQSIYGMVVPEEKSYIN-----
Nasonia vitripennis QHLVVAQNNNAHLLVALQPIHQSAFVYQGRHEESVAISPSGHVHHQQHPE
Tribolium castaneum - iso1 --HDYKILTTLEPLLQLPVVPEKLAYPTAMTPQ-----
Tribolium castaneum - iso2 --HDYKILTTLEPLLQLPVVPEKLAYPTAMTPQ-----
Aedes aegypti YHG-----AGEQPTYLSLPQQNPAPVGGSGEFYGYDGLNGGIVLNQIPT
Culex quinquefasciatus FVGQVQEQQSAPVFLAVQPEQQQVPTVIDEYGFAGPLNGLLVN----
Bombyx mori -----ATQLLSYAQQAQ-----
Homo sapiens LPESLTKPDQVAPFTFLQPLPLSPGVLSSSTPDHS-----
Mus musculus LPESLIKVDQVAPFTFLQPPFCSPGVLSSSTPEHS-----
Bos Taurus LPEGLPTIDQGAFTFFQPLPPSPGTLSSSTPDHS-----

Drosophila melanogaster - isoA -----FTNWVGSGSEIARENQLVDDIVNM
Drosophila melanogaster - isoB -----FTNWVGSGSEIARENQLVDDIVNM
Apis mellifera -----EVRVWHTKNVPLDQIN--TDVAHDLAVVVEIIRS
Nasonia vitripennis SYAVSSLGLNEPIEQQIAEHWSAENLSLVPLVHGSDDVAHELAKVDEYVRS
Tribolium castaneum - iso1 -----PDIAHELAVVDELVRT
Tribolium castaneum - iso2 -----PDIAHELAVVDELVRT
Aedes aegypti VVEQLPTAVVEPLQQVPGEYELADSFQFQPVGEEENIENNMLVVEIIRS
Culex quinquefasciatus ----SIQTIVQQAQVPGFQLANSFGFQPVDEE--NIARNLELVEEIVRS
Bombyx mori -----CTALAPPAPLAPPQEAQWQIVAPVPVNLPEGYECDLDAVEELVRH
Homo sapiens -----FSLELGSEVDITEGDRKPDY
Mus musculus -----FSLELGSEVDISEGDRKPDY

```

Bos Taurus	-----FSLELCSEVVIPEGDSKPD- :
Drosophila melanogaster - isoA	RAKELELSTNWQQLNEDCESQASSSLDSRSTGSGVCSS--IADADEDWVP
Drosophila melanogaster - isoB	RAKELELSTNWQQLNEDCESQASSSLDSRSTGSGVCSS--IADADEDWVP
Apis mellifera	HTKDIP-----PSSPCTSSGGSYISSEDSV-----DDPDWIF
Nasonia vitripennis	CAEDVSYNTSSSSSASSSGPPSPCASSNASCISEDST----DDPDWAY
Tribolium castaneum - iso1	RVEDMQWS-----SGPSSPNSSDCSS-----DDPEWMP
Tribolium castaneum - iso2	RVEDMQWS-----SGPSSPNSSDCSS-----DDPEWMP
Aedes aegypti	RSKDLPCNDDDDSCSSSEDSVSSSCPMSTSSSYCGSAYSQDDEWSP
Culex quinquefasciatus	RSKDLPCNEDDDSCSYSEADSSSPQSDSSSSSSSYCGSAYSQDDEWSP
Bombyx mori	RASQLASPOHSSSSANASPRSSPPSPRSS-----TDEDWS-
Homo sapiens	TAYVAMIPQCIKEEDTPSDNDSGICMSPESYLGSPQHSPSTR-GSPNRS
Mus musculus	AAAYITLIPPVKEEDTPSDNDSGICMSPESYLGSPQHSPSTR-RAPPDNL
Bos Taurus	-STTTGFPQCIKEEDAPSDNDSGICMSPDSSSLGSPQDSPSTRSGSPNKSL
Drosophila melanogaster - isoA	ELISSSSSPAPTTIEQSASQPKKRTRTYGRG-VEDRKIRKKEQNKNAA
Drosophila melanogaster - isoB	ELISSSSSPAPTTIEQSASQPKKRTRTYGRG-VEDRKIRKKEQNKNAA
Apis mellifera	E-----SEKKNMQSTCISTKNRQKPYSRPSIEDKKVRKKEQNKNAA
Nasonia vitripennis	EPSTS--SGSRRVSQGRSAGRRSSSKPYSRPNVEDKRVKKEQNKNAA
Tribolium castaneum - iso1	EP-----VESYDGSASSPKQARKRAKPYSTRSPVDKKSRRKKEQNKNAA
Tribolium castaneum - iso2	EP-----VESYDGSASSPKQARKRAKPYSTRSPVDKKSRRKKEQNKNAA
Aedes aegypti	SSN-----YKKVAGGGVSKKRTRPYGRG-IEDKKSRRKKEQNKNAA
Culex quinquefasciatus	TSSSS--GNRRTSKTSSGGVSKKRTRPYGRG-VEDKKSRRKKEQNKNAA
Bombyx mori	-----APSRLLKTRP-VDDRRSRRKKEQNKNAA
Homo sapiens	PSPGVLCGSARPKPYDPPGEKMVAAKVKEK--LDKLLKKMEQNKTAAT
Mus musculus	PSPGGSRGSRPKPYDPPG-VSLTAKVTEK--LDKLLKKMEQNKTAAT
Bos Taurus	LSPGALSGSSRPKPYDPPGEKMVAAKVKEK--LDKLLKKMEQNKTAAT
	: . *: : * *****
Drosophila melanogaster - isoA	YRQKKKLEMENVLGEEHVL SKENEQLRRTLQERHNEMRYLRQLIREFYHE
Drosophila melanogaster - isoB	YRQKKKLEMENVLGEEHVL SKENEQLRRTLQERHNEMRYLRQLIREFYHE
Apis mellifera	YRQKKKQEIKEILGEEREL TEHNEKLKNQVTDLQREIGYLRKGLMRDLFKA
Nasonia vitripennis	YRQKKKQEIKLILGEEQELAGRNDKLQAQVKDLQREIGYLRKGLMRDLFKA
Tribolium castaneum - iso1	YRMKKKAEEVEVLSEKQLSMKNEELDAKINDLQREIKYLRKGLMRDLFKA
Tribolium castaneum - iso2	YRMKKKAEEVEVLSEKQLSMKNEELDAKINDLQREIKYLRKGLMRDLFKA
Aedes aegypti	YRQKKKAEEIEILIVERQLKEKNDELKKSADIGREIRYLKSLMREVCCKA
Culex quinquefasciatus	YRQKKKAEEIEILIEENQLRDINEELKKSADIGREIRYLKSLMREVCCKA
Bombyx mori	YRQKKKAEEVEVLSEKQLSMKNEELDAKINDLQREIKYLRKGLMRDLFKA
Homo sapiens	YRQKKRAEQEALTGECKELEKKNEALKERADSLAKEIQYLRKDLIEEVRKA
Mus musculus	YRQKKRAEQEALTGECKELEKKNEALKERADSLAKEIQYLRKDLIEEVRKA
Bos Taurus	YRQKKRAEQEALTGECKELEKKNEALKERADSLAKEIQYLRKDLIEEVRKA
	** *: : * : . * : * . *: **: : : : :
Drosophila melanogaster - isoA	RKR----
Drosophila melanogaster - isoB	RKR----
Apis mellifera	KGLIK--
Nasonia vitripennis	KGLIK--
Tribolium castaneum - iso1	KGLIN--
Tribolium castaneum - iso2	KGLIN--
Aedes aegypti	KGLLE--
Culex quinquefasciatus	KGLI---
Bombyx mori	KGLIK--
Homo sapiens	RGKKRVP
Mus musculus	RGKKRVP
Bos Taurus	REKKRVL
	:

Figura 2: Alinhamento das seqüências de aminoácidos de CRC e ATF-4 de algumas espécies que mostraram similaridade com CRC de *Apis mellifera*. Retângulos pretos: regiões de similaridade que correspondem ao domínio conservada bZIP, grifada em amarelo: região básica do domínio bZIP, grifada em cinza: leucinas que formam os zíperes de leucina do domínio bZIP, (*abdcefg*) acima do segundo retângulo preto indica os grupos de sete aminoácidos que formam os zíperes de leucina nos quais a leucina está sempre na posição *d* indicado com traços verticais ligando *d* à primeira leucina, e acima destes grupos de sete aminoácidos está a indicação de quantos são em ordem (1, 2, 3, 4, 5 e 6); (*) indicam posições que possuem um único resíduo completamente conservado; (:) indicam que houve substituição de um resíduo por outro com características semelhantes, pertencentes a um mesmo grupo (ácido, básico ou neutro), o que não altera a característica geral da proteína.

```

1 - ATAGCCAACCAACCAACAGCTAAGAATGGAAAGAGCATCTCCATCACTGTCACCAGCGAT - 60
1 - I A N Q P T A K N G K S I S I T V T S D - 20

61 - GGCAAGAATATTGTAAGTGAAGCACAAGCTACAAGCATCGCGATGAGGAAGGAAAGATC - 120
21 - G K N I V T G S T S Y K H R D E E G K I - 40

121 - GTGGTGGAGGGTAGTGGAAATCTGAAAGTTGGCGACAATACGAGAAGCTCATCCTTCAAA - 180
41 - V V E G S G N L K V G D N T R S S S F K - 60

181 - TACACCCGTCAACGATTAAGTCAATGAAAAAGACGGTGAGGCGGGTGTGCGATAGTTTTG - 240
61 - Y T R Q R L T H E K D G E A G V A I V L - 80

241 - AACGCCAACCTCGGCCCATCCGCCATAGTGGGTGAACTGAAACTCTCTAACAAGGAGTTA - 300
81 - N A N L G P S A I V G E L K L S N K E L - 100

301 - CATCTCTTCAACAGCTATTGCGAGCAGAACAAGGATTGCGCTCAGTTCAAGCTTCAATCG - 360
101 - H L F N S Y C E Q N K D C A Q F K L Q S - 120

361 - ATCCTCAACGTCGAAAAGAAAACTCTATTGAAACATCAGGTGACGGTGGAAGTCGATTTG - 420
121 - I L N V E K K T L L K H Q V T V E V D L - 140

421 - AAAAAGTTCAACGTACCCGTCGAATTTGGTCTGAAGACCAATACAGAGTTCAAAAACCCG - 480
141 - K K F N V P V E F G L K T N T E F K N P - 160

481 - ATATTCGACCACACAACCAACCTCTATCTACATTCCTCGAAAGACAAGACTGAGTACACT - 540
161 - I F D H T T N L Y L H S S K D K T E Y T - 180

541 - TATCAAGCTTATATTCATCCCAAAGAAGCAGCT - 573
181 - Y Q A Y I H P K E A A - 191

```

Figura 3: Sequência nucleotídica do fragmento de *RfaBp* obtido por sequenciamento e sequência deduzida de aminoácidos.

(A)

Sequencia_Predita	ATCCATGCTGAAATAGCCAACCAACCAACAGCTAAGAATGGAAAGAGCATCTCCATCACT
Sequencia_obtida	-----ATAGCCAACCAACCAACAGCTAAGAATGGAAAGAGCATCTCCATCACT *****
Sequencia_Predita	GTCACCAGCGATGGCAAGAATATTGTAAGTGAAGCACAAGCTACAAGCATCGCGATGAG
Sequencia_obtida	GTCACCAGCGATGGCAAGAATATTGTAAGTGAAGCACAAGCTACAAGCATCGCGATGAG *****
Sequencia_Predita	GATGGAAAGATCGTGGTGGAGGGTAGTGGAAATCTGAAAGTTGGCGACAATACGAGAAGC
Sequencia_obtida	GAAGGAAAGATCGTGGTGGAGGGTAGTGGAAATCTGAAAGTTGGCGACAATACGAGAAGC **,:*****
Sequencia_Predita	TCATCCTTCAAATACACCCGTCACGATTAACTCATGAAAAAGACGGTGAGGCGGGTGT
Sequencia_obtida	TCATCCTTCAAATACACCCGTCACGATTAACTCATGAAAAAGACGGTGAGGCGGGTGT *****
Sequencia_Predita	GCGATAGTTTTGAACGCCAACCTCGGCCCATCCGCCATAGTGGGTGAAGTGAAGTCTCT
Sequencia_obtida	GCGATAGTTTTGAACGCCAACCTCGGCCCATCCGCCATAGTGGGTGAAGTGAAGTCTCT *****
Sequencia_Predita	AACAAGGAGTTACATCTCTTCAACAGCTATTGCGAGCAGAACAAAGGATTGCGCTCAGTTC
Sequencia_obtida	AACAAGGAGTTACATCTCTTCAACAGCTATTGCGAGCAGAACAAAGGATTGCGCTCAGTTC *****
Sequencia_Predita	AAGCTTCAATCGATCCTCAACGTCGAAAAGAAAAGTCTATTGAAACATCAGGTGACGGTG
Sequencia_obtida	AAGCTTCAATCGATCCTCAACGTCGAAAAGAAAAGTCTATTGAAACATCAGGTGACGGTG *****
Sequencia_Predita	GAAGTCGATCTGAAAAAGTTCAACGTACCCGTCGAATTTGGTCTGAAGACCAATACAGAG
Sequencia_obtida	GAAGTCGATTTGAAAAAGTTCAACGTACCCGTCGAATTTGGTCTGAAGACCAATACAGAG *****
Sequencia_Predita	TTCAAAAACCCGATATTGACACACAACCAACCTCTATCTACATTCTCGAAAGACAAG
Sequencia_obtida	TTCAAAAACCCGATATTGACACACAACCAACCTCTATCTACATTCTCGAAAGACAAG *****
Sequencia_Predita	ACTGAGTACACTTATCAAGCTTATATTCATCCCAAAGAAGCAGCTACCATCCTGACTTTG
Sequencia_obtida	ACTGAGTACACTTATCAAGCTTATATTCATCCCAAAGAAGCAGCT----- *****

(B)

Sequência_predita	IHAELIANQPTAKNGKSISITVTSKGNIIVTGSTSYKHRDEGDKIVVEGSGNLKVGDNTRS
Sequência_obtida	---IANQPTAKNGKSISITVTSKGNIIVTGSTSYKHRDEGDKIVVEGSGNLKVGDNTRS *****,:*****
Sequência_predita	SSFKYTRQRLTHEKDGEAGVAIVLNANLGPSAIVGELKLSNKLHLFNSYCEQNKDCAQF
Sequência_obtida	SSFKYTRQRLTHEKDGEAGVAIVLNANLGPSAIVGELKLSNKLHLFNSYCEQNKDCAQF *****
Sequência_predita	KLQSI LNVEKKTLLKHQVTVEVDLKKFNPVVEFGLKTNTNTEFKNPIFDHTTNLYLHSSKDK
Sequência_obtida	KLQSI LNVEKKTLLKHQVTVEVDLKKFNPVVEFGLKTNTNTEFKNPIFDHTTNLYLHSSKDK *****
Sequência_predita	TEYTYQAYIHPKEAATILTLPSREVALILIYDVPKTRQTAAAYKLDVSLYLDKRNKPSEKT
Sequência_obtida	TEYTYQAYIHPKEA----- *****

Figura 4: Sequências de RFABP predita e obtida mostrando o somente a região em que o fragmento obtido se alinha. A: sequência de nucleotídeos; B: sequência de aminoácidos. Grifado em amarelo: em (A) nucleotídeo diferente entre a sequência obtida e a predita, em (B) aminoácido diferente entre a sequência obtida e a predita. (*) indicam posições que possuem um único resíduo completamente conservado; (:) indicam que houve substituição de um resíduo por outro com características semelhantes, pertencentes a um mesmo grupo (ácido, básico ou neutro), o que não altera a característica geral da proteína.

Apis_melifera	-----IANQPTAKNGKSISITVTS DGKNIVTGSTSYKHRDEE
Nasonia_vitripennis	DSDKLKYRKIHAEIANKPSTPDGRAIFITVTS DGKNLVTGSTNYKRHEED
Tribolium_castaneum	NAPTLLKIDKYVIEAQNKP-AKTGRRIQVTAKSGNKNILAGSTSYTAREEH
Galeria_mellonella	NSEKLGKKNYKVDVATKDANNNGKRLEFQATNDNKNVLSGSTTFISKQEN
Bombix_mori	NAKELGWKNYGIDISSKDSGS-GKRLEFHATNDNKNVLSGSTSFISKQEG
Aedes_aegypti	DAPKLDAAKITVEINSKP-GNSGKGVEFKASSDGKNVLSGFADYSVKEQG
Culex_quinquefasciatus	DAPKLNANKVSVELHSP-KNSGKGVEFKASSDGKNILSGYADYSVKEQG
Anopheles_gambiae	DAPMLNTNKFVSEVNAKP-GSNGKGVNFRASEGGKDILSGFADYSVKEQG
Locusta_migratoria	DSPKFNFNKHLEAGQRA-AKGSKRIVFTAKSAEKVLFSGSTNFHSHKAEN
Drosophila_melanogaster	SSKKLKL DGYELEAQAQ-----KNIKIQLKNENGIIFSGTATYALKKEL
	: : : . . . : : * : : : :
Apis_melifera	GKIVVEGSGNLKVGDNTRSSSFKYTRQRLTHEKDGEAGVAIVLNA-NLGP
Nasonia_vitripennis	KKITLEGNGSLKIGENTKSSSFKYVRKQLTRENDKEVGVAIMLNA-SFGP
Tribolium_castaneum	GKVIIIEGSGSFKLHDETKSANFKYIRQNLVQAKNGETGIEISFDA-SLGN
Galeria_mellonella	KKTIIIEGSGTLKVKEEQKSANFKYIRITILTEGN--EQGVETFLNL-AVGE
Bombix_mori	QKTIIIEGSGSVKVKEEQKSANFKYIRITVFTDSN--EKGVETFFNV-ALGE
Aedes_aegypti	KSTVIEGQGNVKLYDKQQTASFVLVREKLQEAG-----YAFTLSG-SVGK
Culex_quinquefasciatus	KTTIIIEGQGNVKLYDKQQTASFVLVREKLSSEG-----YALNLAG-SVGK
Anopheles_gambiae	KAMVIEGQGNVKLYDKQQTATFVKLIREKLSSEG-----MSATLTA-SVGK
Locusta_migratoria	NKISYSGNGQVRIGDKAHAFNFRSSRQNLIQDANKEIGVEYNLDFXIAGH
Drosophila_melanogaster	NKTIIDGQKQVQYQKALSGNFKLTRQHFDFGTDREVGFSTYFMG-NLGS
	. * . * : : : . * : * : : *
Apis_melifera	SAIVGELKLSNKLHLFNSYCEQNK-DCAQFKLQSI LNVE--KKTLLKHQ
Nasonia_vitripennis	SGIVGELKLS DKEVLVFN SYCEQSK-DCAQFKLQSTLDTD--HLTHLNHN
Tribolium_castaneum	KAIDAELKITDKQFRI LNSYCEEK-QCAHVEVDVKT'TVD--DVKA FNQE
Galeria_mellonella	SSYVAESRITNLEYKNSYVYCEEK-QCAHVELNSKVNIQ--KPGVVQHT
Bombix_mori	RSYVAESRVTNIEYKNSYVYCEEK-QCAHAEIQSKIDMS--TPGMIVNV
Aedes_aegypti	NSVSTEVVRKPNDFKLKHTVCDEKK-KCTNVEVQSKLER---VGEKFNHE
Culex_quinquefasciatus	NSITTEVRVKPNDFLLKHTVCDEKK-QCTNVAVQSKLER---AGDKFNHE
Anopheles_gambiae	FTVLHESRVQPNDFRVKTSVCDEKK-KCTKLELLSKLER---AAGAFKHE
Locusta_migratoria	GSLHNILKVTNKLHALGKQCSEKGPNCVVEIKSKVSA--DAKETHTD
Drosophila_melanogaster	KNGLGTLKITNKEFNTKFSVCEEK-QCTNLIVQSIVSIDEQKLDAVEHT
	: : : * : : . * : : :
Apis_melifera	VTVEVDLKKFNVPVEFGLKTNTEFNKPIFDHTTNLYLHSSKDKTEYTYQA
Nasonia_vitripennis	LQVEVNLKKFNVPVEFGLMSSTKYADYSLDHQANLYLHSSKDRTOYTYHV
Tribolium_castaneum	IEIAIDLRLKGLSHEFGLKAVTTRKEYVLDHTVDMHFQS-QENSKYQYSL
Galeria_mellonella	VNVNFDLVKLGISPEFGLQITNEISEKKLPQYT-LDLHAIKNDKKYHLNI
Bombix_mori	INAGLDLRKLGVAPELGLQMRDEVSDRRPPRFT-LDLHINKEDRKYHLHA
Aedes_aegypti	ALISVDLQQLGYVYEFGLNSKTSNGFTLDHTTDVELKE-KQQPKYQYHL
Culex_quinquefasciatus	AQISVDLQQLGYDHEFGLSAKTQNGFTLDHTTDVKLSE-KKQPKYQYQL
Anopheles_gambiae	ALVSVEVQMGYEHFGLSAKTSANGLKFDHTTDVQLKE-KNQPKYQYLF
Locusta_migratoria	LVFLVDLKS VGVDTGVAFTAETVRRGFWLIDEQASLTLSHNGETTYKYKG
Drosophila_melanogaster	TLIIIVDLRDFGYPYEFELKSQNTROGLKYQYHLDSFIIT-GNNFKYQFTA
	. : . . . : : *
Apis_melifera	YIHPK-----EAAX-----
Nasonia_vitripennis	YSNKR----ESA AVLSPSRELAI VAFHDVPTV--KHSGAYKIDISLYLD
Tribolium_castaneum	YVHPN----QAGVSLTTPKRI I ALESKINVP SK--FLQDGGSVS GEVFFY
Galeria_mellonella	YSHPELGKFPAGITVTLPHRVLALETRVEYPTN--KGLPFPKIGEITIH
Bombix_mori	YNTPENGHYASGVTVRLPSRVMAL EYTLTHPTS--KDL PFPKIGEACLDL
Aedes_aegypti	YLHPH----SAGASLVLPTRSLVVEGVFNYPKD--QFGKYDSTVS FYLDK
Culex_quinquefasciatus	FIHPN----EAGARLILPSRSIALEGNFHYPK--KFGKYDSTVS FYLDK
Anopheles_gambiae	YVHPT----SAGASLILPRTVAVEGVNLNLPKD--KFGPFDGSVS FYLDK
Locusta_migratoria	YLKES----GSGFTLTLPSRVIAAEVKLSSDVK--PNHKKQKQISASVWLD
Drosophila_melanogaster	NVQPT----SSTIKLALPKRQILFETTQKIPADGSLFGRYEQTASFFIDK
	:

Figura 5: Alinhamento das sequências de aminoácidos de RFABP, apolipoforinas de algumas espécies que mostraram similaridade com RFABP de *Apis mellifera*. Nesta figura está representada somente a região onde houve alinhamento das sequências. (*) indicam posições que possuem um único resíduo completamente conservado; (:) e (.) indicam que houve substituição de um resíduo por outro com características semelhantes, pertencentes a um mesmo grupo (ácido, básico ou neutro), o que não altera a característica geral da proteína.

ANEXO 3

ANEXO 3A - LISTA DO EXCEL DEGs

(vide CD)

ANEXO 3B

Tabela 1: Análises de GO mostrando os processos biológicos nos quais estão envolvidos a maior parte dos genes diferencialmente expressos entre as amostras controle e tratadas com dsGFP. Estes processos provavelmente são afetados pelo tratamento com dsGFP e portanto, poderão resultar em um falso positivo nas análises, dependendo do gene alvo estudado. **Células em cinza escuro:** categorias representadas por genes com níveis de expressão aumentados pelo tratamento com dsGFP, **células em cinza claro:** categorias representadas por genes com níveis de expressão diminuídos pelo tratamento com dsGFP.

Processo Biológico
Processo metabólico
Regulação da expressão gênica
Transporte
Localização celular
Desenvolvimento da musculatura esquelética
Organização da sinapse
Sinalização celular
Desenvolvimento
Morte celular
Morfogênese
Resposta imune
Reprodução
Organização da cromatina
Neurogênese

Tabela 1: “top list” dos genes diferencialmente expressos entre amostras controle e tratadas com dsGFP, para os quais se deve ter atenção quando experimentos de tratamento com RNA de fita dupla forem analisados. **Células destacadas em cinza escuro** : indicam genes que tiveram seus níveis de expressão aumentados nas amostras dsGFP; **células destacadas em cinza claro**: indicam genes que tiveram seus níveis de expressão diminuídos nas amostras dsGFP. *Optamos por manter a descrição das funções biológicas dos genes em inglês devido à falta de termos, em alguns casos, que traduzisse seu real significado.

GB/nome do gene	Processo Biológico
GB15413 - HNK-1	Processo biossintético de carboidratos
GB17328 - Mblk-1	Ativação da atividade de caspases, indução de apoptose por hormônios, morte celular autofágica.
GB10201 bHLH-PAS	Regulação da transcrição
GB12218 His1	Compactação e descompactação da cromatina
GB18593	Transporte transmembrana
GB20148 pyd3	Processo biossintético de pirimidinas
GB17541	Regulação positiva da apoptose
GB10133 – superóxido dismutase (Sod1)	Determinação do tempo de vida do adulto, resposta a stress oxidativo
GB13038	Citocinese na meiose masculina, desenvolvimento da espermatíde, crescimento do espermátócito primário, divisão do espermátócito.
GB13879	desconhecida
GB13812 – spatzie	Estabelecimento do eixo dorsal-ventral, resposta imune inata
GB17681 – Actina	Individualização espermática, comportamento agressivo entre machos; citocinese, desenvolvimento dos corpos cogumelares (mushroom body), manutenção da localização de proteínas na célula, fagocitose.
GB12312	Desconhecida
GB13094	Desconhecida
GB14564 - viking (vkg)	Morfogênese dos túbulos de Malpighi, desenvolvimento do músculo esquelético.
GB12586 - Protein disulfide-isomerase precursor (PDI)	Dobramento de proteínas
GB10459 - clumsy	Transporte de íons.
GB14742	Desconhecida
GB14309	Proteólise
GB12378	Morte celular autofágica,

ANEXO 4

Figura 1: Quantificação relativa de mRNAs em operárias de *Apis mellifera* para os genes *cryptocephal* (*crc*), *retinoid- and fatty acid-binding protein* (*RfaBp*) e *ultraspiracle* (*usp*) tratadas no segundo estágio larval, L2 com 1,0 µg de *dscrc* (n=8) ou 1,0 µg de *dsRfaBp* (n=10) ou 5,0ug de *dsusp* (n=4); tratadas com 1,0 µg ou 5,0 µg de dsGFP e asmotras controle, para as quais nenhum tipo de tratamento foi administrado. Este resultados mostram o efeito do dsRNA utilizado como controle, dsGFP, na expressão dos genes alvo. Os indivíduos tratados foram coletados em L5S1 (*crc* e *RfaBp*) e PP e Pbl (*usp*). Os valores de expressão obtidos para o gene codificador de RP-49 foram utilizados para normalização da expressão de dos genes alvo. Os dados de cada grupo correspondem à expressão da média de amostras contendo 1 indivíduo cada, e as linhas representam o desvio padrão das amostras, obtido de acordo com o que foi proposto por Livak & Schmittgen (2001).

ANEXO 5

ANEXO 5A - Tabela Excel DEGs RxOP
(vide CD)

ANEXO 5B -Tabela de GO

(vide CD)

ANEXO 6

Figura 1: Quantificação relativa de microRNAs: *ame-miR-1*; *ame-miR-263b*; *ame-miR-2796*; *ame-miR-989*; *ame-miR-8*; *ame-miR-12*; *ame-let-7*; *ame-miR-278* e *ame-miR-34*; em rainhas e operárias de *Apis mellifera* nas fases L5F3 (5º instar larval – fase de alimentação 3), S2 (5º instar larval – fase de spinning 2) e Pb (pupa de olho marrom). Os valores obtidos para o pequeno RNA nuclear U6 foram utilizados para normalização. Os dados de cada grupo correspondem à expressão da média de 3 amostras para cada casta em cada fase do desenvolvimento, e as linhas representam o desvio padrão das amostras, obtido de acordo com o que foi proposto por Livak & Schmittgen (2001). Asteriscos representam diferença estatística significativa de acordo com Teste Mann-Whitney ($p < 0,05$) entre as amostras tratadas e controle.

ANEXO 7

Tabela 1: Genes diferencialmente expressos entre rainhas e operárias compartilhados entre os resultados obtidos neste trabalho e aqueles encontrados por Barchuk et al. (2007). **Destacados em cinza escuro:** genes preferencialmente expressos em rainhas; **destacados em cinza claro:** genes diferencialmente expressos em operárias de acordo com os resultados dos dois trabalhos; **destacados sem preenchimento:** genes preferencialmente expressos em rainhas de acordo com Barchuk *et al.* (2007), mas preferencialmente expressos em operárias de acordo com o presente trabalho. Função biológica determinada de acordo com o banco de dados disponível no FlyBase (www.flybase.org)

GB - nome do gene	Função Biológica
GB17384	Desconhecida
GB11403	Desconhecida
GB12033	Desconhecida
GB12215 - DnaJ-like-2 (Droj2)	Neurogênese
GB14059 - Nucleosome assembly protein 1 (Nap1)	Regulação da transcrição, dependente de DNA; montagem do nucleossomo
GB14193 TweedleE \TwdIE	Formação da cutícula
GB19085 - pdgy	Catabolismo de ácidos graxos e triglicerídeos, biossíntese de acetil-CoA, regulação negativa da via de sinalização do receptor de insulina
GB19712 – Shawn	Transporte
GB15978	Transporte intracelular de proteínas
GB16184 - Acyl-CoA synthetase long-chain (Acs1)	Direcionamento axonal, regulação positiva do sequestro de triglicerídeos, desenvolvimento do sistema nervoso
GB11456 - Cellular Repressor of E1A-stimulated Genes (CREG)	Regulação negativa da transcrição
GB11814	Desconhecida
GB15002	Fosforilação de proteínas
GB16686	Desconhecida
GB16903	Morte celular autofágica,
GB17380 - failed axon (fax)	Axogênese
GB17444 - Mucin 91C	Neurogênese
GB17541	Regulação positiva da apoptose
GB17793 - Cyp9f2	Desenvolvimento do disco imaginal de asa
GB18004	Processos metabólicos do piruvato
GB19030	Processos metabólicos envolvendo aldeído

ANEXO 8

Hormonal regulation of *EcR* gene expression during post-embryonic development in honeybee castes

Aline C. Aleixo Silva¹, Tathiana R.P. Mello¹, Angel Roberto Barchuk², Zilá L.P. Simões³

¹Depto. Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Cep. 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

²Depto. Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, Rua Gabriel Monteiro Silva 714, Cep. 37130-000, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

³Depto. Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Cep. 14049-901, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Corresponding author: A.C. Aleixo Silva

aline@usp.br

aleixoac@gmail.com

Keywords:

Apis mellifera; caste; ecdysone receptor, ecdysteroids, juvenile hormone.

Abstract

Insects' development, metamorphosis, reproduction and aging are controlled by a large number of factors that include two main hormones: 20-hydroxyecdysone (20E) and juvenile hormone (JH). 20E molecular action is well defined in *Drosophila melanogaster*. It binds to ecdysone receptor (EcR) which forms a heterodimer with ultraspiracle (USP). EcR may also act as a homodimer in some arthropods. Both EcR and USP are members of the nuclear receptor (NR) superfamily. Here we describe two transcript isoforms of *Apis mellifera* EcR: *EcR-A* and *EcR-B*. They differ in the N-terminal domain and in their expression profiles. While *EcR-A* is the predominant isoform in post-embryonic development, *EcR-B* has higher transcript levels in embryos. Further studies may show if it is as result of changes in transcription machinery affinity after larval eclosion or if *EcR-B* is maternally transported to oocytes during embryogenesis. In larval and pupal development, *EcR-B* seems to be basally and constitutively expressed while *EcR-A* presents a profile which is higher in workers than queens and seems to be antiparallel to hormonal levels most of the development. Expression profiles and the results of hormonal treatments suggest that low concentrations of 20E induce EcR expression, whereas higher titers of it inhibit the expression of both isoforms. Application of JH also led to a decrease in EcR transcripts in most cases, but a slight increase was observed in some cases in workers, which might explain this caste's higher levels of EcR-A in larvae and pupae related to queens. Our results suggest that *EcR* isoforms have different roles in *A. mellifera* development. New studies are being conducted in order to elucidate hormonal regulation of this NR, specifically the role of makisterone A, which is probably the major ecdysteroid compound in bees prepupal hemolymph.

1. Introduction

Metamorphosis is an important process that involves, in insects, destruction of larval tissues and their substitution by adult tissues, which in most of cases, are extremely different from the old ones (Gilbert, 1994). In those animals the process of metamorphosis is under hormonal control, mainly the morphogenetic hormones ecdysteroids, represented by 20-hydroxy-ecdysone (20E) and juvenile hormone (JH) (Nijhout, 1994; Riddiford, 1994; Lan et al., 1999). JH and 20E are highly versatile hormones, coordinating development, growth, reproduction and aging in insects. Pulses of 20E provide key signals for initiating developmental and physiological transitions, while JH promotes or inhibits these signals in a stage-specific manner (Flatt et al., 2008). In general, morphogenetic hormones act through nuclear receptors binding. Hormone-regulated nuclear receptors (NRs) are hormone response elements crucial for the coordination of biological processes underlying reproduction, metabolism and development in animals (Richards, 1981) regulating gene expression (Truss and Beato, 1993; Cherbas, 1993). NRs proteins, in general, are subdivided into four independent but interacting functional modules called domains. A/B is a highly variable modulator of gene expression domain. The second one, C domain, is DNA-binding domain (DBD). D or hinge domain provides a link between DBD and the next domain, LBD, a multifunctional domain that mediates ligand binding, dimerization, interaction with heat shock proteins, nuclear localization, and transactivation functions. (Evans, 1988; Green & Chambon, 1988; Beato, 1989; Mangelsdorf et al. 1995; Giguère, 1999). Functional NRs form homodimers and/or heterodimers that recognize specific DNA sequences to play their main role i) as repressors in the absence of a ligand molecule and maintain target gene inhibition by co-repressor complexes or ii) as activators of the target genes, in the presence of hormone, recruiting co-activator proteins and displacing co-repressors (Chawla et al. 2001; King-Jones and Thummel 2005; Mangelsdorf and Evans 1995).

The ecdysteroid receptor is a heterodimeric NR formed by ecdysone receptor (*EcR*) and *ultraspiracle* (*usp*) genes products. *usp* is an ortholog of vertebrates retinoid-X receptor (RXR) (Yao et al., 1992, 1993), considered at first as an orphan NR, but some studies have suggested it as a JH receptor, besides acting as part of ecdysteroid receptor (Xu et al., 2002; Barchuk et al., 2004), and indicating a cross-talk between ecdysteroid and JH action (Bitra and Palli, 2009). In *Drosophila*, EcR gives rise to three different isoforms, *EcR-A*, *EcR-B1* e *EcR-B2* (Yao et al., 1993; Talbot, 1993), differentially expressed in a tissue- and stage-specific manner (Robinow et al., 1993; Truman et al., 1994). It acts through ecdysone binding regulating an auto-regulatory pathway that promotes an increase of its protein in response to the ligand (Grebe et al., 2003; Lezzi et al., 2002) and stimulates gene expression networks stimulated by those hormones and EcR-dependent (Beckstead et al., 2005; Gauhar et al., 2009).

Here we identified two *Apis mellifera* EcR isoforms, which showed to be very similar in their nucleotide and amino acid contents, except by the N-terminal region of the protein that encodes A/B

domain. Their expression profiles in queens and workers development presented significant differences, especially when the levels of each isoform were compared. We also found differences in those levels related to caste in specific developmental points. Surprisingly, artificially increased titers of morphogenetic hormones 20E and JH, cause EcR-A and EcR-B levels to decrease, indicating an antiparallel regulation by the levels of these hormones. Taken together, these results suggest a complex regulation of EcR, related to caste- and stage-specific levels of EcR each isoform.

2. Materials and Methods

2.1. Bioinformatics

The putative *EcR* gene was identified in the *A. mellifera* genome by homology-based searches using tools from University of São Paulo at http://zulu.fmrp.usp.br/beelab/bioinfo_blast, National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and Honeybee Genome Database, Baylor College of Medicine (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>). Manual annotation of *EcR* gene was carried out using Artemis platform (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>) with a previously known expressed sequence tag for EcR protein (GenBank accession number AB095514) and a cDNA fragment cloned and sequenced in our laboratory. Phylogenetic tree was obtained by Maximum Parsimony method with bootstrap re-sampling using ClustalW-aligned sequences (<http://align.genome.jp/>) in MEGA3.1 software (Kumar et al., 2004).

2.2. Bees and hormone treatments

Honeybee embryos, larvae and pupae were obtained from *A. mellifera* colonies (Africanized hybrids) maintained at the Experimental Apiary of the University of São Paulo at Ribeirão Preto, Brazil as reported previously (Barchuk et al., 2008). The developmental stages were classified according to Michelette and Soares (1993; see Table 3), considering eye color and absence or presence and intensity of cuticle pigmentation. At the appropriate time, pupae were immersed in TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies) and frozen at -80°C until RNA extraction.

For the analysis of *EcR* expression response to artificially augmented levels of hormones, brown-eyed, unpigmented cuticle pupae (Pb) were removed from the brood frames and maintained in an incubator at 34°C and 80% relative humidity. At least three groups of 3-7 pupae were injected 5µg of 20-hydroxyecdysone (20E; Sigma; in 2µL of ethanol-Ringer solution 12.5%) or topically-applied 10µg of juvenile hormone III (JH-III; Fluka, in 2µL acetone), and the RNA samples from fat bodies were obtained after 1, 12, 24 and 48h (independent experiments). Control pupae received 2µL of the respective solvents. The amount of applied hormone was based on our previous experiments in which we examined the hormonal induction of gene expression during pupal development (Barchuk et al.,

2002, 2004). Fat bodies were obtained after practicing a longitudinal incision in isolated pupa abdomen and keeping it in Petri dishes with NaCl 0.9% and gently agitation. The resultant suspension of dispersed fat body cells was centrifuged during 1min and 2500g and, like the entire individuals (embryos, larvae and pupae), transferred into TRIzol reagent and frozen at -80°C until RNA extraction. We used fat bodies because it would allow a contribution to the knowledge of its biology, especially regarding the mechanism controlling *vg* expression in honeybees.

2.4. RNA extraction and quantitative RT-PCR (qPCR) assays

Total RNA was extracted according to the Invitrogen's protocol, followed by column purification (RNeasy Mini Kit, QIAGEN) as described previously (Barchuk et al. 2004, 2007). First strand cDNA was synthesized from 2 μg of RNA with SuperScript II Reverse Transcriptase and an oligo (dT₁₂₋₁₈) primer (Invitrogen). Comparative analyses of transcription levels were performed by Real Time quantitative PCR using a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Amplifications were carried out in a 20- μL reaction mixture containing 10 μL of SYBR® Green Master Mix 2x (Applied Biosystems), 0.8 μL of 10 mM of each gene specific forward and reverse primers and 1 μL of first-strand cDNA samples diluted (1/5) in water (EcRA-F: CCAACAGCAACAACGGCTAC, EcRB-F: ACAGTGTGCCAACGGTCAC, EcRA/B-R: AAAGAGCCAGGCTGCGACAA, rp49-F: CGTCATATGTTGCCAACTGGT, rp49-R: TTGAGCACGTTCAACAATGG). Reaction conditions were 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. Three biological replicates were run in three technical replicates. *β -actin* gene (GenBank accession number AB023025) and *RP-49* (GenBank accession number AF441189; both genes were partially sub-cloned and sequenced in our laboratory) were used as reference. Relative quantities of transcripts were calculated using the comparative Ct method (Applied Biosystems, User bulletin#2). Statistical analyses were carried out with Statistica version 7.0 (<http://www.statsoft.com>).

2.3. Northern blot analysis

Approximately 15 μg of total RNA extracted from queens and workers PP1 and Pb were subjected to 1.5% agarose/formaldehyde gel electrophoresis, and the RNA was then transferred to membrane using a VacuGene XL Vacuum Blotting (GE Healthcare) system. A cDNA fragment of 160bp encoding the 3' part of the DNA-binding domain was used for probe synthesis (Random Primers DNA Labeling System Invitrogen, Redivue ^{32}P -Nucleotides). After 3h of hybridization (42°C), membranes were washed during 20 min with SSC 0.1X/0.1% SDS, and autoradiographed (Super Sensitive ST film revealed with Cyclone™ Storage Phosphor System, PerkinElmer®).

3. Results

3.1. *EcR-A and EcR-B transcript variants identification in honeybees*

There have been sequenced two transcript variants of the *EcR* gene in *Apis mellifera*, EcR-A (Accession numbers NM_001098215, XM_394760) and EcR-B (NM_001159355). They are 2,635 nt and 2,782 nucleotide long, respectively (see also Takeuchi et al., 2007 and Watanabe et al., 2010). As can be inferred from Dr. Kubo's group previous studies, this difference in nucleotide length resides within the 5' end and results in differences in the number and identity of amino acids of the N-terminal that gives rise to the modulator A/B domain. A conceptual translation of the nucleotide sequences showed a putative EcR-A protein containing 620 amino acids and EcR-B with 557 amino acids, both sharing a 452 amino acid sequence to the carboxy terminal (Figure 1). Both variants run almost at the same rate in agarose gel (data not shown)/Northern blotting (Figure 2). As it can be seen, workers and queens at PP1 and workers at Pb stages presented one hybridization band, of approximately 2,7kb, while queens at Pb show a slightly shorter band (since we did not aimed at quantification, the respective bands density does not represent differences in transcription levels). This result suggests transcripts have small differences in length and supports the *in silico* evidence.

3.2. *Developmental profile of AmEcR transcript variants A and B*

By quantitative real time PCR (qPCR) assays we show that both transcript variants of *AmEcR* gene are transcribed during honeybee castes development (Figure 3). However, row Ct data and the relative transcription profiles (Figure 3) indicate that EcR-A RNA is produced in relatively higher levels during post-embryonic development, when compared to EcR-B levels. This EcR variant, EcR-B, is expressed in basal levels during most of the developmental stages studied in queens and workers. Embryonic stage was the only developmental phase in which significant *AmEcR-B* transcription levels could be observed. For this developmental stage, EcR-B expression levels were significantly higher than EcR-A levels ($P < 0.05$ Mann-Whitney Test). Another developmental stage where we could observe higher *AmEcR-B* transcription levels is PP3.

EcR-A transcripts synthesis is basal in embryos and during the first three larval instars in both castes. From the third instar larvae stage (L3) on, EcR-A transcripts showed similar transcription profile in castes, but presenting higher levels in workers (Figure 2). The main transcription levels occur in the fifth larvae stage - spinning phase (L5S1 and L5S3) and showed to be significantly different in queens and workers ($P < 0.05$ Mann-Whitney Test). A decrease to lower levels is observed in pre-pupal phase 1 and 2 (PP1-PP2) for both castes. After then, in PP3, workers present increasing EcR-A levels, but in lower rates, that is slightly kept until the emergence of the adult. In queens, on the other hand, the synthesis of this molecule turns basal from early pupal phase on,

showing statistical difference when compared to workers in Pbm, Pdb and NE stages ($P < 0.05$ Mann-Whitney Test).

3.3. Transcriptional response of *AmEcR* to artificially augmented ecdysteroid and JH titers

The application of 20E and JH to worker and queen bees during pupal development, after the physiological peak of ecdysteroids, in general, promoted a transcriptional repression of both EcR variants, which showed to be significant at 24h of 20E treatment for EcR-A and EcR-B in queens and EcR-B in workers; at 24h of JH treatment for EcR-A, and 1h for EcR-B in queens ($P < 0.05$ Mann-Whitney U Test; Figure 4). The exception was the apparent induction of *EcR* transcription after JH treatment in workers (Figure 4B), at least at 1h of treatment for EcR-A, and 12h after it for EcR-B ($P < 0.05$ Mann-Whitney Test).

4. Discussion

Northern Blot analysis show hybridization with two similar bands, containing approximately 2.6 or 2.7kb that as found to other species including *Tenebrio molitor* (Mouillet et al., 1997) and *Drosophila melanogaster* (Yao et al., 1993; Talbot, 1993), suggesting that, like in these species, *AmEcR* is a single copy gene that originates two different isoforms. Here we found that *AmEcR* isoforms are similar in their nucleotide and amino acid structure, except by an N-terminal region that forms the variable A/B modulator domain. We also observed that both are expressed during queens and worker development, but EcR-A showed higher levels than EcR-B in most of developmental phases but embryos. When comparing both isoforms in castes, it could be noted that workers in general presented higher levels than queens. Besides that, *AmEcR* expression levels for both variants seem to follow anti-parallel patterns with morphogenetic hormones. The variation observed in the transcripts variants length can be related, as it is seen in a large number of nuclear receptors, to alternative splicing, different promoters, and distinct translational start sites to generate different modulator domains (Giguère, 1994; Chambon, 1996). The A/B domain usually modulates transcriptional activation, and it was demonstrated that the modulator domains possess promoter- and cell context-dependent activities (Tora et al., 1988; Berry et al., 1990; Vegeto et al., 1993), although they confer similar properties to distinct receptors (Kato et al., 1995; Bunone et al., 1996; Tremblay et al., 1997).

According to expression profile of EcR transcripts variants in queens and workers development, we observed lower levels of EcR-B compared to EcR-A levels, except by embryonic phase. These findings may indicate RNA polymerase II and its transcription machinery may have higher affinity for the second consensus sequence for the transcription initiation during embryonic development, giving rise to EcR-B. That condition apparently changes after larvae eclosion, during the post-embryonic

phase, towards to EcR-A transcription. Another plausible hypothesis is that *AmEcR-B* mRNA is maternally transported to the oocytes to be used during early embryogenesis, what doesn't occur for the other isoform.

Queens and workers presented similar expression profiles for both, *EcR-A* and *EcR-B*. *EcR-B* seems not to favor caste differential development since its levels are basal, probably constitutive and doesn't seem to be modulated by morphogenetic hormones titers, during the whole post-embryonic development, what was also seen in *Drosophila melanogaster* (Sullivan and Thummel, 2003). *EcR-A* may play an important role in this process, because it showed to be preferentially expressed in workers for most of developmental stages analyzed. This contrasts with another study in which EcR-A is up regulated in queens (Takeuchi et al., 2007). These contrasting results can be due to different tissues used for each study, suggesting a tissue- caste-specific pattern of expression of this gene and its related transcripts variants. Besides that, differences in caste profiles may demonstrate differences inherent to caste development related to distinct patterns of gene expression that determine differences in developmental timing, morphology, physiology and behavior (Michelette and Soares, 1993; Severson et al., 1989; Corona et al., 1999; Evans and Wheeler, 1999; 2001; Hepperle and Hartfelder, 2000; Guidugli et al., 2004; Corona et al., 2005; Barchuk et al., 2007; Maleszka, 2008). The main levels of EcR-A transcripts were found later to critical period of caste determination, in L5S workers. This peak is in accordance to the ecdysteroid and juvenile hormone titers found during this stage. They are relatively high for both (Rembold, 1987; Rachinsky et al., 1990), and can be acting synergistically to activate EcR-A transcription in this specific time point. During 5th larval stage, profound changes occur in response to differential nutrition in each caste (Goewie, 1978; Nijhout, 1994; Barchuk, et al., 2007), suggesting that EcR-A can be part of the mechanism that culminates in caste differentiation. On the other hand, ecdysteroids appear not to play the same incremental role in *EcR-A* transcription during pupal stage, where they show the highest titers, contrasting to low levels of *EcR-A*. Similar results were described for *Manduca sexta*, when low concentrations of 20E induced EcR expression while higher titers of this hormone repressed the expression of this gene (Jindra et al., 1996). These results suggest that EcR gene responds positively to a slight increase in ecdysteroids, but high hormone levels are repressive. In *Blattella germanica*, the expression of *EcR-A* seems to be not regulated by 20E, by treatment with 20E and antagonist levels of this hormone and EcR-A transcripts were observed (Pascual et al., 1992; Cruz et al., 2006). It was also presented in our findings related to artificially increasing 20E and JH levels. In most cases an anti-parallel regulation, where ecdysteroids repress both isoforms transcription in queens and workers, mainly after 24h of hormone treatment.

The differences presented by EcR-A in specific developmental time points in response to ecdysteroids can be due to the presence of makisterone A and/or 20E. According to some studies, Makisterone A is probably the major ecdysteroid compound in prepupal hemolymph, while 20E appeared to be the second most important compound (Rachinsky et al., 1990), so they can be acting in a diverse manner in order to regulate EcR gene expression, even binding only one of the isoforms or modulating their

transcription in a different way. Another possible explanation is the diversification of hormone function with 20E having retained its involvement in reproductive physiology, as suggested by Takeuchi et al. (2007) and makisterone A having evolved to act governing post-embryonic development, as indicated for *Dysdercus fasciatus* (Feldlaufer et al., 1991). And as seen by Elias-Neto et al. (2010) ecdysteroids can be synthesized in different organs in specific developmental stage which can be involved to specific *EcR-A* expression pattern. Similarly to ecdysteroids, JH seemed to repress EcR levels in queens, but in workers *EcR-B* transcription is activated by this hormone. Natural high level of JH showed to stimulate phisiometabolic genes in queens, and JH-treated workers (Barchuk et al., 2007), so we can assume that EcR-is not one of those genes and is probably down regulated by one of them, acting as part of a gene expression network JH-dependent. EcR forms with USP the heterodimeric molecule, responsible for binding ecdysteroids (Yao et al., 1992, 1993). Since *usp* is suggested as JH ligand (Chung et al., 1998; Barchuk et al., 2004) and it also originates two different transcripts (Barchuk et a., 2004), it may influence EcR transcription, in a isoform-dependent manner, additionally it was seen that the nuclear localization of EcR is determined by USP (Dutko-Gwózdź et al., 2008). Taken together these findings suggest EcR plays distinct roles during larval-pupal metamorphosis in an isoform dependent-manner, acting distinctly depending on hormonal environment and differential gene expression tissue- and caste-specific. We are working on some other issues trying to find out the nature of some of encountered differences and in a near future we hope to better explain them.

Acknowledgements

Dr. Nilce M.M. Rossi, Roseli de Aquino P. Ferreira and Diana Gras for lab facility and support in Northern blotting assays. Luiz Aguiar, for support in field work.

Financial support: Fapesp (processo 2008/01446-4 and 2008/10757-3)

5. Literature cited

- Barchuk, A. R.; Bitondi, M. M.G.; Simões, Z. L. P.** (2002). Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, 2: 1-8.
- Barchuk, A. R.; Maleszka, R.; Simões, Z. L.P.** (2004). *Apis mellifera ultraspiracle*: cDNA sequence and rapid up-regulation by juvenile hormone. *Insect Mol Biol.* 13:459-467.
- Barchuk, A.R.; Cristino, A.S.; Kucharski, R.; Costa, L.F.; Simões, Z.L.; Maleszka, R.** (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev Biol*, 7:70-89.
- Barchuk, A.R.; Figueiredo, V.L.C.; Simões, Z.L.P.** (2008) Downregulation of ultraspiracle gene expression delays pupal development in honeybees. *J Insect Physiol*, 54:1035– 1040.
- Beato, M.** (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56:335-344.
- Beckstead, R.B.; Lam, G.; Thummel, C.S.** (2005). The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Genome Biology* 6:R99.
- Berry, M.; Metzger, D.; Chambon, P.** (1990) Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J*, 9:2811–2818.
- Bitra, K.; Palli, S.R.** (2009) Interaction of proteins involved in ecdysone and juvenile hormone signal transduction. *Arch Insect Biochem Physiol*, 70(2):90-105.
- Bunone, G.; Briand, P-A.; Miksicek, R.J.; Picard, D.** (1996) Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J*, 15:2174–2183.
- Chambon, P.** (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. In: Whelan WJ (ed) *The Retinoid Revolution*. *FASEB J* 10:940–954.
- Chawla, A.; Repa, J.J.; Evans, R.M.; Mangelsdorf, D.J.** (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*, 294(5548):1866-70.
- Cherbas, P.** (1993) The IVth Karlson Lecture: Ecdysone-responsive genes. *Biochem. Mol. Biol.*, 23: 3-12.
- Chung, A.C.K.; Durica, D.S.; Clifton, S.W.; Roe, B.A.; Hopkins, P.M.** (1998) Cloning of crustacean ecdysteroïd receptor and retinoid-X receptor gene homologs and elevation of retinoid-X receptor mRNA by retinoic acid. *Mol Cell Endocrinol* 139:209-227.
- Corona, M.; Estrada, E.; Zurita, M.** (1999) Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. *J Exp Biol*, 202:929-938.
- Corona, M.; Hughes, K.A.; Weaver, D.B.; Robinson, G.E.** (2005) Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mech Ageing Dev*, 126(11):1230-8.
- Cruz, J.; Mané-Padrós, D.; Bellés, X.; Martín, D.** (2006) Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi in vivo. *Dev Biol*, 297:158–171.
- Dutko-Gwózdź J, Gwózdź T, Orlowski M, Greb-Markiewicz B, Duś D, Dobrucki J, Ozyhar A.** (2008) The variety of complexes formed by *EcR* and *Usp* nuclear receptors in the nuclei of living cells. *Mol Cell Endocrinol*, 294(1-2):45-51.

- Elias-Neto, M.; Michelle P.M. Soares, Zilá L.P. Simões, Klaus Hartfelder, Márcia M.G. Bitondi** (2010) Developmental characterization, function and regulation of a Laccase2 encoding gene in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apinae). *Insect Biochem Mol Biol*, 40:241-251.
- Evans, R. M.** (1988). The steroid and Thyroid hormone receptor Superfamily. *Science*, 240: 889-895.
- Evans, J.; Wheeler, D.** (1999) Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:5575-5580.
- Feldlaufer, M.F.; Weirich, G.F.; Lusby, W.R.; Svoboda, J.A.** (1991) Makisterone C a 29-carbon ecdysteroid from developing embryos of the cotton stainer bug, *Dysdercus fasciatus*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 18(2):71-79.
- Flatt, T.; Heyland, A.; Rus, F.; Porpiglia, E.; Sherlock, C.; Yamamoto, R.; Garbuzov, A.; Palli, S.R.; Tatar, M.; Silverman, N.** (2008) Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol*, 211:2712-2724.
- Gauhar, Z.; Sun, L.V.; Hua, S.; Mason, C.E.; Fuchs, F.; Li ,T-R.; Boutros, M.; White, K.P.** (2009) Genomic mapping of binding regions for the Ecdysone Receptor protein complex. *Genome Res*, 19(6):1006-13.
- Giguère, V.** (1994) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* 15:61-79
- Giguère, V.** (1999). Orphan Nuclear receptors: from gene to function. *Endocrine Reviews*, 20(5):689-725.
- Gilbert, S. F.** (1994). *Developmental Biology*. 4ª edição. Sinauer, USA.
- Goewie, E. A.** (1978) *Med. Landbouwhogeschool. Wageningen*, 75:1-75.
- Grebe, M.; Przibilla, S.; Henrich, V.C.; Spindler-Barth, M.** (2003). Characterization of the ligand binding domain of the ecdysteroid receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biol. Chem.* 384,105-116
- Green, S.; Chambon, P.** (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet*, 4: 309-314.
- Guidugli, K.R.; Hepperle, C.; Hartfelder, K.** (2004) A member of the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily is a target of the ecdysone response in honey bee (*Apis mellifera*) caste development *Apidologie*, 35:37-47.
- Hartfelder, K.** (2000) Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. *Braz J Med Biol Res*, 33(2):157-177.
- Hepperle, C.; Hartfelder, K.** (2000) Differential display PCR reveals ecdysteroid-responsive genes in the ovary of honeybee worker larvae. In *Proceedings of the International Congress of Entomology*. Edited by Gazzoni D. Londrina, Brazil: Embrapa Press, 552.
- Jindra, M.; Malone, F.; Hiruma, K.; Riddiford, L.M.** (1996). Developmentl profiles and edysteroid regulation of the mRNAs for two edysone receptor isofroms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol*, 180:258-272.
- Kato, S.; Endoh, H.; Masuhiro, Y.; Kitamoto, T.; Uchiyama, S.; Sasak,i H.; Masushige, S.; Gotoh, Y.; Nishida, E.; Kawashima, H.; Metzger, D.; Chambon, P.** (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, 270:1491-1494.
- King-Jones, K.; Thummel, C.S.** (2005) Developmental biology. Less steroids make bigger flies. *Science*, 310(5748):630-1.

- Kumar, R.; Thompson, E.B.** (2003). Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator. *Mol. Endocrinol*, 17:1–10.
- Lan, Q.; Hiruma, K.; Hu, X.; Jindra, M. and Riddiford, L. M.** (1999). Activation of a delayed-early gene encoding MHR3 by the ecdysone receptor heterodimer EcR-B1 – USP-1 but not by EcR-B1 – USP-2. *Mol Cell Biol*, 19:4897-4906.
- Lezzi, M.; Bergman, T.; Henrich, V.C.; Vogtli, M.; Fromel, C.; Grebe, M.; Przibilla, S.; Spindler-Barth, M.** (2002). Ligand induced heterodimerization between the ligand binding domains of the *Drosophila* ecdysteroid receptor and ultraspiracle. *Eur. J. Biochem.* 269, 3237–3245.
- Maleszka, R.** (2008) Epigenetic integration of environmental and genomic signals in honey bees: the critical interplay of nutritional, brain and reproductive networks. *Epigenetics*, 3(4):188-92.
- Mangelsdorf, D.J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herlich, P.; Schütz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P. and Evans, R.M.** (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, 83:835-839.
- Mangelsdorf, D.J.; Evans, R.M.** (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83:841-850.
- Michelette, E.R.F.; Soares, A.E.E.** (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, 24:431–440.
- Mouillet, J.F.; Delbecque, J.P.; Quenedey, B.; Delachambre, J.** (1997). Cloning of two putative ecdysteroid receptor isoforms from *Tenebrio molitor* and their developmental expression in the epidermis during metamorphosis. *Eur J Biochem*, 248:856-863.
- Nijhout, H. F.** (1994) *Insects hormones*. Princeton University Press, New Jersey.
- Pascual, N.; Cerdá, X.; Benito, B.; Tomás, J.; Piulachs, M.D.; Bellés, X.** (1992) Ovarian ecdysteroids levels and basal oocyte development during maturation in the cockroach *Blattella germanica* (L.). *J Insect Physiol*, 38:339-348.
- Rachinsky, A.; Strambi, C.; Strambi, A.; Hartfelder, K.** (1990) Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last estágio honeybee larvae. *Gen Comp Endocrinol*, 79:31-38.
- Rembold, H.** (1987). Regulation of Honeybee age polyethism by juvenile hormone. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 20:329-338.
- Richards, G.** (1981) The radioimmune assay of ecdysteroid titres in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Endocrinol*, 21: 181-197.
- Riddiford, L. M.** (1994). Cellular and molecular actions of Juvenile Hormone I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv Insect Physiol*, 24:213-274.
- Robinow, S.; Talbot, W. S.; Hogness, D. S.; Truman, J. W.** (1993) Programmed cell death in the *Drosophila* CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform. *Development*, 119:1251-1259.
- Severson, D.; Williamson, J.; Aiken, J.** (1989) Caste-specific transcription in the female honeybee. *Insect Biochem*, 19:215-220.
- Sullivan, A.A.; Thummel, C.S.** (2003) Temporal profiles of nuclear receptor gene expression reveal coordinate transcriptional responses during *Drosophila* development. *Mol Endocrinol*, 17(11):2125–2137.

- Takeuchi, H.; Paul, R.K.; Matsuzaka, E.; Kubo, T.** (2007) EcR-A expression in the brain and ovary of the honeybee (*Apis mellifera* L.) *Zool Sci*, 24 (6), 596-603.
- Talbot, W. S.; Swyryd, E. A.; Hogness, D. S.** (1993) *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*, 73:1323-1337.
- Tora, L.; Gronemeyer, H.; Turcotte, B.; Gaub, M.P.; Chambon, P.** (1988) The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* 333:185-188.
- Tremblay, G.B.; Tremblay, A.; Copeland, N.G.; Gilbert, D.J.; Jenkins, N.A.; Labrie, F.; Giguère, V.** (1997) Cloning, chromosomal localization and functional analysis of the murine estrogen receptor b. *Mol Endocrinol*, 11:353-365.
- Truman, J.W.; Talbot, W.S.; Fahrbach, S.E.; Hogness, D.S.** (1994) Ecdysone receptor expression in the CNS correlates with stage-specific responses to ecdysteroids during *Drosophila* and *Manduca* development. *Development*, 120:219-234.
- Truss, M.; Beato, M.** (1993) Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *End. Rev.*, 14: 459-479.
- Vegeto, E.; Shahbaz, M.M.; Wen, D.X.; Goldman, M.E.; O'Malley, B.W.; McDonnell, D.P.** (1993) Human progesterone receptor A form is a cell and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 7:1244-1255.
- Watanabe, T.; Takeuchi, H.; Kubo, T.** (2010) Structural diversity and evolution of the N-terminal isoform-specific region of ecdysone receptor-A and -B1 isoforms in insects *BMC Evol Biol*, 10:40.
- Xu, Y.; Fang, F.; Chu, Y.; Jones, D. and Jones, G.** (2002) Activation of transcription through the ligand-binding pocket of the orphan nuclear receptor *ultraspiracle*. *Eur J Biochem*, 269(24): 6026 - 6036.
- Yao, T.P.; Sagraves, W. A.; McKeown, M.; Evans, R.M.** (1992) *Drosophila ultraspiracle* modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, 71:63-72.
- Yao, T.P.; Forman, B.M.; Jiang, Z.; Cherbas, L.; Chen, J.D.; McKeon, M.; Cherbas, P. & Evans, R. M.** (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and *Ultraspiracle* genes. *Nature*, 366:476-479.

Figures

Figure 1. Gene and protein organization of honeybee EcR. A) Four exons (E1-E4 rectangles) and three introns (lines) with the respective number of nucleotides. B) The five domains of EcR protein with the respective amino acid number. The extension of coding sequences of each exon within EcR domains is marked by oblique lines. 5' and N termini are on the left.

Figure 2. Northern blot showing the expression of *A. mellifera* EcR in honeybees. Approximately 15µg of total RNA was used per lane. The used probe was a radioactively labeled 160bp fragment including part of the coding region for the DBD. PP1: fifth instar larva, Pre-Pupa 1. Pb: brown-eyed Pupa, unpigmented cuticle. EcR gives rise to one transcript of ~ 2.6 and in Pb Queens and one of ~2.7 kb in both castes in PP1.

Figure 3. Developmental expression of *EcR* gene in *A. mellifera* castes. The ordinate represents the average of the expression levels of biological triplicates, obtained by quantitative Real-Time PCR (qPCR), using ribosomal protein 49 (RP-49) to normalize. SEMs were calculated as suggested by Livak & Schmittgen (2001) and are indicated by vertical bars. Asterisks indicate statistical difference (Mann-Whitney Test, $p < 0,05$). See Table I for the complete name of developmental stages.

Figure 4. *EcR* expression response to artificially augmented levels of morphogenetic hormones 20-hydroxyecdysone (20E) and juvenile hormone (JH) in honeybee castes. A) Workers B) Queens. Brown-eyed, unpigmented cuticle pupae were applied 5 μ g of 20E or 10 μ g of JH-III and the RNA samples from fat bodies were obtained after 1, 12, 24 and 48h. The ordinate represents densitometric units (DU) of sqPCR reactions and each value is an average of three separate experiments. SEMs are indicated by vertical bars. Statistical differences in gene expression between treated and control groups are indicated by (*). $P < 0.05$, Mann-Whitney Test.

Table 1. Developmental stages of *A. mellifera* (modified from Michelette and Soares, 1993).

Abbreviation	Developmental Stage
E	Embryo
L1	first instar Larva
L2	second instar Larva
L3	third instar Larva
L4	fourth instar Larva
L5F1	fifth instar Larva, Feeding stage 1
L5F2	fifth instar Larva, Feeding stage 2
L5F3	fifth instar Larva, Feeding stage 3
L5S1	fifth instar Larva, cocoon-Spinning stage 1
L5S2	fifth instar Larva, cocoon-Spinning stage 2
L5S3	fifth instar Larva, cocoon-Spinning stage 3
PP1	fifth instar larva, Pre-Pupa 1
PP2	fifth instar larva, Pre-Pupa 2
PP3	fifth instar larva, Pre-Pupa 3
Pw	white-eyed Pupa, unpigmented cuticle
Pp	pink-eyed Pupa, unpigmented cuticle
Pdp	Dark pink-eyed Pupa, unpigmented cuticle
Pb	brown-eyed Pupa, unpigmented cuticle
Pbl	brown-eyed Pupa, light pigmented cuticle
Pbm	brown-eyed Pupa, intermediary pigmented cuticle
Pbd	brown-eyed Pupa, dark pigmented cuticle
NE	Newly Emerged

Apis mellifera ecdysone receptor (Ecr), transcript variant A, mRNA, sequence 2,635 nt

Accession number NM_001098215 XM_394760

```

1  gtgtcgtggt  ggcagccact  cccaggttag  ccgccgtac  ggaccaggcc  acgtccgcca
61  ccatggacac  cagcgactcc  agcatggaca  cgactaacgg  ggggggctcg  agcgccgggg
121 ttggcgtggt  cggtgggacg  atcgctctg  tggtggcagg  ggccgcgtcc  ttgaccctgg
181 tcaaggccga  gacgcccga  cacctggccg  ggacgtcgac  gacggccgcc  gcgacgccga
241 cgccccgctc  ggtccccgct  ggatcggcgg  tggccggggac  ggccgggtggc  gccctcttcc
301 ccggcatggc  cgcggcgggc  aagggcgccg  cgagatccga  cgactggctc  gcgaacgcga
361 acagcccggg  cggctccccg  tccgccgcgt  tgcagccgca  gcacgtggtc  tacgggaatc
421 ctcagcaaca  acagctcgcc  gccgagacgc  agcagcagca  gcagcagccg  cccctcgccc
481 actcaagccc  cctcgcgcat  cagcagcaac  agcccaacag  caacaacggc  tacgccagtc
541 ctatgagcac  cagcagctac  gatccttaca  gtcccaacag  taagataggt  agggacgagt
601 tgtcgcagcc  tggctctttg  aacgggtatg  ggagcagcgg  aggcggaggg  ggcggaggag
661 gagggaggag  cggcgggcgg  ggcggaaggc  gagggcggag  aggtgggga  ggaggaggag
721 gagggcgggg  tggggaagg  ggaggcagcg  acgggtgcga  cgcgaggaag  aagaagggac
781 cgaccccgag  gcagcaggag  gaggttgtgc  tggctctggc  cgatcgcgcc  tccggttacc
841 actacaacgc  gctcacgtgc  gaggggtgca  aaggtttctt  ccggcggagc  atcactaaga
901 acgcggctta  tcagtgtaaa  tacgggaaca  attgcgagat  cgacatgtac  atgaggcgca
961 agtgtcagga  gtgcaggttg  aagaagtgtt  tgacggtcgg  gatgagggcc  gaggcggtgg
1021 tgcccgaata  ccagtgcgcc  gtgaagcgg  aggagaagaa  ggcgcaaaa  gagaaggaca
1081 agccgaacag  tacaacgatg  aacgggtccc  cgggcagcgg  cggatatacg  agcgatcaga
1141 tgggggtgaa  gatcgagccg  gccaggcgg  agtcgttgct  cagctccgga  agcagcggga
1201 tcctgacgcc  tgtcagccct  tacggctacg  tgaaaccgat  cagccccgag  caggaggaat
1261 tgatacacag  gctcgtctac  ttccagaacg  agtacgagca  accgagcgag  gaggatctca
1321 agaggatcac  gaatcagccc  tcggagggag  aggacatcag  tgattacaag  ttcaggcaca
1381 taaccgagat  cacgatcctc  acggtccaat  tgatcgctga  attctcgaag  agattgccag
1441 gcttcgacga  gctgatgcgg  gaggatcaga  tcgctctgct  caaggcctgc  tccagcgagg
1501 tgatgatgct  tcgaatggcg  aggaagtacg  acgtgcagac  ggacagcata  atattcgcca
1561 ataatacagc  ttacacgaag  gacagctata  ccgtggcggg  tatgggcgag  acgatcgagg
1621 atttgtctaca  tttctgccgg  cagatgtacg  ccatgaagg  gaacaacgcc  gagtacgcgt
1681 tgttgaccgc  catcgtcata  ttctcagaga  ggccgaacct  gctcgagggc  tgggaagggtg
1741 agaagattca  ggagatctat  ctggaggcgt  tgagggcgta  cgtggacaac  aggcgcagac
1801 cgaatccggg  cacggttttc  gccagattgc  tgtccgtgtt  gaccgagctg  cggaccctcg
1861 gcaaccagaa  cagcgagatg  tgcttcagcc  tcaagttcaa  gaacaaaaag  ctgccagttt
1921 tcctcgccga  gatctgggac  gtgacaccct  agttccccgg  tggccgatcc  ccgtcggctg
1981 atagtgttgt  ttcacgcgca  gtccgcgtcg  cgcccggaac  gttcaagctg  aacaccgaat
2041 ggagctgcgg  aacgctgcgc  gccacgcgga  gaacctcctg  tactagtgcg  ccaccaccac
2101 caccaccacc  accaccatgc  cactgcctgg  cccgattagt  agacacaggt  gacgtctacc
2161 gaagaagcat  cgaggaatga  tcgattcgac  ttcatcacac  cttcttctct  ccgcacttca
2221 cccggcttcg  tgaagctgtg  ctggaaacgg  gggggggggg  ggcagcttcc  gacagtgtt
2281 tacgaaaacg  cttagaaacg  ctgtggagga  tacgataata  atattttacg  cgaagtcagg
2341 aggaaggagg  aaggaggga  gaggaaaggc  agtggcgagg  caccaggct  gtgatacgta
2401 gagacagtac  agagactgta  ataaggagct  acctacctac  agttacgtta  ttattcntat
2461 attctctacc  tggctaccta  cctacctacc  tacctaccta  cctacctacc  tacctaccta
2521 cctacctacc  tacctaccta  cctaccccc  cggaatcgat  aaatgtaaat  gtgtaacgtg
2581 taatgttaat  aaggtagcgg  ctaactaaaa  aaaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  aaaaaa

```

EcR-A amino acid sequence - 620 total, 175 aa exclusives;

```

MDTSDSSMDTTNGGGSSAGVGVGGTIASVVAGAASLTLVKAETPEHLAGTSTTAAATP
TPPSVPVGS AVAGTAGGALFPGMAAAGKGAARSDDWLANANSPVGSPSAALQPQHVVYG
NPQQQQLAAETQQQQQQPPLAHSSPLAHQQQQPNSSNNGYASPMSTSSYPSPNSKIGR
DELSQPGSLNGYGSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSDGCDARK
KKGPTPRQEEELCLVCGDRASGYHYNALTCEGCKGFFRRSITKNAVYQCKYGNNCEIDM
YMRKKCQECRLKKCLTVGMRPECVVPEYQCAVKRKEKKAQKEKDKPNSTTMNGSPGSGG
IRSDQMGVKIEPAEAESLSTSGSSGILTPVSPYGYVKPISPEQEELIHRLVYFQNEYEEQ
PSEEDLKRITNQPSEGEDISDYKFRHITEITILTVQLIVEFSKRLPGFDELMREDQIAL
LKACSSEVMLRMARKYDVQTDSIIFANNQPYTKDSYTVAGMGETIEDLLHFCRQMYAM
KVNNAEYALLTAIVIFSERPNLLEGWKVEKIQEIYLEALRAYVDNRRRPNPGTVFARLL
SVLTELRTLGNQNSEMCFSLKFKNKKLPVFLAEIWDVTP

```

Apis mellifera ecdysone receptor (Ecr), transcript variant B1, mRNA, sequence 2,782nt

Accession number, NM_001159355

```

1  tatataggaa gagggacacg agggaaaagca ggcgcggccaa gcgagacgga cgatgcgtga
61 gagctcgggg accatggact cttgacagtg aatcgattct ctgcgcgcgt gccctgacct
121 cgtattcctt gccgcaattt cggtcgacga acgaattatc gaggtcaacg actagcgtgg
181 tggtagtagt agtttctgtt accgtaaaca gagtgttacg ttgactgag aggaaaggaa
241 agggaaaatc tgaggggata atcgaaatct cgtctttttt tgaacgggac cacggttttc
301 agtgtggtcg cgcgtgcaac acagtgatat tttctttttc cccgacggaa gtgacaggaa
361 aaattgggac ggtggagtcg agggaaacagg gaacggtgat cctgaagggt gagcaggctg
421 acgagatgct gcagactgtg ccccggtgtc ctgtcgcggg gatcaagcgg cgatggggta
481 acaggcacgc aggaagtctg caggagtcga gccagaggtt ttcgagcagc ggcgtgctgt
541 cgccaccgcc gaatttccaa ccctccacgc cggagagcgc ggtcgtaaag agcgaagaac
601 tccagctgtg ggatctggac cttcatcggg gcctgcagac gaacggggat cattatcggg
661 ctaccatcac cgccacgacc accaccacag tgttgccaac ggtcaccgat cctgcctcgc
721 cattcaccac ccccatcgaa ggtagggacg agttgtcgca gcctggctct ttgaacgggt
781 atgggagcag cggaggcggg ggcggcggag gaggaggagg aggcggcggc ggcggcggcg
841 gagggcggag aggaaggagg ggaggaggag gcgggggtgg tggaggaggga ggcagcgacg
901 ggtgcgacgc gaggaagaag aagggaccga ccccgaggca gcaggaggag ttgtgcctgg
961 tctgcggcga tcgcgcctcc ggttaccact acaacgcgct cacgtgcgag gggtgcaaaag
1021 gtttcttccg gcggagcatc actaagaacg cggctctatca gtgtaaatac gggaacaatt
1081 gcgagatcga catgtacatg aggcgcaagt gtcaggagtg cagggtgaag aagtgtttga
1141 cggtcgggat gagggccgag tgcgtggtgc ccgaatacca gtgcgccgtg aagcggaagg
1201 agaagaaggc gcaaaaggag aaggacaagc cgaacagtac aacgatgaac ggggtcccgg
1261 cgagcggcgg tatacggagc gatcagatgg ggggtgaagat cgagccggcc gaggcggagt
1321 cgttgtccac gtccggaagc agcgggatcc tgacgcctgt cagcccttac ggctacgtga
1381 aaccgatcag ccccgagcag gaggaattga tacacaggct cgtctacttc cagaacgagt
1441 acgagcaacc gagcgaggag gatctcaaga ggatcacgaa tcagccctcg gagggagagg
1501 acatcagtga ttacaagttc aggcacataa ccgagatcac gatcctcacg gtccaattga
1561 tcgtcgaatt ctgcaagaga ttgccaggct tcgacgagct gatgcgggag gatcagatcg
1621 ctctgctcaa ggcctgctcc agcgagggtg tgatgcttcg aatggcgagg aagtacgacg
1681 tgcagacgga cagcataata ttcgccaata atcagcctta cacgaaggac agctataaccg
1741 tggcgggtat gggcgagacg atcgaggatt tgctacattt ctgccggcag atgtacgcca
1801 tgaaggtgaa caacgccgag tacgcgttgt tgaccgccat cgtcatattc tcagagaggc
1861 cgaacctgct cgagggctgg aaggtggaga agattcagga gatctatctg gaggcgttga
1921 gggcgctacg ggacaacagg cgcagaccga atccgggcac ggttttcgcc agattgctgt
1981 ccgtgttgac cgagctgcgg accctcggca accagaacag cgagatgtgc ttcagcctca
2041 agttcaagaa caaaaagctg ccagttttcc tcgccgagat ctgggacgtg acaccctagt
2101 tccccgggtg ccgatccccg tcggctgata gtgttgtttc atcgcgagtc cgcgtcgcgc
2161 ccggaacggt caagctgaac accgaatgga gctgcggaac gctgcgcgcc acgcgagaga
2221 cctcctgtac tagtgcgcca ccaccaccac caccaccacc accatgccac tgcttgccc
2281 gattagtaga cacaggtgac gtctaccgaa gaagcatcga ggaatgatcg attcgaactc
2341 atcacacctt cttctctccg cacttcaccc ggcttcgtga agctgtgctg gaaacggggg
2401 gggggggggg agcttttcgac agtgctttac gaaaacgctt agaaacgctg ttgaggatag
2461 gataataata ttttacgcga agtcaggagg aaggaggaaag gaggaaggag gaaaggcagt
2521 ggcgaggcac ccaggctgtg atacgtagag acagtacaga gactgtaata aggagctacc
2581 tacctacagt tacgttatta ttentatatt ctctacctgg ctacctacct acctacctac
2641 ctacctacct acctacctac ctacctacct acctacctac ctacctacct acccccccg
2701 aatcgataaa tgtaaatgtg taacgtgtaa tgtaataaag gtagcggcta actaaaaaaa
2761 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa AA

```

EcR-B amino acid sequence - 557 total, 105 amino acids excludes;

```

MLQTVPRVPVAGIKRRWGNRHAGSLQESSPEVSSSGVLSPPPNFQFSTPESAVVKSEELQLWDLDLHR
GLQTNGDHYRATITATTTTTVLPTVTDPAFPTPIEGRDELSQPGSLNGYGSSGGGGGGGGGGGGGG
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSDGCDARKKKGPTPRQQEELCLVCGDRASGYHYNALTCEGCKGFFRRS
ITKNAVYQCKYGNNCIEDMYMRKCKQECRLKKCLTVGMRPECVVPYQCAVKRKEKKAQKEKDKPNST
TMNGSPGSGGIRSDQMGVKIEPAEAESLSTSGSSGILTPVSPYGYVKPISPEQEELIHRLVYFQNEYE
QPSEEDLKIRITNQPSGEGDISDYKFRHITEITILTVQLIVEFSKRLPGFDELMREDQIALLKACSSEV
MMLRMARKYDVQTDSSIIFANNQPYTKDSYTVAGMGETIEDLLHFCRQMYAMKVNNAEYALLTAIVIFS
ERPNNLEGWKVEKIQEIYLEALRAYVDNRRRPNGPTVFARLLSVLTELRTLGNNQNSEMCFSLKFKNKK
LPVFLAEIWDVTP

```