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

**Caracterização dos componentes moleculares do ciclo circadiano no desenvolvimento
e senescência de *Apis mellifera***

FABIANO CARLOS PINTO DE ABREU

RIBEIRÃO PRETO, SP

-2018-

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

**Caracterização dos componentes moleculares do ciclo circadiano no desenvolvimento
e senescência de *Apis mellifera***

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

Orientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino
Simões

RIBEIRÃO PRETO, SP

-2018-

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

Abreu, Fabiano Carlos Pinto de

Caracterização dos componentes moleculares do ciclo circadiano no desenvolvimento e senescência de *Apis mellifera* – Ribeirão Preto, 2018. 114p.: 30 cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética

Orientador: Simões, Zilá Luz Paulino

1. *Apis mellifera* 2. Genes do relógio 3. Ciclo circadiano 4. Ritmo circadiano 5. miRNAs

Apoio financeiro:

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Programa de Pós-graduação em Genética FMRP-USP, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (*CNPq*) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 2014/14194-4.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Fabiano Carlos Pinto de Abreu

Título da Dissertação: Caracterização dos componentes moleculares do ciclo circadiano no desenvolvimento e senescência de *Apis mellifera*

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

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2018.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões por ter aberto as portas do laboratório e me confiado este trabalho, sempre me apoiando atenciosamente e de forma excepcional. Por todas as ótimas conversas, sugestões e participação em minha caminhada científica e crescimento pessoal.

À Profa. Dra. Márcia Maria Gentili Bitondi e ao Prof. Dr. Klaus Hartfelder pelas contribuições importantes ao longo do trabalho.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Genética, por todo o suporte e investimento fornecidos.

À especialista de laboratório Vera Lúcia Figueiredo por me auxiliar durante os experimentos, principalmente na manutenção das colônias de observação. Pela grande amizade, carinho e ótimas conversas.

À Profa. Dra. Anete Lourenço pelas sugestões e contribuição em todos os projetos de nosso laboratório.

Aos apicultores Luiz Aguiar, Jairo de Souza e Rogério Pereira pelo manejo das nossas abelhas, sem os quais não haveria meios de realizar esse trabalho. Em especial, ao Luiz Aguiar, por sempre estar disposto a colaborar com o material necessário para os meus experimentos.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Fontes e à Ana Carolina Coelho pelo fornecimento de células HEK293T.

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

Em especial, agradeço às Dras. Flávia Freitas e Camilla Pires, por me auxiliarem durante diversos momentos importantes ao longo do meu trabalho, além de colaborarem tanto com as amostras de embriões quanto com as bibliotecas de expressão. Sobretudo, agradeço pelos ótimos momentos e amizade.

Ao Dr. Tiago Falcon pela enorme colaboração e grande amizade estabelecida durante esses anos.

À Ms. Joseane Vieira pela parceria nos experimentos de luciferase e por compartilhar conhecimento, além das ótimas conversas e companhia.

Aos companheiros de laboratório Daniele, Franciene, Fábio, Leonardo, Aline Luchetta, Nicole, Claudinéia, Érica e Michelle. Obrigado pelo companheirismo, bons momentos e auxílio em vários momentos. Em especial, agradeço a Luana, Tiago Depintor, Thiago Falcon, Flávia, Felipe e Natália por toda a amizade, preocupação e carinho.

Aos amigos Carlos Michel, Ana Luiza, Karoline Biffi, Juliana Galaschi, Reinanda Lima e Maria Juliana, por participarem dessa jornada comigo e por toda a amizade estabelecida durante esses anos.

Aos meus pais, Antônio e Rosângela, que nunca mediram esforços para me ver crescendo como profissional e pessoa, por todo o apoio, confiança e dedicação. À minha irmã Fabíola, por sempre me apoiar e pela grande amizade. À minha afilhada, Isabella, por alegrar cada vez mais meus dias, ainda que à distância.

Ao Júnior, por todo o companheirismo, preocupação, paciência, cuidado e carinho nesses últimos meses. Por todo o apoio incondicional nos momentos mais difíceis, e por sempre me alegrar e me motivar.

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

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

Muito obrigado a todos!

“O conhecimento de uma coisa pode revelar-nos mais outras,
quando entreluz um raiozinho de esperança.”

[Édipo Rei – Sófocles]

RESUMO

Caracterização dos componentes moleculares do ciclo circadiano no desenvolvimento e senescência de *Apis mellifera*

O ciclo circadiano é um sistema adaptativo e vantajoso que permite a antecipação dos organismos e sincronização de suas atividades fisiológicas frente às variações ambientais que ocorrem ao longo do dia. Seu funcionamento molecular acontece pela geração dos ritmos circadianos, os quais surgem a partir da expressão cíclica dos genes do relógio em um *feedback* autoreglatório. Em insetos, os ritmos circadianos apresentam função importante em coordenar o *timing* do desenvolvimento e o comportamento. Nos últimos anos, estudos desvendaram que o relógio molecular de insetos sociais apresenta um funcionamento mais similar ao relógio de mamíferos do que com outros insetos como *Drosophila melanogaster*. Em especial, abelhas sociais têm sido ótimos modelos para investigar como os ritmos circadianos são modulados de acordo com as interações sociais entre os indivíduos, a plasticidade comportamental e a divisão social do trabalho entre as operárias. Operárias jovens (nutrizes) cuidam da cria no interior da colônia e geralmente apresentam uma atividade arrítmica ao longo de 24 horas, enquanto as abelhas mais velhas (forrageiras) são rítmicas e desenvolvem atividades complexas no ambiente externo. Nesse trabalho, nós caracterizamos os perfis de expressão dos genes do relógio *period* (*per*), *cryptochrome mammalian-like* (*cry-m*), *clock* (*clk*), *cycle* (*cyc*), *timeout 2* (*tim2*), *par domain protein 1* (*pdp1*), *vri* (*vri*) e *clockwork orange* (*cwo*) durante todo o desenvolvimento de abelhas operárias de *Apis mellifera*. Verificamos que os genes do relógio são expressos antes mesmo da formação do sistema nervoso central no embrião e que seus transcritos podem ser herdados maternalmente. No desenvolvimento de larvas e pupas, revelamos que estes genes são diferencialmente expressos entre as fases investigadas e, com exceção dos genes *cwo* e *tim2*, todos respondem ao tratamento com o Hormônio Juvenil (HJ) na fase de pupa de olho branco. A resposta positiva dos genes *clk*, *cyc* e *pdp1* frente ao tratamento hormonal pode estar relacionada com o envolvimento destes nas vias que respondem à sinalização do HJ, interagindo com os genes *Kruppel* (*Kr-h1*) e *Methoprene-tolerant* (*MET*). No desenvolvimento adulto, vimos que os genes *per* e *cry-m* são potenciais marcadores da plasticidade comportamental e divisão social do trabalho. Em um experimento usando *single-cohort colony*, estes genes apresentam níveis transcricionais que não oscilam em cabeças de operárias jovens (3 e 7 dias) ao longo de 24 horas, comparado aos níveis de expressão que oscilam de forma robusta em abelhas mais velhas (15 e 25 dias). Ainda, reconstruímos redes de interação proteína-proteína e miRNA-mRNA onde foram identificadas potenciais moléculas que atuam modulando os genes do relógio em nível pós-transcricional e traducional. Dentre elas, validamos as interações entre os miRNA-34 e seus sítios de ligação que estão presentes nas 3'UTRS dos genes *cyc* e *cwo*, através do ensaio por luciferase, revelando que este miRNA é um regulador negativo da expressão desses genes. Pela primeira vez, realizamos uma análise ampla dos genes do relógio em um inseto social, além de identificar novas moléculas que podem atuar modulando os ritmos circadianos. Nosso trabalho demonstra a importância das abelhas sociais como modelos ideais para desvendar os mecanismos moleculares que regem os ritmos circadianos não só em abelhas, como também em outros organismos, inclusive mamíferos.

Palavras chave: ciclo circadiano, ritmos circadianos, genes do relógio, miRNAs, *Apis mellifera*

ABSTRACT

Molecular characterization of the circadian clock elements during the development and senescence of *Apis mellifera*

The circadian clock is an advantageous adaptive system that enables organisms to anticipate and synchronize their biological activities during the daily environmental changes. The circadian clock acts through the ontogeny of circadian rhythms, which are generated by the cyclic expression of the clock genes in an autoregulatory feedback loop. In insects, the circadian rhythms have important roles in the coordination of the developmental timing and behavior, interacting with the endocrine system. In the last years, researchers revealed that the molecular clock of social insects is more similar to mammals than to insects. In particular, the social honeybee is an excellent model to investigate how the circadian rhythms are modulated accordingly to the social context, behavioral plasticity, and task-related activities. While young bees (nurses) work arrhythmically around the clock inside the colony in brood-care activities, old bees (foragers) need to be strongly rhythmic to develop complex tasks. In this work, we characterized the expression patterns of the clock genes *period* (*per*), *cryptochrome mammalian-like* (*cry-m*), *clock* (*clk*), *cycle* (*cyc*), *timeout 2* (*tim2*), *par domain protein 1* (*pdp1*), *vri* (*vri*) e *clockwork orange* (*cwo*) in the entire development of *Apis mellifera*. Our results revealed that the clock genes are expressed before the formation of the central nervous system in embryos and that their transcripts might be inherited maternally. The clock genes are differentially modulated during the larval and pupal development and, except for *tim2* and *cwo*, all of them respond to the treatment with Juvenile Hormone (JH) in white-eyed pupae. The positive response to JH by *clk*, *cyc* and *pdp1* might be related to the involvement of these genes on the pathways of the JH signaling, interacting with *Kruppel* (*Kr-h1*) and *Methoprene-tolerant* (*MET*) genes. In the adult development, the clock genes *per* and *cry-m* are potential molecular markers of the behavioral plasticity and division of labor in a single-cohort colony, once they did not exhibit transcriptional oscillations in heads of young bees (3 and 7 days-old) during 24h, compared to the robust transcriptional oscillation in old bees (15 and 25 days-old). Additionally, we reconstructed protein-protein and miRNA-mRNA interaction networks and identified putative molecules involved in the post-transcriptional and translational regulation of the clock genes. Among those molecules, we validated interactions between the miR-34 and its binding sites in the 3'UTR of *cyc* and *cwo* by luciferase assay, showing that this miRNA is a negative regulator of both clock genes. We showed for the first time a broad analysis of the circadian clock elements in a social insect, and also identified new molecules with potential to act as modulators of the circadian rhythms. This work expands the knowledge about the biological roles of the circadian clock in honeybees. Our work also contributes to highlight the importance of honeybees as an ideal model to uncover the molecular mechanisms that govern the circadian rhythms, not only in bees, but in other organisms, including mammals.

Key-words: circadian clock, circadian rhythms, clock genes, miRNAs, *Apis mellifera*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Relógio biológico e os ritmos circadianos	12
1.2. Genética molecular dos ritmos circadianos.....	14
1.3. O ciclo circadiano em insetos	16
1.4. A abelha social <i>Apis mellifera</i> como organismo modelo para estudo dos ritmos circadianos	18
1.4.1. Biologia de abelhas da espécie <i>Apis mellifera</i>	18
1.4.2. O relógio biológico de abelhas <i>Apis mellifera</i>	19
1.5. Justificativa	22
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Análise <i>in silico</i> dos componentes moleculares canônicos e reguladores do ciclo circadiano.....	25
3.1.1. Reanotação dos genes canônicos do relógio circadiano.....	25
3.1.2. Busca por <i>reads</i> que mapeiam com as sequências nucleotídicas dos genes do relógio em bibliotecas de expressão de embriões.....	25
3.1.3. Identificação de interações miRNA-mRNAs em <i>A. mellifera</i>	26
3.1.4. Identificação de interações proteína-proteína em <i>A. mellifera</i>	26
3.2. Abordagem experimental	27
3.2.1. Material Biológico	27
3.2.2. Amostras de embriões	27
3.2.3. Amostras de larvas e pupas	28
3.2.4. Colônia especial de observação (single-cohort colony)	29
3.2.5. Extração do RNA total	30
3.2.6. Síntese de cDNA e PCR em tempo real para quantificação dos transcritos de mRNAs.....	31
3.2.7. Síntese de cDNA e PCR em tempo real para quantificação dos transcritos de miRNAs.....	33
3.2.8. Validação das interações entre o miR-34 e as regiões 3`UTRS dos genes do relógio.....	35
3.2.9. Clonagem e inserção das regiões 3`UTRs dos genes candidatos no vetor PsiCHECK2	37
3.2.10. Transfecção em células HEK293T em cultivo e ensaio por luciferase	39
3.2.11. Efeitos do tratamento com o hormônio juvenil em pupas.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Reanotação, estrutura e conservação dos genes do relógio em <i>A. mellifera</i>	43

4.2.	Perfil de expressão gênica dos genes do relógio durante o desenvolvimento embrionário de <i>A. mellifera</i> obtido pela análise de bibliotecas de expressão.....	48
4.3.	Validação da expressão dos genes do relógio em embriões diploides de <i>A. mellifera</i> por qPCR.....	53
4.4.	Análise comparativa da expressão dos genes do relógio no desenvolvimento embrionário de <i>A. mellifera</i> e <i>D. melanogaster</i>	55
4.5.	Expressão dos genes do relógio durante o desenvolvimento larval e pupal de <i>A. mellifera</i>	58
4.6.	Relação dos perfis de expressão dos genes do relógio, desenvolvimento imaturo e títulos hormonais.....	63
4.7.	Efeito do tratamento com hormônio juvenil III na expressão dos genes do relógio em pupas de olho branco de <i>A. mellifera</i>	66
4.8.	Expressão dos genes do relógio durante a idade cronológica adulta e ciclos diários em operárias de <i>A. mellifera</i>	73
4.9.	Rede de interação proteína-proteína para os genes do relógio em <i>A. mellifera</i>	81
4.10.	Rede de interação miRNA-mRNA em <i>A. mellifera</i>	83
4.11.	Correlação da expressão gênica de miRNAs e genes do relógio ao longo do desenvolvimento embrionário de <i>A. mellifera</i>	85
4.12.	Expressão dos genes do relógio durante o dia e idade cronológica adulta de operárias de <i>A. mellifera</i>	88
4.13.	Validação das interações entre o miR-34 e seus alvos em <i>A. mellifera</i> pelo ensaio da luciferase	91
5.	CONCLUSÃO	99
6.	REFERÊNCIAS	100
7.	ANEXOS	111
7.1.	Anexo A	111
7.2.	Anexo B	112
7.3.	Anexo C	113
7.4.	Anexo D	114

1. INTRODUÇÃO

1.1. Relógio biológico e os ritmos circadianos

A sincronização e coordenação temporal de diversos processos fisiológicos e comportamentais é uma característica comum que está presente na grande maioria dos organismos, desde cianobactérias até mamíferos, permitindo que estes se adaptem às mudanças ambientais durante o ciclo de 24 horas (Kuhlman et al. 2017). Os relógios biológicos internos, ou o ciclo circadiano, são os principais responsáveis pela coordenação desses processos através da geração de ritmos circadianos na fisiologia e comportamento, o que resulta no acontecimento das atividades biológicas ao longo do dia (Bell-Pedersen et al. 2005). A vantagem evolutiva da presença de um relógio biológico é possibilitar ao organismo se preparar fisiologicamente de forma antecipada frente a mudanças ambientais ao longo do dia e sazonalmente, através de ajustes internos (Roenneberg & Merrow, 2002).

O reconhecimento da importância dos ritmos biológicos é datado de pelo menos 500 D.C e por séculos acreditou-se que as mudanças cíclicas observadas nos organismos eram exclusivamente devido aos efeitos simultâneos das mudanças cíclicas originadas por fatores ambientais (Reinberg et al. 1983). Somente em 1729, o astrônomo J.J. de Mairan observou que as mudanças rítmicas na posição das folhas de heliotropos persistiam em condições constantes, mesmo na ausência de luz (Reinberg et al. 1983). Desde então, outros experimentos demonstraram que as mudanças circadianas em diversas espécies persistem mesmo em condições biológicas constantes, o que firmou a ideia da existência de um relógio biológico interno nos organismos (Pittendrigh, 1960; Aschoff, 1963; Boissin & Assenmacher, 1970; Weitzman et al. 1982). Apesar dos ritmos circadianos acontecerem de forma endógena, estes podem ser ajustados de acordo com as pistas ambientais locais, denominadas *zeitgebers* (do alemão “sincronizadores”), como a luz e temperatura (Di Cara & King-Jones, 2013). Sendo assim, os ritmos circadianos seguem três principais critérios: (1) eles persistem (“*free-run*”) em um período que dura aproximadamente 24h na ausência de pistas ambientais externas; (2) eles podem ser resetados, ou ajustados (“*entrained*”), por pistas ambientais, em particular pela luz e temperatura; (3) apresentam um período estável (*period length*) frente a variações de temperatura até as fisiologicamente relevantes. Essa última característica define o fenômeno de compensação da temperatura, o qual requer

mecanismos específicos, uma vez que a maioria das reações biológicas é acelerada quando a temperatura é elevada (Dunlap et al. 2004; Saunders, 2002).

A variedade de estudos em Cronobiologia, abrangendo desde aspectos fisiológicos e moleculares, reafirma a extrema influência dos ritmos circadianos em praticamente todos os processos fisiológicos, incluindo os ciclos de sono, atividades cardiovasculares, memória, secreção de hormônios, plasticidade sináptica, períodos de alimentação, temperatura corporal e metabolismo (revisado por Ko et al. 2006). Em mamíferos e outros vertebrados, os ritmos circadianos influenciam os níveis circulantes de essencialmente todos os hormônios e a importância funcional dessa interação entre os sistemas circadiano e endócrino tem sido amplamente explorada (revisado por Kriegsfeld et al. 2002). Os glicocorticoides e a melatonina são os dois hormônios mais bem estudados e que são diretamente regulados pelos ritmos circadianos. Em especial, o cortisol e a melatonina são considerados os principais hormônios que enviam informações temporais do sistema nervoso central para os tecidos periféricos. Os níveis circulantes de ambos apresentam padrões robustos de oscilação ao longo de 24h em mamíferos (revisado por Tsang et al. 2014).

Somente a partir da metade do século XX que os pesquisadores começaram a desvendar os mecanismos moleculares que controlam os ritmos circadianos, o que rendeu a Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash e Michael W. Young o prêmio Nobel de Medicina em 2017, por caracterizarem o gene *period* na década de 80 (Bargiello et al. 1984; Zehring et al. 1984; Reddy et al. 1984), cujo produto é responsável por manter os ritmos circadianos em moscas das frutas. Com o uso de técnicas em genética molecular, foi possível caracterizar os componentes moleculares canônicos, denominados genes do relógio (*clock genes*), que atuam modulando os ritmos circadianos em outros organismos, principalmente em mamíferos. Esses estudos revelaram que defeitos nos genes do relógio geram diversas consequências biológicas como padrões de sono alterados (Wisor et al. 2002), síndromes metabólicas (Turek et al. 2005) desenvolvimento de câncer (Fu & Lee, 2003; Gery et al. 2006), autismo (Nicholas et al., 2007), dificuldades locomotoras e degeneração da retina (Andre et al. 1998), homeostase anormal do sistema imune (Sun et al. 2000), envelhecimento (Weinert et al. 2001), infertilidade (Kennaway et al. 2012), problemas de memória (Garcia et al. 2000; Sakai et al. 2004), dentre outras.

1.2. Genética molecular dos ritmos circadianos

Diversas espécies e diferentes abordagens já foram usadas para desvendar a natureza do mecanismo celular circadiano, destacando-se estudos em tecidos de *Drosophila melanogaster* (Plautz et al. 1997; Giebultowicz et al. 2000), cultura de células de mamíferos (Balsalobre et al. 1998; Yoo et al. 2004), células da retina de anfíbios e aves (Underwood & Groos, 1982) e glândula pineal de répteis e peixes (Binkley et al. 1978; Whitmore et al. 1998). Grande parte do conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares responsáveis pela manutenção dos ritmos circadianos vem de estudos no organismo modelo *D. melanogaster* (Collins & Blau, 2007; Dubruille & Emery, 2008; Zheng & Sehgal, 2008). Com o advento da era pós-genômica, a caracterização dos componentes genéticos do relógio biológico em moscas-das-frutas e mamíferos revelou que os ritmos circadianos são gerados através de um processo molecular cíclico, o qual é finamente regulado no sistema nervoso central, onde está localizado o centro de controle do relógio biológico (King & Takahashi, 2000).

Estímulos externos, como variações de luz e temperatura, são percebidos pelos órgãos sensoriais e enviados ao sistema nervoso central onde um *feedback* autoregularório é gerado em neurônios específicos a partir da expressão cíclica dos genes do relógio. Esses genes, que se enquadram como fatores transcricionais, podem ativar a expressão de outros genes e reprimir a sua própria transcrição periodicamente através das interações de seus produtos protéicos em nível pós-transcricional e traducional (Figura 1) (Bell-Pedersen et al. 2005; King & Takahashi, 2000). Dessa forma, ritmos na expressão gênica são gerados no decorrer de 24 horas e informações são enviadas a diversos tecidos para que ocorra o funcionamento adequado de vias metabólicas em períodos bem definidos (Dunlap, 1999; King & Takahashi, 2000; Okamura et al. 2002). Este mecanismo também foi identificado em tecidos periféricos e pode funcionar de forma sincronizada ou independente ao sistema nervoso central (Mohawk et al. 2012; Dibner et al. 2010).

Figura 1 - Funcionamento do mecanismo molecular circadiano em *D. melanogaster* e *Mus musculus*: Em *D. melanogaster*, um ciclo autoregulatório é desencadeado pelos elementos positivos *clock* (*clk*) e *cycle* (*cyc*). Estes, quando transcritos, formam um heterodímero CLK/CYC e ativam (setas em azul) a expressão de *period* (*per*) e *timeless* (*tim*) no núcleo celular. PER e TIM se acumulam em determinado período do dia no citoplasma, formam um heterodímero e agem como elementos negativos, podendo retornar ao núcleo e reprimir (setas em vermelho) sua própria transcrição quando interagem com CLK/CYC. O gene *cryptochrome 1* (*cry1*) tem função fotorreceptora e papel essencial em modular a estabilidade de PER e TIM em moscas da fruta. Em *M. musculus*, o mesmo mecanismo ocorre de forma conservada, porém há diferenças na composição e interações moleculares dos genes do relógio em relação a *D. melanogaster*. Em mamíferos, PER interage com CRY2 (*cryptochrome 2*) e estes atuam como elementos negativos. Não há a presença de um órtologo do gene *tim* em mamíferos, mas sim um parálogo denominado *timeout 2* (*tim2*) que apresenta função desconhecida. Esse mecanismo cíclico permite gerar ritmos na expressão de diversos genes ao longo de 24 horas, uma vez que estes quatro genes do relógio também podem ativar e reprimir uma variedade de outros genes e estabelecer interações físicas para que diversos processos metabólicos sejam coordenados e sincronizados periodicamente.

A clonagem do gene *period* (*per*) em *D. melanogaster*, abriu caminho para a dissecação molecular do sistema circadiano e a identificação de outros genes do relógio nesse organismo, sendo este um modelo pioneiro nos estudos genéticos envolvendo o ciclo circadiano (revisado por Hall, 2003). A identificação dos genes *clock* (*clk*) (Antoch et al. 1997; King et al. 1997) e *period* (*per*) (Sun et al. 1997; Tei et al. 1997) em mamíferos revelou que o relógio circadiano de vertebrados tem uma origem evolutiva em comum com os insetos, embora algumas diferenças interessantes tenham surgido (Reppert & Weaver 2000; Yu & Hardin 2006). Apesar das similaridades e diferenças dos componentes moleculares circadianos entre os organismos, o mecanismo de atuação dos genes do relógio é extremamente conservado e baseado em ciclos autoregulatórios, onde existem elementos positivos (ativadores) que ativam a expressão de outros genes e elementos negativos (auto-reguladores), que quando ativados podem reprimir a própria transcrição interagindo ou não com os elementos positivos (Figura 1) (Panda et al. 2002; Bell-Pedersen et al. 2005).

Em mamíferos, estima-se que metade dos genes encontrados no genoma apresenta oscilações em sua expressão ao longo de 24 horas em um ou mais tecidos (Zhang et al. 2014).

Defeitos no funcionamento dos genes do relógio acarretam alterações severas nos ritmos circadianos e geram diversas consequências biológicas em vertebrados, como citado na seção 1.1. Na lista de medicamentos mais vendidos e essenciais segundo a Organização Mundial da Saúde, a grande maioria afeta diretamente genes que são expressos de forma cíclica ao longo do dia (Zhang et al. 2014). A investigação dos componentes genéticos do relógio e as redes gênicas que são reguladas por estes têm sido um ponto chave para desvendar as implicações dos ritmos circadianos na homeostase fisiológica e estabelecer terapias adequadas para o tratamento de distúrbios ocasionados pelo mal funcionamento do relógio biológico. Entretanto, tecnologias moleculares modernas ainda são pouco utilizadas para demonstrar como a perturbação dos genes do relógio influencia os ritmos circadianos e afeta o metabolismo e comportamento dos organismos.

1.3. O ciclo circadiano em insetos

Em insetos, o ciclo circadiano controla uma ampla variedade de atividades fisiológicas e comportamentais ao longo do desenvolvimento. Temos como exemplo a coordenação temporal dos ritmos diários na atividade locomotora, na alimentação, acasalamento, ovoposição, pupação e eclosão larval e adulta (Saunders, 2002). Quando se trata de comportamento, diversos estudos já evidenciaram os ritmos na atividade locomotora diária, a qual define os ciclos de atividade e descanso nos insetos. Ainda, ritmos nas habilidades de aprendizado e memória são exemplos clássicos de processos coordenados pelo ciclo circadiano nesses organismos, com destaque principalmente para insetos sociais como abelhas (Moore, 2001; Pahl et al. 2007; Lazzari & Insausti, 2008).

Os ritmos circadianos na fisiologia de insetos também estão documentados em relação à produção de hormônios, em particular àqueles que controlam o desenvolvimento pós-embrionário e comportamento adulto (revisado por Bloch et al. 2013). A síntese e secreção dos hormônios de forma cíclica ao longo de 24 horas parece ser coordenada pelos ritmos circadianos e tem sido reportada em diversos insetos (Richter, 2001; Sakurai et al. 1998). Hormônios como o protoracicotrópico (PTTH), ecdisteróides e hormônio juvenil, os quais apresentam função essencial em controlar as mudas e a metamorfose, são considerados componentes chaves que dependem e interagem com o sistema circadiano de insetos (Lazzari & Insausti, 2008). O hormônio juvenil (HJ), por exemplo, apresenta ritmos em sua síntese e secreção para a hemolinfa em *Gryllus firmus*, os quais persistem mesmo em condições constantes (Zhao & Zera, 2004; Zera & Zhao, 2009). Ainda, já foram identificados que diversos genes que estão envolvidos nas vias de síntese do hormônio juvenil e dos

ecdisteróides apresentam oscilações circadianas em seus transcritos ao longo do dia (revisado por Boch et al. 2013).

As células ou neurônios circadianos que atuam na manutenção dos ritmos circadianos podem estar localizados em diferentes regiões do sistema nervoso central de insetos, variando do lobo óptico ao centro do cérebro, ou em ambos (Tomioka & Matsumoto, 2010). Ainda, o número de células no cérebro que expressa os genes do relógio pode variar entre os grupos de insetos, sendo que *D. melanogaster* apresenta cerca de 150 células circadianas (Helfrich-Foster, 2006; Sheeba, 2008). Irrespective às similaridades e diferenças na arquitetura celular circadiana entre grupos de insetos, estudos recentes revelaram que existem diferenças marcantes nos componentes moleculares que modulam os ritmos circadianos em insetos e ainda, a composição dos genes do relógio pode variar entre as espécies e dentro do mesmo grupo (Figura 2). (Sandrelli et al. 2008; Tomioka & Matsumoto, 2010).

The figure consists of a phylogenetic tree on the left and a table on the right. The tree shows the evolutionary relationships between the species listed in the table. The table has columns for different circadian clock components: CRY-m, CRY-d, TIM-m, TIM-d, BTR, and CPQ. Each cell in the table contains a checkmark (✓) for presence, a red X (✗) for absence, a question mark (?) for unknown status, or a checkmark inside a box (☑) for extensive poly-Q repeats.

	CRY-m	CRY-d	TIM-m	TIM-d	BTR	CPQ
<i>Mus musculus</i>	✓	✗	✓	✗	✓	✓
<i>Apis mellifera</i>	✓	✗	✓	✗	✓	✓
<i>Tribolium castaneum</i>	✓	✗	✓	✓	?	?
<i>Antheraea pernyi</i>	✓	✓	?	✓	✓	✗
<i>Bombyx mori</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✗
<i>Danaus plexippus</i>	✓	✓	?	✓	?	?
<i>Anopheles gambiae</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Drosophila melanogaster</i>	✗	✓	✓	✓	✗	☑

Figura 2 – Diferenças entre alguns componentes moleculares do ciclo circadiano em insetos e mamíferos: Insetos das ordens Hymenoptera, Coleoptera, Diptera e Lepidoptera e como exemplo de mamíferos, a espécie *Mus musculus*. BTR: domínio de transativação de BMAL1(mamíferos)/CYCLE (insetos); CPQ: repetições poli-Q de CLOCK: ?: desconhecido; ☑: repetições poli-Q extensas (modificado de Sandrelli et al. 2008).

As diferentes configurações genéticas e possibilidades de interação entre os genes do relógio que ocorrem de organismo para organismo, apesar de se basearem em um mecanismo conservado, podem estar associadas a processos fisiológicos comuns e, também, a fenótipos mais complexos que não aparecem em organismos inferiores. Com o recente sequenciamento do genoma de insetos sociais como abelhas e formigas (Weinstock et al. 2006; Wurm et al. 2011) foi observado uma maior similaridade do relógio molecular destes

com o de mamíferos, o que despertou uma nova possibilidade de estabelecer comparações e entender como o surgimento do comportamento social refletiu em novas configurações e funcionamento dos relógios biológicos (Rubin et al. 2006; Ingram et al. 2012).

1.4. A abelha social *Apis mellifera* como organismo modelo para estudo dos ritmos circadianos

1.4.1. Biologia de abelhas da espécie *Apis mellifera*

A abelha da espécie *Apis mellifera* é um inseto eussocial, isto é, apresenta, entre outras características, a presença das castas, a divisão do trabalho reprodutivo entre os indivíduos da colônia e sobreposição de gerações (Gullan & Cranston, 1994). O dimorfismo de castas, com a presença de rainhas e operárias, também é uma das características dessa espécie. As rainhas mantêm o controle da colônia e da reprodução, produzindo substâncias denominadas feromônios; possuem um aparelho reprodutor altamente desenvolvido, enquanto 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. Dentro da família Apidae, a espécie *A. mellifera* é tida como um excelente modelo para estudos voltados aos mecanismos de aprendizagem e memorização nos insetos, devido a sua alta capacidade cognitiva. Tem se distinguido também nas pesquisas básicas e aplicadas, por sua natureza singular associada ao interesse econômico que faz com que elas sejam consideradas as “rainhas dos insetos” (Menzel et al. 1996; Winston, 1991). Além disso, a espécie é vista como um excelente modelo para estudos genéticos envolvendo transições comportamentais e do desenvolvimento, uma vez que esta abelha é um inseto holometábolo, ou seja, apresenta metamorfose completa e ainda um comportamento complexo ao longo da vida adulta.

O dimorfismo entre fêmeas, ou seja, a presença de castas, é determinado durante o desenvolvimento larval e tem como um dos principais fatores a nutrição diferencial recebida pela larva, o que resulta na dicotomia das respostas endócrinas e genéticas, levando a larva a se tornar uma abelha rainha ou operária (Cristino et al. 2006). Há uma clara divisão de tarefas entre as abelhas operárias, estas executadas de acordo com idade e maturação comportamental (polietismo etário). Durante as primeiras duas ou três semanas de vida adulta, as operárias realizam tarefas relativas ao cuidado com as larvas e manutenção da

colmeia, sendo denominadas nutrizes. Posteriormente, em idade mais avançada, elas iniciam atividades fora da colmeia, como guardas e coletoras de pólen e néctar, quando são denominadas forrageiras (Robinson 1992).

Em resposta ao contexto social e às necessidades da colmeia, abelhas operárias podem apresentar um avanço na aprendizagem de novas tarefas ou ainda retomar tarefas que exerceram em idade mais jovem. Colmeias com ausência ou deficiência no número de abelhas forrageiras levam a uma precoce atividade forrageira de abelhas nutrizes. Já a completa ausência de abelhas nutrizes, induz abelhas forrageiras a reverterem parcialmente o seu comportamento para realizar tarefas no interior da colônia (Robinson et al. 1989; Huang & Robinson, 1999), o que inclui a reativação de suas glândulas produtoras de geléia real. Um dos fatores que aparenta ter um envolvimento nessa plasticidade comportamental e na organização social das abelhas é o seu ciclo circadiano. Fatores sociais como idade, divisão de trabalho, população da colmeia e contato entre operárias e rainha, influenciam a ontogenia dos ritmos circadianos e são importantes para a sincronização social das atividades de abelhas operárias ao longo do dia. (Bloch 2010).

1.4.2. O relógio biológico de abelhas *Apis mellifera*

A ampliação do conhecimento dos componentes do relógio circadiano de *A. mellifera*, possível pelo sequenciamento do seu genoma (Weinstock et al. 2006), somado ao seu comportamento altamente social e presença de características sofisticadas, tornou essa abelha um modelo essencial para se estudar como os ritmos circadianos influenciam a fisiologia e o comportamento (Meshi & Bloch, 2007; Bloch, 2010; Shemesh et al. 2007; Eban-Rothschild et al. 2012; Nagari & Bloch, 2012). Estudos sugerem que os ritmos circadianos modulam a plasticidade e maturação comportamental associada à divisão social do trabalho entre as operárias (Shemesh et al. 2007; Bloch G, 2001; Toma et al. 2000). Além disso, os ritmos circadianos aparentam ter um papel fundamental em garantir o funcionamento adequado das tarefas complexas desempenhadas pelas operárias forrageiras, como a navegação pela bússola solar, o tempo preciso dos vôos, o processamento da memória e a comunicação através da linguagem de sinais (Bloch, 2010). A presença de um sistema nervoso central mais sofisticado em abelhas, devido ao seu comportamento altamente social, permite que estas possam ser utilizadas principalmente para investigar como os aspectos sociocronobiológicos influenciam o relógio biológico e acarretam mudanças no comportamento e fisiologia. No contexto social, a organização da colônia com um alto número de abelhas, permite que manipulações na configuração destas (número e

tipo de indivíduos) sejam úteis para estudar como as interações sociais afetam profundamente a expressão de diversos genes, incluindo os genes do relógio.

Os estudos genéticos envolvendo a caracterização molecular dos componentes do relógio biológico em *D. melanogaster* e *M. musculus* (revisado por Panda et al. 2002), bem como seu padrão de expressão gênica (Rubin et al. 2006) foram referência para a construção do conhecimento teórico dos genes do relógio e seu funcionamento em *A. mellifera*. Análises filogenéticas e moleculares identificaram, até o momento, oito genes canônicos do relógio biológico em *A. mellifera*: *period* (*per*), *cryptochrome mammalian-like* (*cry-m* ou *cry2*), *clock* (*clk*), *cycle* (*cyc*), *timeout 2* (*tim2*), *vrille* (*vri*), *par domain protein 1* (*pdp1*) e *clockwork orange* (*cwo*) (Weinstock et al. 2006; Rubin et al. 2006; Rodriguez-Zas et al. 2012). O funcionamento molecular dos genes do relógio *per*, *cry-m*, *clk* e *cyc* ocorre de forma semelhante ao de mamíferos, sendo que estes genes atuam em um *feedback* autoreglatório que tem por finalidade gerar os ritmos circadianos no sistema nervoso central (Figura 3) (Rubin et al. 2006). Tanto em *A. mellifera* quanto em *M. musculus*, há a presença de dois genes do relógio, *tim2* e *cry-m*, que não estão presentes no genoma de *D. melanogaster*. Além disso, análises filogenéticas demonstram que os domínios funcionais dos genes *clk* e *cyc* em *A. mellifera* são similares aos de mamíferos (Weinstock et al. 2006; Rubin et al. 2006). Os domínios funcionais dos genes *vri* e *pdp1* são altamente conservados, comparados aos de *D. melanogaster*. Em abelhas, ambas as proteínas CYC e CLK apresentam sítios putativos que podem se ligar às regiões promotoras *e-box* de *pdp1* e *vri*, sugerindo um segundo ciclo autoreglatório no mecanismo circadiano (Cyran et al. 2003; Rubin et al. 2006; Bloch, 2010).

A caracterização dos genes do relógio em abelhas abriu novas portas para se entender as similaridades e diferenças com outras espécies de insetos, bem como estabelecer como processos conservados entre estes são governados pelos relógios biológicos. Além dos genes canônicos do relógio, centenas de outros transcritos apresentam ritmos em sua expressão gênica durante 24 horas no cérebro de nutrízes e forrageiras, o que reflete genes controlados pelo relógio (*clock-controlled genes*) (Rodriguez-Zas, 2012). Entretanto, ainda existem lacunas a respeito de como esses genes são regulados em nível transcricional e pós-transcricional. Como os genes do relógio *tim2*, *pdp1*, *vri* e *cwo* foram pouco estudados, não há evidência concreta do momento em que eles atuam dentro dos ciclos autoreglatórios que geram os ritmos circadianos em abelhas sociais. O modelo apresentado na Figura 3 resume o que se conhece até o momento sobre o relógio molecular das abelhas.

Figura 3 - Modelo sugerido para relógio molecular em *A. mellifera*. Os sincronizadores ambientais como a luminosidade e temperatura atuam nos órgãos sensoriais e informações são enviadas ao sistema nervoso central onde os ritmos circadianos são gerados nos neurônios circadianos através dos genes do relógio: 1) **Primeiro ciclo autoregulatório**: se inicia com os elementos positivos *clk* e *cyc*, onde os seus produtos formam um heterodímero (**CLK/CYC**) que se liga às sequências regulatórias e ativam a transcrição de *per* e *cry-m*. Os produtos de *per* e *cry-m* se acumulam no meio da noite no citoplasma dos neurônios circadianos e agem como elementos negativos, formando um heterodímero (**PER/CRY-m**) que retorna ao núcleo e reprime a sua própria transcrição através da interação com **CLK/CYC**. A repressão de *per* e *cry-m* resulta em baixos níveis de **PER** e **CRY-m**, o que eventualmente libera o heterodímero **CYC-CLK** da inibição, reativando a transcrição de *per* e *cry-m*. Essa reativação dará início à próxima rodada do primeiro ciclo. 2) **segundo ciclo autoregulatório**: A transcrição de *pdp1* e *vri* é ativada pela ação de **CYC-CLK** que se liga à região **v/p - box** de ambos os genes. Uma vez transcrito, o produto de *pdp1* pode retornar ao núcleo para ativar a transcrição de *clk*, enquanto o produto de *vri* faz o papel antagonista, inibindo a transcrição de *clk*. Ainda não está estabelecido como os genes *tim2* e *cwo* atuam dentro do mecanismo proposto (Figura baseada nas informações disponíveis por Rubin et al. 2006; Bloch 2010). Os ritmos circadianos gerados no sistema nervoso central são capazes de enviar informações temporais aos tecidos periféricos para sincronizar diversas atividades fisiológicas.

1.5. Justificativa

O entendimento do sistema circadiano têm contribuído para elucidar aspectos importantes da biologia de insetos e revelado o papel essencial dos ritmos circadianos em coordenar diversas funções. Os dados disponíveis na literatura demonstram a importância do conhecimento do relógio biológico na busca de soluções para inúmeros problemas, desde o controle de pragas e vetores até estratégias para tratamento de doenças como câncer e Alzheimer. Em abelhas, o conhecimento a respeito do seu relógio biológico não é só importante para entender sobre a sua biologia básica, mas também pode ser aplicado em campo, no intuito de manejar de forma mais eficiente as colônias e obter uma melhor produção de mel de acordo com as estações do ano, já que o ciclo circadiano é influenciado pelas mudanças sazonais. Além disso, os estudos cronobiológicos em abelhas podem ser associados às investigações em torno do distúrbio do colapso das colônias (*colony collapse disorder* – CDD), uma vez que os neonicotínoídes afetam o sistema nervoso central, o que nos faz questionar se a toxicidade desses compostos poderiam afetar os ritmos circadianos e comprometer a navegação das abelhas pela bússola solar e retorno à colmeia. Vale ressaltar, que o estudo do relógio biológico molecular em abelhas também nos permite colocar esse inseto como um modelo interessante que pode ser comparado com mamíferos, uma vez que acredita-se que o funcionamento molecular de ambos apresenta similaridades relevantes, o que ajuda no entendimento da evolução social dos relógios biológicos.

Até o momento as pesquisas sobre o ciclo circadiano em abelhas têm sido realizadas apenas em abelhas operárias adultas, mesmo assim nem todos os elementos genéticos que compõem esse sistema estão caracterizados. Além disso, utilizar um inseto social como organismo modelo para estudar os ritmos circadianos abre novas avenidas dentro do campo de sociocronobiologia, onde podemos avaliar como os ritmos circadianos são modulados de acordo com as interações sociais que ocorrem entre os diferentes indivíduos presentes em um ambiente. O envolvimento dos genes do relógio no desenvolvimento embrionário e imaturo de insetos, e ainda, como os ritmos circadianos podem atuar regulando as transições do desenvolvimento que dependem de um espaço-tempo bem definido está para ser investigado. Além dos genes do relógio, outros mecanismos moleculares que atuam modulando os ritmos circadianos foram pouco caracterizados em insetos e acredita-se que moléculas como os microRNAs (miRNAs) possam ter um papel essencial em modular a expressão dos genes do relógio em nível pós-transcricional. Uma vez que um vasto número de microRNAs já foi descrito em *A. mellifera* e as investigações sobre suas funções

permitiram conclusões muito relevantes (Freitas et al. 2017; Macedo et al., 2015), torna-se mandatório investigar quais microRNAs estariam possivelmente envolvidos na regulação dos componentes do ciclo circadiano.

Neste projeto desenvolvemos uma análise detalhada dos genes canônicos do relógio em *A. mellifera* ao longo de todo o desenvolvimento de abelhas operárias. Ainda, verificamos a relação desses genes com um hormônio morfogenético e investigamos outras possíveis moléculas reguladoras dos ritmos circadianos. Acreditamos que os genes do relógio estão envolvidos na manutenção dos ritmos circadianos desde o estágio inicial do desenvolvimento, o embrião, até momentos da fase adulta definidos pela fase jovem e o início do processo de senescência. E, adicionalmente, que os miRNAs e os hormônios morfogenéticos exercem um papel importante em regular os genes do relógio e garantir os ritmos circadianos em abelhas.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi caracterizar os componentes genéticos que modulam os ritmos circadianos em *A. mellifera* no desenvolvimento embrionário, larval, pupal e ao longo da idade cronológica adulta de operárias, correlacioná-los e investigar suas funções.

Para alcançar o objetivo principal, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar a expressão dos genes canônicos do relógio (*per*, *cry-m*, *cyc*, *clk*, *tim2*, *pdp1*, *vri*, *cwo*) no desenvolvimento embrionário e pós-embrionário (larvas e pupas) de abelhas operárias;
- Caracterizar a expressão dos genes canônicos do relógio no decorrer da idade cronológica e ao longo de 24 horas em abelhas operárias adultas;
- Identificar os possíveis sítios de interação de miRNAs nas regiões 3'UTR (não-traduzidas) dos genes do relógio e elaborar redes de interação miRNA-mRNA
- Validar a expressão dos miRNAs putativos que estão envolvidos na regulação pós-transcricional dos genes do relógio em abelhas operárias adultas,
- Validar experimentalmente as interações entre o miR-34 e seus alvos através do ensaio por luciferase;
- Elaborar uma rede de interação proteína-proteína (PPI) para os genes do relógio canônicos.
- Avaliar se os genes do relógio são modulados diferencialmente frente ao tratamento com o hormônio juvenil na fase de pupa de olho branco.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análise *in silico* dos componentes moleculares canônicos e reguladores do ciclo circadiano

3.1.1. Reanotação dos genes canônicos do relógio circadiano

Nessa etapa, realizamos uma análise prévia *in silico* para caracterizar a estrutura dos genes do relógio, o que nos garantiu informações essenciais que foram úteis para as análises experimentais. Para caracterizar a estrutura gênica dos genes do relógio foram recuperadas as sequências em nucleotídeos dos genes *period* (*per*), *cryptochrome mammalian-like* (*cry-m*), *cycle* (*cyc*), *clock* (*clk*), *timeout 2* (*tim2*), *par domain protein 1* (*pdp1*), *vri* (*vri*) e *clockwork orange* (*cwo*) com base na versão mais recente do genoma de *A. mellifera* (versão 4.5, Official Gene Set 3.2, Elsik *et al.* 2014), disponível na base de dados BeeBase (<http://hymenopteragenome.org/beebase/>). Para reanotar os genes em estudo, recuperamos arquivos no formato FASTA, incluindo informações sobre o grupo cromossômico em que cada gene está localizado. Recuperamos também arquivos no formato *gff*. A reanotação gênica foi realizada a partir da ferramenta Artemis 7.0 (Rutherford *et al.* 2000), onde conseguimos obter as informações estruturais do gene tais como número de éxons e íntrons. Avaliamos também a conservação dos genes do relógio com outras espécies usando a ferramenta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.1.2. Busca por *reads* que mapeiam com as sequências nucleotídicas dos genes do relógio em bibliotecas de expressão de embriões

Para verificar se os genes do relógio são expressos ao longo do desenvolvimento embrionário de *A. mellifera*, realizamos uma análise preliminar em bibliotecas de expressão de embriões haploides (machos) e diploides (fêmeas) (Pires *et al.* 2016). A biblioteca de expressão compreende dados do transcriptoma referentes a ovócitos maduros e embriões haploides e diplóides nos tempos desenvolvimento de 1, 2, 6, 24, 38 (apenas para os diplóides), 48 e 72 horas. A busca foi realizada através do mapeamento de *reads* que gerassem *matches* para as sequências nucleotídicas dos genes do relógio em análise e a partir disso recuperamos os valores de expressão em *rpkm*.

3.1.3. Identificação de interações miRNA-mRNAs em *A. mellifera*

Para identificar as interações putativas entre miRNAs e os mRNAs correspondentes aos genes do relógio em abelhas, foi realizada uma busca por sítios de ligação de miRNAs nas regiões 3'UTR (*untranslated region*) de todos os genes canônicos do relógio para *A. mellifera* utilizando a ferramenta RNAhybrid (Rehmsmeier *et al.*, 2004; Kruger & Rehmsmeier, 2006). Recuperamos as regiões de 1000 nt à jusante (*downstream*) do códon de parada dos genes codificadores (versão 4.5; Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) para serem utilizadas como 3'UTRs. Destacamos que para usar este valor, de 1000 nt, consideramos dados de *D. melanogaster* que registram uma média de 500 nt, uma vez que a anotação das regiões 3'UTRs ainda não foi finalizada no genoma de *A. mellifera*.

Selecionamos os sítios preditos de ligação aos miRNAs com base na energia livre da interação miRNA-mRNA alvo (energia livre ≤ -20 kcal/mol) e não com base na presença de uma *seed* (nucleotídeos de 2 a 8 da região 5' do miRNA) conservada, permitindo o pareamento G:U, já que esse tipo de pareamento não prejudica as interações (Vella *et al.*, 2004; Didiano & Hobert, 2006; Didiano & Hobert, 2008). Optamos pela escolha dos sítios com base na energia livre, pois alguns sítios de ligação mesmo sem a presença de uma *seed* podem ser reconhecidos por miRNAs (Didiano & Hobert, 2006; Didiano & Hobert, 2008; Lal *et al.*, 2009; Fasanaro *et al.*, 2012). Realizamos o mesmo procedimento para *D. melanogaster*, com a finalidade de observar sítios conservados de interação miRNA-mRNA. A partir das interações miRNA-mRNA preditas no genoma de *A. mellifera*, elaboramos uma rede de interação na plataforma *Cytoscape* (Shannon *et al.* 2003), ilustrando os possíveis miRNAs candidatos a regular os genes do relógio em nível pós-transcricional.

3.1.4. Identificação de interações proteína-proteína em *A. mellifera*

No intuito de verificar as possíveis interações entre os produtos dos genes do relógio com outras proteínas, reconstruímos uma rede de interação proteína-proteína baseando-se nos dados disponíveis no banco de dados *BioGrid* versão 3.4.138. Esta plataforma apresenta dados curados de interações entre genes e proteínas para uma variedade de espécies. No entanto, o BioGrid ainda não dispõe de dados para *A. mellifera* e outras espécies de abelhas ou outros Hymenoptera, e dessa forma, nos baseamos nas interações disponíveis para *D. melanogaster* e *M. musculus*, ressaltando mais uma vez que os genes do relógio apresentam órtologos nas duas espécies. Através de uma busca direta pelo gene de interesse, recuperamos as informações das interações em nível protéico dos genes do relógio com

outras proteínas. A partir disso, selecionamos aquelas proteínas que estão presentes em *A. mellifera* e reconstruímos uma rede de interação proteína-proteína através da ferramenta Cytoscape versão 3.4.0. Realizamos também uma análise da ontologia gênica para as proteínas presentes na rede de interação utilizando as ferramentas *online* disponibilizadas pelo GeneOntology Consortium (www.geneontology.org), PANTHER Classification System (www.pantherdb.org) e FlyBase (www.flybase.org).

3.2. Abordagem experimental

3.2.1. Material Biológico

Nesse estudo foram utilizadas abelhas africanizadas da espécie *A. mellifera*, mantidas no apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo (FMRP-USP).

3.2.2. Amostras de embriões

Nessa etapa, selecionamos algumas etapas do desenvolvimento embrionário para realizar a validação da expressão dos genes do relógio por PCR em tempo real quantitativo (qPCR). Para a obtenção dos embriões com idades controladas confinamos uma rainha fecundada em um favo com células limpas (células para postura de operárias e zangões) no interior de uma colônia em condições naturais. O confinamento ocorreu num intervalo de 6 horas para que atingíssemos um número adequado de embriões para as análises moleculares e assegurasse que a diferença de idade entre os indivíduos amostrados não fosse muito grande. Embriões fêmeos foram coletados nos tempos de 6h, 24h, 38h, 48h e 72 h, os quais correspondem às fases embrionárias de clivagem, blastoderme, gastrulação, banda germinativa, e corpo larval, respectivamente. Para cada amostra, foram coletados 50 embriões fêmeos diretamente das células, transferidos para microtubos de 1,5 mL aos quais foram adicionados 500 µL de TRIzol® (Invitrogen). Foram formados *pools* de 50 embriões para cada n experimental (n=3). As amostras foram mantidas em uma temperatura de -80°C até o momento da extração de RNA total.

3.2.3. Amostras de larvas e pupas

O procedimento para obtenção de larvas e pupas foi o mesmo usado para obtenção dos embriões, e neste caso o espaço disponível para postura foi limitado por uma tela excludora de rainha. Dessa forma, a rainha apenas realizou a postura de ovos na região em que foi confinada, o que nos permitiu controlar o desenvolvimento pós-embrionário e realizar a coleta de larvas e pupas nos momentos planejados. Após 72 horas em que se dá o desenvolvimento embrionário, iniciamos a coleta de larvas sequencialmente no intuito de avaliar a progressão do desenvolvimento larval. Foram coletadas larvas nos estágios L2, L3, L4, L5F (larva no 5º estágio, na fase de alimentação), L5S (larva no 5º estágio na fase de tecelagem do casulo) e PP (pré-pupa) de acordo com as características representadas na Tabela 2 (segundo Michelette e Soares, 1993). Em relação ao desenvolvimento pupal, foram coletadas pupas nos seguintes estágios: Pw (pupa de olho branco), Pp (Pupa de olho rosa), Pb (pupa de olho marrom) e Pbm (pupa de olho marrom com pigmentação intermediária). Todas as amostras de larvas e pupas foram coletadas na ausência de luminosidade, para evitar que a exposição à luz afetasse a expressão dos genes do relógio. Vale ressaltar que todas as amostras foram coletadas exatamente no mesmo horário, às 10 horas da manhã, ou seja, no mesmo momento do ciclo circadiano.

Tabela 1 – Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval e pupal de operárias de abelhas africanizadas *A. mellifera*. A duração dos estágios larvais durante o desenvolvimento pre-imaginal refere-se às horas após eclosão (modificado de Michelette e Soares, 1993).

Fase do Desenvolvimento	Caracterização	Duração (horas)	
Ovo	Embriões de 0 a 72 horas	72 (antes da eclosão)	0-6(0d)
L1	peso – 0,0001 a 0,0003 g	0-20 (após eclosão)	(4d)
L2	peso – 0,0003 a 0,001 g	20-35	
L3	peso – 0,0015 a 0,004 g	35-55	
L4	peso – 0,004 a 0,0248 g	55-80	
L5F (fase de alimentação)	peso – 0,029 a 0,16 g	80-115	
L5S (fase de tecelagem de casulo)	célula operculada	115-145	
PP (pré-pupa)	comprimento tibia-tarso 1,4 até 2,6 mm	145-190	
Pw (pupa de olho branco)	Pupa de olho branco (white)	190-230	
Pp (pupa de olho rosa)	pupa de olho rosa (pink)	230-250	

Pb (pupa de olho marrom)	pupa de olho marrom (brown)	265-305
Pbm (pupa de olho marrom com pigmentação intermediária)	pupa de olho marrom, com pigmentação torácica intermediária	330-370
RN	Operárias de até 24 horas de vida	

*Em rosa são os estágios de larva e pupa que foram analisados

3.2.4. Colônia especial de observação (single-cohort colony)

Para a coleta de abelhas operárias ao longo da idade cronológica adulta, utilizamos uma caixa de observação especial para estabelecer uma *single-cohort colony*. Neste modelo é possível controlar a idade do desenvolvimento adulto e a maturação comportamental, bem como coletar abelhas de mesma idade. Para montagem da colônia especial obtivemos favos contendo pupas próximas à emergência, de pelo menos 3 diferentes colônias do apiário experimental e os transferimos para uma incubadora ($32^{\circ} \pm 0.5^{\circ} \text{ C}$, $55 \pm 5\%$ de umidade relativa) para a obtenção de abelhas recém-emergidas. Aproximadamente 1500 abelhas recém-emergidas, com no máximo 24 horas de vida, foram marcadas no tórax com uma caneta especial para reconhecimento e coleta durante o experimento. Essas abelhas foram transferidas para uma caixa de observação especial (Figura 4) contendo um favo com alimento (pólen e mel), células para postura e uma rainha virgem sem parentesco com as operárias. A caixa de observação foi mantida em uma sala experimental com temperatura controlada ($\sim 28^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{ C}$) e foi devidamente vedada com EVA preto para minimizar a exposição a qualquer fonte de luz (imitando as condições naturais). Para complementar a alimentação das abelhas nessa colônia especial, disponibilizamos uma mistura de água, açúcar e pólen no topo da colônia, onde as operárias pudessem acessar com probóscide. A caixa de observação contém uma saída onde foi feita a conexão da colônia com o exterior da sala de observação, usando uma mangueira de silicone. Este procedimento permitiu a movimentação das abelhas no ambiente externo para reconhecimento de voo, coleta de alimento e contato com a luz solar. Abelhas marcadas com idades de 3, 7, 15 e 25 dias foram coletadas em diferentes períodos ao longo de 24 horas, em um intervalo de 5 horas entre uma coleta e outra (7h, 12h, 17h, 22h). Foi coletado um n experimental de 5 a 10 abelhas por ponto. As coletas foram realizadas com o máximo de cuidado para não haver exposição das abelhas à luz, o que poderia influenciar a expressão e fase de oscilação dos genes do relógio. As coletas no período noturno foram realizadas na presença de luz vermelha, já que abelhas

não enxergam esse espectro de cor. Após coletadas, as abelhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e logo em seguida suas cabeças foram removidas e colocadas em tubos de 1,5 mL contendo 500µL de Trizol para posterior análise. O experimento foi realizado entre os meses de Setembro a Outubro durante a estação da primavera. Nós mantivemos as colônias em ausência total de luz assim que iniciamos o experimento e não utilizamos regimes de luz artificial para sincronizar a população da colônia. Entretanto, os indivíduos da colônia estavam susceptíveis a sofrerem sincronização social de seus relógios biológicos através das abelhas forrageiras que experimentaram um ambiente diferente fora da colônia, bem como pelas nutrízes que realizam voos de reconhecimento e ainda necessitam sincronizar seus relógios com o relógio das forrageiras para recebimento de néctar (revisado por Guy Bloch, 2010).

Figura 4 – Modelo de caixa de observação utilizado para estabelecimento da colônia especial de observação. A caixa é construída em madeira e vedada com placas de vidros com aberturas que facilitam as coletas. Após a introdução das abelhas marcadas, a caixa é vedada em ambos os lados e mantida em ambiente com a temperatura controlada e ausência de luz. Uma conexão da caixa de observação com o ambiente externo da sala é feita através de uma magueira para que as abelhas possam transitar livremente no ambiente externo. Obs: a foto é meramente ilustrativa e não corresponde ao experimento realizado em si, pois não podemos expor a colônia a qualquer fonte de luz após o início dos experimentos.

3.2.5. Extração do RNA total

As amostras de embriões, larvas, pupas e cabeças de operárias adultas (em tubos contendo 500 uL de TRIzol®) foram homogeneizadas com o auxílio de pistilos plásticos. Os tubos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente para quebra de membranas

e dissociação dos complexos nucleoproteicos. Em seguida, foram centrifugados a 12.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos para separação das carcaças, quando presentes. Os sobrenadantes de TRIzol® foram transferidos para tubos de centrífuga de 2 mL, adicionando-se 100 µL de clorofórmio. Após agitação manual por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos, as soluções foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C, por 15 minutos. Para retirar excessos de gordura em amostras de larvas e pupas, repetiu-se a etapa de adição de clorofórmio. Os sobrenadantes (fase transparente, aproximadamente 400 µL) foram transferidos para tubos de 1,5 mL acrescidos de 250 µL de isopropanol. Para as amostras de embriões, adicionamos glicogênio UltraPure™ Glycogen (Invitrogen) (10µg/µL) juntamente com o isopropanol, com a finalidade de potencializar a precipitação do RNA e mantivemos as amostras por 24 horas a -20°C. Após 10 segundos em aparelho agitador de tubos (*vortex*), as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os produtos precipitados (*pellets*) foram lavados com 500 µL de etanol 75% mediante agitação em *vortex* e novamente centrifugados a 7.500 rpm a 4°C, por 5 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e os tubos colocados em termobloco *Digital Dry Bath Incubator* (Boekel) a 55°C, por 5 minutos, para evaporação de etanol residual. Para evitar degradação por RNases, os *pellets* foram ressuspensos em água DEPC 0,1% (30µL para amostras de embriões e cabeças de operárias e 50µL para amostras de larvas e pupas). A pureza (estimada por meio da razão entre os valores da leitura a 260 e 280 nm) e concentração (dada em µg/ µL) da solução final de cada amostra foram obtidas por absorbância óptica a 260/280 nm, em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies).

3.2.6. Síntese de cDNA e PCR em tempo real para quantificação dos transcritos de mRNAs

O RNA total purificado foi submetido à reação de Transcrição Reversa (RT) para a síntese de moléculas de cDNA, em volume final de 20µL, a partir do seguinte protocolo: 1 µL de oligo(dT)12-18 (500 ng/µL), 1 µL de uma mistura de dNTPs (10 mM), com incubação em termociclador a 65°C por 5 min; 4 µL de tampão 5x first strand (Invitrogen), 2 µL de ditriotretitol 0,1 M (DDT, Invitrogen), 1 µL de inibidor de Rnase (RNase OUTTM, 40 U/µL, Invitrogen), com incubação a 42°C por 2 min; 0,5 µL de água ultrapura autoclavada e 0,5 µL da enzima SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 U/µL, Invitrogen), com incubação

a 42°C por 50 min, com posterior ciclo de inativação da enzima a 70°C por 15 min. As quantidades de RNA total foram padronizadas para cada tipo de amostra, sendo 2µg para embriões, 1,5µg para cada unidade de cabeça de operária (correspondente a uma amostra biológica) e 3µg para o corpo inteiro de larvas e pupas.

A partir do cDNA obtido, foi realizada a análise da expressão gênica dos genes do relógio *per*, *cry-m*, *cyc*, *clk*, *tim2*, *pdp1*, *vri* e *cwo* por meio de qPCR, utilizando o protocolo do reagente SYBR Green (Applied Biosystems). Foram desenhados e testados experimentalmente *primers* específicos para a amplificação de cada gene analisado conforme listados na Tabela 2. A reação final consistiu em: 10 µL de solução SYBR® Green (Applied Biosystems), 6,4 µL de água deionizada e autoclavada, 0,8 µL de cada primer (10 pmol/µL) e 2 µL da solução de cDNA (diluição 1:10). As reações foram realizadas em triplicatas biológicas e técnicas e processadas em aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos), seguidos por 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto). Para normalizar a expressão dos mRNAs foi utilizado o gene *ribosomal protein L32 (rpl32)* como sugerido por Lourenço et al. (2008) e as análises da expressão gênica relativa foram realizadas a partir do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em planilhas eletrônicas do *Microsoft Excel (Microsoft Excel)* (Livak & Schmittgen 2001). As análises estatísticas foram realizadas através do programa *GraphPad Prism*. Para verificar a significância das diferenças nos perfis de expressão gênica encontradas foi utilizado o teste 1-Way ANOVA, com apenas um critério, seguido pelo teste t de *Tukey*, considerando $p < 0.05$.

Tabela 2 – *Primers* específicos utilizados nas reações de qPCR, desenhados a partir da reanotação dos genes.

Gene	Código do primer	Sequência 5' -> 3'	Tamanho do fragmento amplificado
<i>rpl32</i>	<i>rpl32 – F</i>	CGTCATATGTTGCCAACTGGT	150pb
	<i>rpl32- R</i>	TTGAGCACGTTCAACAATGG	
<i>per</i>	<i>per – F</i>	AGCAATGACGAGGGTGGAAA	218pb
	<i>per -R</i>	CTCTCTACTTGCCGAACCTGTTTG	
<i>cry-m</i>	<i>cry-m -F</i>	CGGTTGTTCAAAAGGTCTCACA	142pb
	<i>cry-m -R</i>	ACTGTTGGTACTGGTGGTTC	
<i>clk</i>	<i>clk -F</i>	GGATATTTTCGGTCTGATGTCGATAC	124pb
	<i>clk -R</i>	ACGTCCTGTACCCACGAAAAC	
<i>cyc</i>	<i>cyc -F</i>	TCCAAAAGATGTGGCCAAGGT	138pb
	<i>cyc -R</i>	GCACCAGGACACAATCTCGA	
<i>tim2</i>	<i>tim2-F</i>	GCGAAGAAACAGACAACGATGGT	148pb
	<i>tim2 -R</i>	CCAGAGCCTCGCTCATATTTCTTT	
<i>pdp1</i>	<i>pdp1-F</i>	CACTATGAACCCTCCCTCGC	113pb
	<i>pdp1-R</i>	ATCGGTTGGGGTTTCAGCTC	
<i>vri</i>	<i>vri-F</i>	CCGGACAACAAGAAGGACGA	104pb
	<i>vri-R</i>	TCGAGCACCATGTCGTTGAA	
<i>cwo</i>	<i>cwo-F</i>	TGAAGAAGGGTCGAGGAAGA	180pb
	<i>cwo-R</i>	GTGTACCGACGTCCTGCAG	

3.2.7. Síntese de cDNA e PCR em tempo real para quantificação dos transcritos de miRNAs

Para a detecção e quantificação dos miRNAs, moléculas de cDNA de fita simples foram sintetizadas a partir do RNA total (item 3.2.6), nas mesmas quantidades utilizadas na seção anterior, utilizando-se o kit *NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, a primeira fita de cDNA foi utilizada em reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e para cada miRNA foi usado um *primer forward* específico para o miRNA de interesse (Tabela 3) e um *primer reverse* universal fornecido pelo kit NCode™. O *primer forward* específico para cada miRNA foi desenhado utilizando a sequência completa do miRNA maduro. Os níveis

de expressão dos miRNAs de interesse foram mensurados por qPCR utilizando-se o reagente SYBR® Green Master Mix 2x (Applied Biosystems) e um aparelho espectrofluorimétrico 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). A reação final consistiu em: 10 µL de solução SYBR® Green (Applied Biosystems), 6,4 µL de água deionizada e autoclavada, 0,8 µL de cada primer (10 pmol/µL) e 2 µL da solução de cDNA (diluição 1:10). As reações foram montadas em triplicatas (embriões) e quintuplicatas (cabeças de ovariárias adultas) biológicas e técnicas e processadas em aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos), seguidos por 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto). O ciclo de dissociação para todos os *primers* foi 95°C a 60°C (15 segundos em cada grau), 60°C (1 minuto), 60°C a 95°C (15 segundos em cada grau). Os resultados foram normalizados com base na expressão do gene codificador do pequeno RNA nuclear 5 (U5), componente constitutivo da maquinaria do spliceossoma. A quantificação relativa dos transcritos foi calculada utilizando o método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em planilhas eletrônicas do *Microsoft Excel* (*Microsoft Excel*) (Applied Biosystems, User bulletin # 2). As análises estatísticas foram realizadas do mesmo modo que citado no item 3.2.6.

Tabela 3 – *Primers* específicos usados para análise da expressão de miRNAs. O *primer* reverso dos miRNAs corresponde ao fornecido pelo kit NCode, com sequência não informada.

Gene	Código do primer	Sequência 5' -> 3'	Tamanho do fragmento amplificado
<i>snU5</i>	<i>snU5</i> - F	CTCTGGTTTCCCTTCAAATC	74pb
	<i>snU5</i> - R	ATCAATTGTTCCCCTCCACG	
<i>miR-263b</i>	<i>miR-263b</i> -F	CTTGGCACTGGAAGAATTCAC	45pb*
<i>miR-34</i>	<i>miR-34</i> -F	TGGCAGTGTTGTTAGCTGGTTG	45pb*
<i>miR-31a</i>	<i>miR-31a</i> - F	GGCAAGATGTCCGCATAGCTGA	45pb*

*a sequência e tamanho do *primer* universal não são divulgados pelos fabricantes. A informação que temos é que os amplicons formados tem em torno de 45pb, o que se confirma quando analisamos os produtos de amplificação em gel de agarose a 1,2%.

3.2.8. Validação das interações entre o miR-34 e as regiões 3'UTRS dos genes do relógio

Nessa etapa, escolhemos o miR-34 para validar as interações putativas com sítios de ligação presentes nas regiões 3'UTR dos genes do relógio. Selecionamos esse miRNA devido à sua importância em regular processos que ocorrem principalmente no sistema nervoso central de insetos, além de ser um miRNA conservado. Inicialmente, adicionamos as sequências correspondentes às 3'UTRs na anotação dos genes do relógio que são potencialmente regulados pelo miR-34. A estrutura de cada um dos genes candidatos foi reanotada com base no arquivo *gff* disponível para a versão recente do genoma de abelhas (*Official Gene Set*, versão 3.2) através da plataforma UNIGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012). Os sítios de ligação preditos também foram anotados, permitindo assim o desenho de *primers* que flanqueiam os sítios preditos na 3'UTR com o auxílio do programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). A cada par de *primers* foi adicionado o sítio de restrição para a enzima Xho-I (*primer forward*) ou Not-I (*primer reverse*) e uma extensão (CAGTGACT) que permite o melhor ancoramento da enzima de restrição (Tabela 4). Os *primers* foram elaborados para a validação das 3UTRs dos genes em estudo. Esses sítios de enzima de restrição foram utilizados para inserção do fragmento amplificado em um vetor de clonagem.

Para validar as regiões não traduzidas, onde estão inseridos os sítios de ligação entre o miR-34 e os genes do relógio, utilizamos a técnica de RT-PCR semi-quantitativa com os *primers* citados na seção anterior. A validação dessas regiões não é somente importante para nossas análises, mas também é uma forma de curadoria dessas regiões não traduzidas preditas em nossos genes. Este procedimento nos dá maior confiança quando recuperamos dados dos bancos de dados como NCBI e Beebase, onde podemos observar que ainda há poucos dados experimentais que validaram as 3'UTRS em *A. mellifera*. Inicialmente, *primers* foram usados na amplificação (RT-PCR) das regiões que continham os sítios de ligação do miR-34 utilizando-se um *pool* de cDNAs de larvas e cabeça de operárias adultas como molde (cDNAs utilizados nas seções anteriores para validação da expressão dos genes do relógio). A lista de *primers* utilizados encontra-se na Tabela 4. Fragmentos que continham os sítios preditos das 3'UTRs dos genes candidatos foram amplificados por PCR utilizando-se 25 µL de solução *Master Mix* (2X, Eppendorf), 18 µL de água milli-Q autoclavada, 2,0 µL de cada *primer* (10pmol/µL), e 3 µL de cDNA (concentrado). As reações foram feitas no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*), e a temperatura inicial de pareamento dos *primers* e o número inicial de ciclos foram, respectivamente, 60°C e 40.

Tabela 4 - Relação dos genes e de seus respectivos *primers* utilizados para amplificação das 3'UTRs de *A. mellifera*. Os trechos sublinhados correspondem à extensão para o ancoramento das enzimas de restrição (CAGTGACT) e aos sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas Xho-I (CTCGAG) e Not-I (GCGGCCGC).

Gene	Nome dos primers	Sequência 5' > 3'	Fragmento (pb)
<i>per</i>	per-sítio1-3UTR-miR34-F	<u>CAGTGACT/CTCGAG/GCAAGATTCTCATTGCTTCTGA</u>	173
	per-sítio1-3UTR-miR34-R	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/AGAAGAAGAGTTGCATAAATAC</u>	
	per-sítio2-3UTR-miR34-F	<u>CAGTGACT/CTCGAG/CGAAAGGAGTTTTTCGGTGA</u>	223
	per-sítio2-3UTR-miR34-R	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/TATTATCGCGCACATCGTGC</u>	
<i>tim</i>	tim-sítio1-3UTR-miR34-F	<u>CAGTGACT/CTCGAG/TCGAACGATGACCGTAAAAA</u>	198
	tim-sítio1-3UTR-miR34-R	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/ACAGGAGATTGCAAATATAT</u>	
	tim-sítio2-3UTR-miR34-F	<u>CAGTGACT/CTCGAG/TCTCTTATTACGGTGCTGCC</u>	175
	tim-sítio2-3UTR-miR34-R	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/TAATATAAAAATGAAGCGCTT</u>	
<i>cyc</i>	cyc-sítio1-3UTR-miR34-F	<u>CAGTGACT/CTCGAG/AATTTAATGGAAAGTAGTGC</u>	278
	cyc-sítio1-3UTR-miR34-R	<u>CAGTGACT/GCGGCCGCC/ACCTCTCATCGACTGCTACC</u>	
<i>cry-m</i>	cry-sítio1-3UTR-miR34-F	<u>CAGTGACT/CTCGAG/CTAAGACGACGCAACGACAG</u>	245
	cry-sítio1-3UTR-miR34-R	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/ATAAGTAATTATTTGAATAAATT</u>	
<i>cwo</i>	cwo-sítio1-3UTR-miR34-F	<u>CAGTGACT/CTCGAG/AGGAACGATGATGTCGCTCT</u>	153
	cwo-sítio1-3UTR-miR34-R	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/AGATGATGATCGGGATCAC</u>	
	cwo-sítio3-3UTR-miR34-F	<u>CAGTGACT/CTCGAG/TGAATTTTCATGTGGGACACAG</u>	165
	cwo-sítio3-3UTR-miR34-R	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/CGCACGTATCGACGGTTGG</u>	
	pdp1-sítio1-3UTR-miR34-F	<u>CAGTGACT/CTCGAG/CAGGAACCTGGACCGGTTAA</u>	187

<i>pdp1</i>	pdp1-sítio1-3UTR-miR34-R	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/CTCTTCTTTTCATCCGAAC</u> TG	
	pdp1-sítio2-3UTR-miR34-F	<u>CAGTGACT/CTCGAG/CTTCCCTCCAGTGCTCCTTT</u>	154
	pdp1-sítio2-3UTR-miR34-R	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/CAGAGCGTCATACTTTT</u> ACA	
<i>vri</i>	vri-sítio2-3UTR-mir34-F	<u>CAGTGACT/CTCGAG/CATATATGCGTATAAAGGA</u> AT	200
	vri-sítio2-3UTR-mir34-R	<u>CAGTGACT/GCGGCCGC/CAGAGAAACGCATCCTC</u> GAT	

3.2.9. Clonagem e inserção das regiões 3'UTRs dos genes candidatos no vetor PsiCHECK2

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

Após a amplificação por PCR os produtos foram analisados em gel de agarose 1%. Os fragmentos dos genes do relógio contendo as regiões que apresentam os sítios de ligação para o miR-34 foram purificados utilizando-se o *PurelinK™ Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen). Inicialmente, as bandas foram excisadas sob luz UV usando-se um bisturi e transferidas para tubos de 1,5 mL. Após pesadas, as bandas foram solubilizadas pela da adição de 30 µL de *Gel Solubilization Buffer* (GSI) para cada 10mg de peso e incubadas a 50° C por 15 minutos para total dissolução da agarose. Em seguida, as soluções foram submetidas a centrifugação em colunas a 12.000 rpm por 1 minuto. Adicionou-se 700µL de *Wash Buffer* (W9) contendo etanol diretamente nas colunas, seguindo por incubação por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 1 minuto (2x) para remover resíduos e as colunas foram transferidas para novos tubos eppendorf. Para eluir os fragmentos purificados, foram adicionados 30µL de *TE Buffer* (TE) na temperatura de 65° C no centro de cada coluna, seguido de incubação por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos. O DNA purificado contendo os sítios de ligação para o miR-34 foi quantificado e cada amostra foi estocada em -20° C até a etapa de digestão.

Ambos, o vetor PsiCHECK2 (2 µg) e o fragmento purificado (~700 ng) foram digeridos por 0,5 µL da enzima Not-I HI-Fi (20.000U/mL; *New England Biolabs*) e 0,5 µL

de Xho-I (5.000U/mL; *New England Biolabs*) em uma reação com 4,0 µL de *CutSmart Buffer* (*New England Biolabs*) e água ultrapura até completar o volume de 30 µL. As reações de digestão foram incubadas por 3 horas a 37°C, seguido de 30 min a 65°C para inativação das enzimas.

O vetor PsiCHECK2 digerido foi desfosforilado por 3µl da enzima *Alkaline Phosphatase* (Promega), 6 µL do tampão *Alkaline Phosphatase 10X Reaction Buffer* (Promega) e água ultrapura até completar o volume de 60 µL. A reação de desfosforilação foi incubada por 2 horas a 37°C, e depois por 15 min a 75°C para inativação da enzima. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão 1x TAE (diluído a partir de uma solução TAE 50x: 242 g de Tris Base, 57,1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de solução de EDTA dissódico, 0,5 M, pH 8) e posteriormente corado (5 µL de SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (10.000x concentrado, Invitrogen) por 100 mL de gel). O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado com a migração do marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen). Os géis foram visualizados e fotografados com auxílio do aparelho Kodak EDAS 290. As bandas foram recortadas do gel de agarose e purificadas utilizando-se o *PurelinK™ Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen). A reação de ligação foi realizada com 1,5 µl T4 DNA Ligase (Promega), 4,0 µl 2X *Rapid Ligation Buffer*, T4 DNA Ligase (Promega); 150 ng dos fragmentos de 3'UTRs digeridos, 50 ng de vetor PsiCHECK2 digerido e defosforilado e água ultrapura até completar o volume de 20 µL. A solução de digestão foi incubada durante 3 minutos à temperatura ambiente a solução de ligação, e posteriormente as amostras foram incubadas por 16 horas a 4°C. A inativação da enzima T4 DNA Ligase foi realizada através da incubação das amostras a 65°C por 15 minutos.

Bactérias quimicamente competentes (*Dh5-Alpha Competent E. coli*) foram misturadas a 20 µl da solução de ligação e deixadas por 30 minutos no gelo, em seguida, as foram transfectadas com o vetor PsiCHECK2+3'UTR por choque térmico (42°C por 45 segundos, seguido, imediatamente, de dois minutos no gelo). Adicionamos 700 µL de meio de cultivo LB Bocher (LB) líquido às bactérias transformadas, as quais foram incubadas por uma hora a 37°C sob agitação a 230 rpm. Bactérias transformadas foram semeadas (100 µL/placa) em placas de ágar (LB) sólido contendo ampicilina (200 ng/µL) e incubadas por 16 horas a 37°C.

Reações de PCR com *primers* específicos para o vetor PsiCHECK2 foram utilizadas para a identificação das colônias transfectadas com os vetores positivos para a inserção da 3'UTR. Dez microlitros de solução de PCR (5 µL de 2x *Master Mix*; 0,4 µL de 100 µM

primer forward; 0,4 µL de 100 µM *primer reverse* e água ultrapura, q.s.p. 10 µL) foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços. Com auxílio de uma ponteira as colônias de bactérias foram transferidas para uma nova placa de cultura (LB). As mesmas ponteiras, contendo bactérias, foram então utilizadas para realização das reações de PCR, com intuito de se confirmar a inserção dos fragmentos. A amplificação por PCR foi realizada por 40 ciclos (95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, 72°C por 30 segundos) utilizando-se *primers* que flanqueiam a região multiclonal do vetor PsiCHECK2. As amostras foram aplicadas a gel de agarose 1% (2,5 g agarose, 250 mL Tampão TAE 1x) e visualizadas e fotografadas com auxílio do aparelho Kodak EDAS 290. Após 16 horas, as colônias positivas para o vetor PsiCHECK2+3'UTR foram tocadas com uma ponteira na placa e a ponteira foi colocada em um tubo (15 mL) com 6 mL LB líquido + 6 µL Ampicilina (200 ng/µL) para o crescimento das bactérias. Os tubos foram incubados por 16 horas, a 37°C, 230 rpm. Então, os vetores PsiCHECK2+3'UTR foram purificados utilizando-se o kit *Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)* e quantificados em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies).

Para confirmar a sequência dos fragmentos clonados procederam-se reações de sequenciamento independentes nas duas direções (*sense* e *anti-sense*) utilizando o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems)*. O preparo da reação de sequenciamento foi realizado individualmente para cada direção e consistiu em adicionar 2µL de *BigDye v.3.1*, 2µL de *5x Sequencing Buffer*, 1 µL de *primer forward* ou *reverse* correspondente à região multiclonal do PsiCHECK2, 100ng de template (PsiCHECK2+3'UTR) e água ultrapura q.s.p. 10 µL. As amostras foram amplificadas por PCR em 25 ciclos (96° C por 10 segundos; 50°C por 5 segundos; 60°C por 4 minutos). Os vetores amplificados foram enviados ao Núcleo de Serviços em Biotecnologia localizado na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP/HC/FMRP/USP) onde as amostras foram precipitadas e sequenciadas no equipamento ABI 3500XL.

3.2.10. Transfecção em células HEK293T em cultivo e ensaio por luciferase

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

No dia anterior à transfecção, as células HEK293T obtidas de um cultivo que apresentava confluência de 70 a 90% foram semeadas em placas de 24 poços ($0,5 \times 10^5$ células/poço). Então, no segundo dia, as células HEK293T foram co-transfectadas com 200 ng/poço do vetor PsiCHECK2 (contendo ou não as 3'UTRs candidatas), 40 pmol/poço de miR-34 mimético ou sequência controle (outro miRNA mimético) usando 0,75 μ L/poço de *Lipofectamine 3000 Reagent* (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. Para cada gene, três condições experimentais foram testadas: 1) apenas o vetor, contendo o fragmento a ser investigado, foi transfectado; 2) o vetor e o miRNA mimético; 3) o vetor e o miRNA controle (Figura 5). Após 24 horas, a solução de transfecção foi removida e as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e lisadas em 300 μ L Passive Lysis Buffer (Promega) em temperatura ambiente por 15 min, 200 rpm. Dez microlitros do lisado celular foram transferidos para placas de 96 poços (Perkin Elmer). A atividade da luciferase do vaga-lume e da Renilla foram medidas utilizando-se o *kit Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Foram adicionados 50 μ L *luciferase assay reagent II* (LAR II) a cada poço e a atividade da luciferase do vaga-lume foi medida através do luminômetro *FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader*. Na sequência, 50 μ L do reagente *Stop&Glo* foi aplicado a cada poço e a atividade da luciferase da Renilla foi obtida. Uma vez que a luciferase do vaga-lume não é perturbada pela inserção de fragmentos espera-se que sua luminescência seja constante independente da condição experimental. Assim, a expressão da luciferase do vaga-lume serviu de controle da transfecção do vetor. Por sua vez, a atividade da luciferase da Renilla é diretamente afetada pela regulação pós-transcricional do miRNA, uma vez que, este pode ou não alvejar a sequência 3'UTR do gene investigado transcrito juntamente com o gene da Renilla. A razão matemática entre as atividades das luciferase da Renilla e do vaga-lume (Renilla/vaga-lume) foi calculada para cada experimento. No caso, da razão se manter constante em todas as condições de experimento, o sítio de ligação testado não é real. No entanto, se a razão for menor na presença do miRNA investigado, conclui-se que houve ligação deste miRNA no sítio predito.

A análise estatística dos resultados do ensaio de luciferase foi feita sobre os valores da razão Renilla/vaga-lume utilizando-se o *Teste t de Student* ($p < 0,05$), no *software GraphPad Prism 6* para identificar aqueles resultados que apresentam diferenças estatísticas.

Figura 5 - Condições experimentais para o ensaio da luciferase. A sequência controle contém dois sítios de ligação que são perfeitamente pareados pela sequência completa do miRNA. Nas células transfectadas com PsiCHECK2+3'UTR ou Sequência Controle, espera-se uma queda na atividade da luciferase Renilla na presença do miRNA mimético (modificado de Freitas et al. 2017).

3.2.11. Efeitos do tratamento com o hormônio juvenil em pupas

Para avaliar se os genes do relógio apresentam alguma relação com os títulos hormonais, optamos por testar quais seriam os efeitos do tratamento com o hormônio juvenil na expressão dos genes do relógio durante as fases de pupa de olho branco (PW). Essas fases do desenvolvimento foram selecionadas baseando-se na curva do hormônio juvenil proposta para *A. mellifera* durante o seu desenvolvimento (Rembold, 1983; Elekonich et al. 2003). A ideia foi manter altos níveis do hormônio circulante durante a fase de pupa de olho branco (Pw), evitando que estes níveis decaíssem, o que correria em condições naturais. Dessa forma, poderíamos verificar se a alteração nos títulos do hormônio juvenil circulantes afeta a expressão dos genes do relógio em abelhas, na fase de pupa.

Para realizar o experimento, inicialmente foi realizada uma postura controlada como descrito no item 3.2.3, onde o tempo de confinamento da rainha para ovoposição foi reduzido para 2 horas com a finalidade de diminuir a variação da idade entre as réplicas biológicas. No dia exato em que os indivíduos estavam no início da fase de pupa de olho branco (Pw), os favos contendo células fechadas foram retirados do apiário experimental e levados para o Laboratório para que as pupas fossem removidas e transferidas para placas de petri contendo papel de filtro úmido.

As aplicações foram realizadas utilizando o Hormônio Juvenil III (HJ III) (Sigma-Aldrich), pois esta é a forma encontrada em abelhas (Robinson et al. 1987). Inicialmente, a solução estoque foi preparada na concentração final de 10mg/mL diluída em acetona (PA, Merck). Desta solução, preparamos uma solução de trabalho na concentração final de 10µg/µL e 1µL desta foi aplicado topicamente diretamente sobre o tórax de pupas de olho branco. Ao todo, 50 pupas foram utilizadas nesse experimento, as quais foram divididas em dois grupos: tratadas e controle. O grupo controle recebeu 1µL de acetona pura. Foram coletadas 5 pupas de ambos os grupos nos tempos de 1 hora, 1h30 e 24 horas após o tratamento hormonal. Todo o processo foi conduzido dentro de uma capela com umidade relativa alta (umidificador de ar) e com solução de trabalho sendo mantida em gelo, uma vez que a acetona é extremamente volátil.

Os efeitos causados pelo tratamento do HJ III foram investigados em nível molecular, investigando-se a expressão dos genes do relógio no grupo tratado em relação ao grupo controle. Para isso, foi realizada a extração de RNA total dos indivíduos coletados e a síntese de cDNA, seguido de PCR em tempo real quantitativo seguindo a mesma metodologia descrita nos itens 3.2.5 e 3.2.6.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa seção, optamos por organizar os resultados em blocos, onde abordaremos inicialmente os resultados obtidos pelas análises *in silico* relacionados à caracterização dos genes do relógio. Em seguida, abordaremos os resultados encontrados a partir das análises ao longo do desenvolvimento embrionário, seguidos pela discussão. Do mesmo modo, apresentaremos os resultados obtidos durante o desenvolvimento imaturo (larvas e pupas) e adulto e a posterior discussão, respectivamente. Por fim, listaremos os resultados *in silico* encontrados para a predição dos RNAs reguladores (miRNAs), sua validação experimental, seguindo da discussão.

4.1. Reanotação, estrutura e conservação dos genes do relógio em *A. mellifera*

A partir da abordagem *in silico*, recuperamos as informações referentes aos oito genes do relógio em estudo: *period* (*per*), *cryptochrome-m* (*cry-m*), *clock* (*clk*), *cycle* (*cyc*), *timeout 2* (*tim2*), *par domain protein 1* (*pdp1*), *vri* (*vri*) e *clockwork orange* (*cwo*). A Tabela 5 apresenta as informações a respeito do nome do gene em *A. mellifera*, seu identificador no NCBI e seu (GB) no banco de dados de Hymenoptera (Beebase – Hymenoptera Genome Database), o tamanho do transcrito relativo a cada gene, as isoformas presentes no organismo em estudo, o cromossomo em que cada gene está localizado e o organismo que apresenta ortologia com os genes do relógio de *A. mellifera*. Os genes do relógio de *A. mellifera* estão localizados em diferentes cromossomos, com exceção dos genes *cyc* e *vri*, ambos localizados no cromossomo 11. Verificamos a ocorrência de isoformas para os genes *cry-m*, *cyc*, *tim2*, *vri*, *pdp1* e *cwo*. Contudo, as diferenças em nucleotídeos entre as isoformas são muito pequenas, o que dificulta o desenho de oligonucleotídeos específicos para cada uma. Entretanto, validar a expressão gênica de cada isoforma não foi foco deste trabalho. A Figura 6 ilustra a estrutura e organização gênica de cada gene do relógio, onde pode ser observado o número de éxons e íntrons, bem como o tamanho em pb da região codificadora.

Para avaliar a conservação dos genes do relógio de *A. mellifera*, realizamos alinhamentos pela ferramenta BLASTn e confirmamos a presença de órtologos em *D. melanogaster* para os genes *per*, *cyc*, *clk*, *pdp1*, *vri* e *cwo* e ortólogos em mamíferos para os genes *cry-m* e *tim2*.

Tabela 5 – Identificação dos genes do relógio de *A. mellifera* nas bases de dados NCBI e Beebase e resultado da busca por ortólogos em *D. melanogaster* e *M. musculus*.

Gene	ID(NCBI)	GB (beebase)	Região mRNA (pb)	Cromossomo	Ortologia	Nome em <i>D. melanogaster</i>	Nome em <i>M. musculus</i>
<i>period (per)</i>	NM_001011596.1	GB52077	4100	LG12	<i>D. melanogaster</i>	<i>per</i>	<i>per</i>
<i>cryptochrome (cry-m) - 1</i>	XM_006565949.1	GB51095	3676	LG10	<i>M. musculus</i>	<i>cry1</i> (parálogo)	<i>cry-m</i> ou <i>cry2</i>
<i>cryptochrome (cry-m) - 2</i>	XM_006565950.1	GB51095	3662	LG10	<i>M. musculus</i>		
<i>cryptochrome (cry-m) - 3</i>	XM_006565951.1	GB51095	3274	LG10	<i>M. musculus</i>		
<i>cryptochrome (cry-m) - 4</i>	XM_006565952.1	GB51095	3173	LG10	<i>M. musculus</i>		
<i>cycle (cyc) - 1</i>	XM_001121441.3	GB43953	3657	LG11	<i>D. melanogaster</i>	<i>cyc</i>	<i>BMAL1</i>
<i>cycle (cyc) - 2</i>	XM_006558024.1	GB43953	3695	LG11	<i>D. melanogaster</i>		
<i>clock (clk)</i>	XM_394233.5	GB48028	2837	LG1	<i>D. melanogaster</i>	<i>clk</i>	<i>clk</i>
<i>timeout 2 (tim2) -1</i>	XM_006565432.1	GB41002	4263	LG4	<i>M. musculus</i>	<i>tim</i> (parálogo)	<i>tim2</i>
<i>timeout 2 (tim2) -2</i>	XM_006565433.1	GB41002	4260	LG4	<i>M. musculus</i>		
<i>timeout 2 (tim2) -3</i>	XM_006565434.1	GB41002	3637	LG4	<i>M. musculus</i>		
<i>vrille (vri) -1</i>	XM_003250814.2	GB44976	6566	LG11	<i>D. melanogaster</i>	<i>vri</i>	<i>NFIL3</i>
<i>vrille (vri) -2</i>	XM_006566486.1	GB44976	6619	LG11	<i>D. melanogaster</i>		
<i>vrille (vri) -3</i>	XM_006566487	GB44976	5906	LG11	<i>D. melanogaster</i>		
<i>par domain protein 1 (pdp1) - 1</i>	XM_006560233.1	GB43643	3995	LG14	<i>D. melanogaster</i>	<i>pdp1</i>	<i>HLF</i>
<i>par domain protein 1 (pdp1) - 2</i>	XM_006560234.1	GB43643	3923	LG14	<i>D. melanogaster</i>		
<i>par domain protein 1 (pdp1) - 3</i>	XM_006560235.1	GB43643	4337	LG14	<i>D. melanogaster</i>		
<i>par domain protein 1 (pdp1) - 4</i>	XM_006560236.1	GB43643	4316	LG14	<i>D. melanogaster</i>		
<i>par domain protein 1 (pdp1) - 5</i>	XM_006560237.1	GB43643	4226	LG14	<i>D. melanogaster</i>		
<i>par domain protein 1 (pdp1) - 6</i>	XM_006560238.1	GB43643	4216	LG14	<i>D. melanogaster</i>		
<i>clockwork orange (cwo)- 1</i>	XM_016915518.1	GB52039	2971	LG12	<i>D.melanogaster</i>	<i>cwo</i>	<i>DEC1/DEC2</i>
<i>clockwork orange (cwo)- 2</i>	XM_006566849.2	GB52039	2697	LG12	<i>D.melanogaster</i>		
<i>clockwork orange (cwo)- 3</i>	XM_001121958.4	GB52039	3498	LG12	<i>D.melanogaster</i>		

Embora o funcionamento molecular atuante na manutenção dos ritmos circadianos seja um processo extremamente conservado, diferentes configurações dos genes do relógio apareceram durante o curso da evolução. Análises filogenéticas indicam que as linhagens basais de insetos apresentam ortólogos de *Drosophila* e mamíferos para os genes *cry* e *tim*. Essa observação sugere que no decorrer da evolução, o relógio circadiano de *Drosophila* divergiu de um inseto ancestral utilizando um grupo de genes do relógio ortólogos específicos, enquanto Hymenoptera e mamíferos convergiram e adotaram uma composição diferente de genes, onde ocorreram perdas de alguns genes e aparecimento de outros (Rubin et al., 2006).

Insetos, em geral, apresentam apenas uma cópia do gene *per*, enquanto mamíferos e peixes (*Danio rerio*) apresentam três cópias desse gene (*per1*, *per2* e *per3*). Provavelmente, no decorrer dos processos evolutivos, ocorreram duplicações gênicas que permitiram o aparecimento de cópias desse gene em outras espécies, as quais apareceram posteriormente aos insetos (Wager-Smith & Kay, 2000). Em relação ao *cry*, levamos em conta a presença de duas famílias para esse gene, *Drosophila-like cry1* e *Vertebrate-like cry2*, as quais são oriundas também de duplicações e perdas gênicas (Yuan et al. 2007). Análises filogenéticas e moleculares mais apuradas demonstraram que CRY1 apresenta função fotosensitiva, enquanto CRY2 perdeu essa função e atua formando um heterodímero com PER, para atuar como repressor transcricional de CLK/CYC no mecanismo molecular circadiano. Acredita-se que um ancestral da ordem dos Hymenoptera e Coleoptera foi responsável pela perda de *cry1*, e dessa forma o gene *cry2* foi mantido no decorrer da evolução (Sandrelli et al. 2008; Wang et al. 2013). Um estudo recente levantou a hipótese de que a perda do gene *cry1* em abelhas fez com que essas convergissem juntamente com mamíferos, os quais apresentam apenas a família *Vertebrate-like cry2*, o que sugere que o relógio molecular de abelhas funciona de forma similar ao de mamíferos (Rubin et al., 2006). Em abelhas, optamos por usar a nomenclatura *Cryptochrome mammalian-like (cry-m)* para referir a sua ortologia com mamíferos, como sugerido por Rubin et al. (2006). Um ponto a ser questionado é se o gene *cry-m* em abelhas realmente perdeu sua função fotorreceptora ou se é capaz de atuar tanto no mecanismo de repressão transcricional do relógio circadiano quanto na sensibilidade a estímulos luminosos.

Os produtos CLK e CYC (BMAL1 em mamíferos) são fatores transcricionais do tipo PAS-bHLH e atuam formando um heterodímero para ativar a transcrição de *per* e *tim* em *D. melanogaster*, e *per* e *cry-m* em abelhas e mamíferos (Rubin et al. 2006;

Sandrelli et al. 2008). Em *A. mellifera*, apesar de *cyc* apresentar relações filogenéticas mais próximas a outros insetos, sua proteína apresenta um tamanho maior que a de *D. melanogaster* e um tamanho comparável com a proteína BMAL1 de mamíferos. Além disso, a porção C-terminal de *AmCYC* é altamente conservada com a de mamíferos, a qual apresenta uma potente atividade transcricional in vivo (Takahata et al. 2000; Rubin et al. 2006). Dessa forma, essas duas observações apontam que *AmCYC* tem características estruturais similares a BMAL1 de mamíferos, apesar de estar filogeneticamente relacionada com *D. melanogaster* (Rubin et al., 2006). Já os domínios funcionais de VRI e PDP1 em *A. mellifera* são similares aos encontrados em *D. melanogaster* (Rubin et al. 2006), e provavelmente estes dois atuam de forma similar em um segundo *feedback* autoregulatorio, podendo regular de forma antagônica a expressão de *clk*.

Timeout 2 (tim2) e *timeless (tim)* são dois genes parálogos que estão presentes na maioria dos insetos, com a exceção dos Hymenoptera, os quais apresentam apenas o gene *tim2*. Acredita-se que o gene *tim* se originou a partir de uma duplicação gênica de *tim2* durante a explosão Cambriana (Myers et al. 1995; Benna et al. 2000; Rubin et al. 2006) e que estes dois genes apresentam um padrão evolutivo distinto, uma vez que *tim* e *tim2* tem funções diferentes. Enquanto *tim* atua como um gene do relógio canônico do mecanismo circadiano, *tim2* tem diversas funções como a manutenção da integridade dos cromossomos, regulação da replicação do DNA, desenvolvimento embrionário, ajuste do ciclo circadiano em resposta à estímulos luminosos e desenvolvimento embrionário (Gotter et al. 2000; Iwai et al. 2006; Benna et al. 2010). Acredita-se que no decorrer da evolução, os Hymenoptera convergiram juntamente com os mamíferos e perderam o parálogo *tim*, sendo que a proteína TIM2 provavelmente atua de forma semelhante em abelhas, formigas, vespas e mamíferos. Rubin *et al.* (2006) demonstraram que em *A. mellifera*, a proteína TIM2 não apresenta os domínios de TIM de *D. melanogaster* que são necessários para que ocorra a interação com a proteína PER, o que revela mais uma vez que a proteína TIM2 de abelhas não atua como TIM no mecanismo molecular circadiano.

Estudos indicam que o gene *clockwork orange (cwo)* participa também de forma essencial para modular os ritmos circadianos em *D. melanogaster*, sendo assim um novo componente molecular do mecanismo circadiano (Matsumoto et al. 2007; Lim et al. 2007; Kadener et al. 2007). Em mamíferos, os ortólogos correspondentes ao *cwo* de insetos são chamados de *DEC1* e *DEC2*, e estudos revelam que o gene *DEC2* atua na manutenção da

duração do sono (He et al. 2009). Aparentemente, esse gene codifica um fator transcricional que compete com o heterodímero CLK/CYC para se ligar às regiões *e-box* de vários genes. Ainda, este gene pode se autoregular negativamente formando o seu próprio *feedback* autoregulatório, onde a proteína CWO consegue regular negativamente a expressão de *cwo* (Matsumoto et al. 2007). Em Hymenoptera, o *cwo* foi caracterizado recentemente em *A. mellifera* e em *Solenopsis invicta*, no entanto, pouco se sabe a respeito do funcionamento desse gene nessa ordem de insetos (Ingram et al. 2012; Rodriguez-Zas et al. 2012). Análises envolvendo os domínios funcionais de CWO em *S. invicta*, apontaram que esta proteína apresenta domínios conservados com *D. melanogaster* e que estão ausentes em DEC1 e DEC2 de mamíferos, o que levanta a hipótese de que este gene apresenta um mecanismo autoregulatório conservado entre Hymenoptera e Diptera (Ingram et al. 2012). Em *D. melanogaster*, o gene *cwo* codifica uma proteína que se comporta como um repressor transcricional da atividade de CLK/CYC competindo com as regiões *e-box* do gene *period* e impedindo a ligação de CLK/CYC (Matsumoto et al., 2007).

As relações filogenéticas e moleculares que demonstram a proximidade do relógio circadiano de *A. mellifera* e outros Hymenoptera com o relógio de mamíferos, nos levam a questionar se a especialização em um grupo diferente de genes do relógio ao longo da evolução pode estar relacionada à complexidade comportamental e às características eusociais marcantes que estão presentes nessa ordem de insetos.

4.2. Perfil de expressão dos genes do relógio durante o desenvolvimento embrionário de *A. mellifera* obtido pela análise de bibliotecas de expressão

Inicialmente, realizamos uma busca por *reads* que mapeassem com as sequências dos genes do relógio *per*, *cry-m*, *cyc*, *clk*, *tim2*, *pdp*, *vri* e *cwo* nas bibliotecas de expressão de ovócitos maduros, embriões haploides (machos) e embriões diploides (fêmeos) obtidas por sequenciamento de última geração (RNAseq), com a finalidade de verificar se os genes do relógio estão expressos e/ou apresentam um perfil de expressão gênica diferencial no decorrer do desenvolvimento embrionário de *A. mellifera*. Verificamos que todos os oito genes do relógio são expressos tanto no ovócito maduro quanto no desenvolvimento embrionário de embriões haploides e diploides e que apresentam diferentes níveis transcricionais (Figuras 7 e 8). De forma interessante, observamos que

os perfis de expressão encontrados para cada gene do relógio ao longo do desenvolvimento diferem nitidamente quando comparamos embriões haploides com diploides. Apenas para os genes do relógio *tim2* e *cwo* foi observado um padrão de expressão gênica similar em ambos embriões fêmeos e machos em todos as fases do desenvolvimento analisadas.

Figura 7 - Heat map representativo ilustrando os perfis transcricionais dos genes do relógio *per*, *cry-m*, *cyc*, *clk*, *tim2*, *pdp1*, *vri* e *cwo* em ovócitos maduros e embriões diploides fêmeos em diferentes pontos do desenvolvimento embrionário de *A. mellifera*. EF: embrião fêmeo.

Figura 8 - Heat map representativo ilustrando os perfis transcricionais dos genes do relógio *per*, *cry-m*, *cyc*, *clk*, *tim2*, *pdp*, *vri* e *cwo* em ovócitos maduros e embriões haploides (machos) em diferentes pontos do desenvolvimento embrionário de *A. mellifera*. EM: embrião macho.

Os resultados das análises demonstraram a presença de transcritos de todos os genes do relógio em ovócitos maduros. Quanto às bibliotecas do desenvolvimento embrionário, verificamos que os genes *cyc*, *per*, *tim2*, *vri* e *cwo* estão expressos em pelo menos 2 pontos amostrados durante o período de clivagem (1, 2 e 6 horas) em embriões diploides. Em embriões haploides, todos os genes do relógio foram detectados nesse intervalo do desenvolvimento em pelo menos 1 ponto amostrado. Quando olhamos para o intervalo que corresponde a gastrulação (38 horas) em embriões diploides, detectamos a expressão de todos os genes do relógio, com destaque para elevados níveis transcricionais para os genes *per*, *cry-m*, *pdp1*, *vri*, *tim2* e *cwo*. Os genes *tim2* e *cwo* apresentam elevados níveis transcricionais em diversos pontos do desenvolvimento tanto de embriões haploides quanto diploides. O gene *cwo* se mantém com elevados níveis transcricionais por quase todo o desenvolvimento embrionário de embriões machos e fêmeos, com exceção do intervalo de 24 horas onde este é expresso em menor intensidade.

Além disso, pudemos verificar que os genes do relógio *pdp1* e *vri* apresentam um padrão de expressão similar entre os intervalos de 38h e 48h em embriões diploides, apresentando elevados níveis transcricionais nessas etapas do desenvolvimento.

Em abelhas, não está claramente definido o momento em ocorre a ativação da transcrição zigótica. Pires et al. (2016) demonstrou que transcritos zigóticos podem ser encontrados em embriões haploides e diploides no intervalo de 1 a 6h do desenvolvimento de *A. mellifera*. Dessa forma, quando detectamos a presença de transcritos dos genes do relógio no ovócito maduro e, também no intervalo de 1 a 6h do desenvolvimento, temos duas possibilidades. A primeira é que estes transcritos são herdados maternalmente, pois são encontrados em ovócitos maduros, e a segunda, é que estes podem representar uma atividade transcricional prematura do genoma zigótico. Entretanto, estas análises não permitem distinguir produtos maternos e zigóticos, nos intervalos de 1 a 6h. Em *Danio rerio*, estudos revelaram que os genes *per1*, *per2*, *cry1a*, *clk1* e *bmal1* (*cyc* em insetos) são expressos no início da embriogênese e que há a presença de transcritos do gene *per1* e *per2* antes mesmo da ativação da transcrição zigótica, o que sugere que estes genes possam atuar no processo de transição materno-zigótica (*MZT*), já que funcionam como fatores transcricionais que podem auxiliar na ativação do genoma do embrião (Tamai et al. 2004; Ziv & Gothilf, 2006; Dekens & Whitmore, 2008). O mesmo pode estar acontecendo com os genes do relógio que foram detectados no intervalo de 1 a 6 h do desenvolvimento embrionário em *A. mellifera*. Além disso, os mesmos trabalhos com *D. rerio* sugerem que os genes do relógio possam estar envolvidos na coordenação do ciclo celular durante a clivagem. Os autores sugerem que, ao longo de 24 horas, o intervalo de tempo em que ocorre cada divisão celular é bem definido e que o número de divisões celulares é sincronizado. É discutido também nesses trabalhos, que os genes do relógio aparentam ter um papel importante em proteger o DNA dos embriões contra danos frente a exposição à luz. Benna et al. (2010) sugerem que o gene *tim2* tem papel importante em garantir a estabilidade cromossômica, e como podemos ver, este gene está expresso em todo o desenvolvimento de embriões de *A. mellifera*.

Nossos dados apontam elevados níveis transcricionais para a maioria dos genes do relógio durante a gastrulação (representado pela biblioteca de 38 horas do desenvolvimento embrionário – a gastrulação compreende o intervalo de aproximadamente 32 a 40h), analisados em embriões diploides. Nesse momento, o sistema nervoso central está sendo formado e provavelmente o primeiro grupo de neurônios circadianos já pode aparecer e estar expressando os genes do relógio. Além

disso, podemos observar que *per* e *cry-m* apresentam maiores níveis transcricionais em 38 horas de desenvolvimento, o que indica que estes genes podem estar agindo em conjunto, como proposto molecularmente, para gerar ritmos circadianos no embrião. Os genes *clk* e *cyc* apresentam um padrão de expressão similar entre os períodos de 24 a 72h do desenvolvimento em embriões diplóides, o que aponta a provável atuação em conjunto de ambos para gerar os ritmos circadianos nos neurônios que estão sendo formados. O questionamento a respeito do momento do desenvolvimento em que se dá a ontogenia dos ritmos circadianos na maioria das espécies estudadas é uma questão que ainda não foi compreendida, e não se sabe se os ritmos já aparecem no início da embriogênese, durante ou após a eclosão (insetos) ou nascimento do indivíduo.

O gene *vri* é um fator transcricional do tipo bZIP, que além de participar da manutenção dos ritmos circadianos no sistema nervoso central de insetos, também é conhecido por regular positivamente a expressão do gene *decapentaplegic* (*dpp*) em embriões e garantir determinados fenótipos em adultos de *D. melanogaster* (George & Terracol, 1997). Em embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento, este gene age como um morfógeno que especifica o destino celular ao longo do eixo dorsoventral (Ferguson & Anderson, 1992b; Wharton et al. 1993). No desenvolvimento embrionário tardio, *dpp* coordena a separação dos ninhos de células precursoras do disco imaginal das células epidérmicas adjacentes, além de especificar o mesoderma dorsal e a diferenciação do endoderma (Cohen et al. 1993; Immergluck et al. 1990; Hursh et al. 1993). A partir dos nossos resultados, podemos observar que *vri* foi detectado tanto em embriões nos estágios iniciais do desenvolvimento quanto na embriogênese tardia apresentando elevados níveis transcricionais em 38 horas de desenvolvimento, o que nos leva a crer que este certamente atua regulando não só os níveis de *dpp* em diversos pontos da embriogênese, mas provavelmente outros grupos de genes que ainda não foram identificados experimentalmente.

O gene *pdp1* também é um fator transcricional do tipo bZIP e relatos apontam que este é expresso em diferentes pontos da embriogênese em moscas, nos quais sua expressão está relacionada com a diferenciação de diversos tipos celulares (Reddy et al. 2006). Um estudo demonstrou que *pdp1* é expresso no ectoderma, endoderma e mesoderma embrionário, túbulos de *Malpighi* e sistema nervoso central, além de ser um potencial regulador da diferenciação das células musculares em *D. melanogaster* (Lin et al. 1997). Acredita-se que este gene é um potencial regulador do gene *Tropomiosin I*, o qual tem um papel importante na miogênese em estágios mais avançados da

embriogênese (Lin et al. 1997). Desse modo, acreditamos que em embriões de *A. mellifera*, o gene *pdp1* também pode apresentar um papel crucial para o desenvolvimento dos músculos, bem como na regulação de outros eventos que devem ser investigados futuramente, já que este gene apresenta um perfil de expressão dinâmico ao longo do desenvolvimento embrionário de *A. mellifera*. Por fim, verificamos que o gene *cwo* é intensamente expresso durante a embriogênese em *A. mellifera*, o que nos abre a oportunidade de investigar futuramente o seu papel nesta fase do desenvolvimento, já que existem poucos relatos sobre a função deste gene na literatura.

4.3. Validação da expressão dos genes do relógio em embriões diploides de *A. mellifera* por qPCR

Para validar os resultados de expressão dos genes do relógio obtidos pela análise das bibliotecas de expressão construídas a partir do sequenciamento de última geração (RNAseq), utilizamos a técnica de PCR em tempo real quantitativo (qPCR), a qual nos permitiu observar que os genes do relógio estão de fato expressos ao longo do desenvolvimento embrionário de *A. mellifera* e apresentam diferentes perfis de expressão (Figura 9), assim como observado nos resultados de RNAseq. Nesse caso, validamos a expressão dos genes do relógio, com exceção do gene *cwo*, nos tempos de desenvolvimento de 6h, 24h, 38h, 48h e 72h em embriões diploides (fêmeas).

Os resultados das análises por qPCR confirmaram o perfil de expressão diferencial observado nas análises das bibliotecas ao longo do desenvolvimento embrionário para todos os genes do relógio analisados. Perfis semelhantes foram encontrados para os genes *per*, *cyc* e *tim2*, que apresentam altos níveis transcricionais em 6 horas de desenvolvimento embrionário, seguido pelo decaimento de seus transcritos no decorrer de 24, 38 e 48 horas e um leve aumento em 72 horas. Para o gene *clk*, com exceção de 6 horas de desenvolvimento em embriões diploides, observamos tanto níveis transcricionais quanto um perfil muito similar ao de *cyc*, como vimos também nas bibliotecas de expressão, o que mostra mais uma vez que estes podem estar atuando em conjunto como já foi comentado. Elevados níveis transcricionais foram detectados para o gene *cry-m*, principalmente em 24 e 38 horas de desenvolvimento, de forma similar ao padrão de expressão observado nas bibliotecas de expressão. Já para *pdp1* e *vri*, verificamos um padrão de expressão gênica similar, com picos de expressão em 38 h de desenvolvimento.

Esses altos níveis transcricionais nesse intervalo do desenvolvimento também foram observados nas bibliotecas de expressão de diploides.

Figura 9 - Perfil de expressão dos genes do relógio *per*, *cry-m*, *cyc*, *clk*, *tim2*, *vri* e *pdp1* ao longo do desenvolvimento embrionário de fêmeas de *A. mellifera* obtido através de qPCR. Os níveis de expressão foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e normalizados em relação aos níveis do gene endógeno *rpl32*. O eixo x corresponde às diferentes fases do desenvolvimento embrionário analisadas.

Diante dos resultados obtidos por qPCR e RNAseq, demonstramos pela primeira vez que os genes do relógio são de fato expressos no desenvolvimento embrionário de *A. mellifera* e apresentam perfis de expressão diferenciais. O desenvolvimento embrionário de abelhas compreende 72 horas e não podemos inferir ainda se os genes do relógio apresentam uma expressão cíclica ao longo de toda esta fase do desenvolvimento e se essa característica se inicia nos estágios mais prematuros (1 a 6 h, por exemplo) ou após a formação do sistema nervoso central (~38 horas). Entretanto, alguns trabalhos têm discutido a possibilidade de os genes do relógio atuarem em outras funções não circadianas em embriões, como já discutimos anteriormente para os genes *tim2*, *vri* e *pdp1*. É provável que os genes do relógio apresentem uma função importante em regular diversos processos da embriogênese, como sincronia das divisões mitóticas durante a clivagem e a perda da mesma no final desta mesma fase. A expressão diferencial destes genes nesta fase do desenvolvimento sugere que possam assumir outros papéis ao longo da embriogênese.

4.4. Análise comparativa da expressão dos genes do relógio no desenvolvimento embrionário de *A. mellifera* e *D. melanogaster*

Uma vez que nossos resultados revelaram que os genes do relógio são expressos ao longo do desenvolvimento embrionário de *A. mellifera*, decidimos então verificar se existem dados na literatura que apontem como esses genes se comportam no desenvolvimento embrionário de *D. melanogaster*, o qual é um dos modelos em que buscamos referências para nossos estudos. A proposta foi realizar uma comparação da expressão dos genes do relógio ao longo da embriogênese dos dois organismos. Apesar do enorme número de trabalhos envolvendo o ciclo circadiano em *D. melanogaster*, há uma escassez de dados que relatem como os genes do relógio se comportam ao longo de seu desenvolvimento embrionário. A partir de dados obtidos por hibridação *in situ* dos genes do relógio em *D. melanogaster*, disponíveis no banco de dados Fly-FISH (http://fly-fish.ccbr.utoronto.ca/cgi-bin/benb/gene_search.pl) juntamente com outros dados da literatura, e os dados de expressão obtidos por RNAseq para *A. mellifera*, elaboramos uma figura comparativa da embriogênese de *A. mellifera* e *D. melanogaster*, na qual estão representados os pontos onde a expressão dos genes do relógio foi detectada para as moscas da fruta e onde estes apresentam elevados níveis transcricionais em abelhas (Figura 10).

A embriogênese é um período de intensas modificações morfológicas e fisiológicas que ocorrem em um espaço-tempo finamente regulado, o que garante a precisão na formação de todas as estruturas que irão compor o corpo larval e posteriormente o adulto. Desse modo, a expressão dos genes do relógio, principalmente após a formação do sistema nervoso central, sugere que o embrião possa gerar ritmos circadianos que provavelmente auxiliam na coordenação dos eventos finais da embriogênese, como a formação do corpo larval, ritmo de eclosão da larva e mudas embrionárias. Quando comparamos a expressão dos genes do relógio na embriogênese de *A. mellifera* com os dados de hibridação *in situ* em *D. melanogaster* (Figura 10), verificamos que todos os genes do relógio, com exceção de *cyc*, *clk* e *cwo* (dados não disponíveis no Fly-FISH), são expressos durante toda a embriogênese de ambos os insetos. James *et al.* (1986), demonstrou pela primeira vez a expressão do gene *per* em embriões de *D. melanogaster* através de análises por *Northern blot* e hibridação *in situ*, onde foi detectada a expressão de *per* entre 6 e 24 horas de desenvolvimento, correspondendo aos estágios de banda germinativa, formação do corpo larval e eclosão da larva.

Recentemente, resultados de hibridação *in situ* mostraram os genes *per* e *clk* em um grupo de neurônios dorsais e laterais em embriões de *D. melanogaster* nos estágios 16 e 17 da embriogênese, os quais correspondem à formação do corpo larval (Houl et al., 2008). Já Ruiz et al. (2010), demonstrou que os genes *per* e *tim* estão expressos no cordão nervoso ventral de embriões de *D. melanogaster* e que esses são expressos entre os estágios 12 e 16, equivalentes ao final da banda germinativa e formação do corpo larval, respectivamente. A descrição da expressão de *pdp1* entre os estágios 10 e 15 de *D. melanogaster* através de hibridação *in situ* (Reddy et al., 2000) indica expressão no estágio de banda germinativa e formação do corpo larval. O gene *vri* apresenta uma expressão constante entre os estágios embrionários 2 a 12, que correspondem aos estágios de clivagem, blastoderma e banda germinativa, e posteriormente, elevados níveis nos estágios 13 e 14, referentes ao final da banda germinativa e formação do corpo larval de moscas (George & Terracol 1997). Ainda, os dados disponíveis no banco de dados Fly-FISH demonstram a detecção de transcritos tanto maternos ou zigóticos dos genes do relógio *per*, *tim* e *vri* nas primeiras horas do desenvolvimento embrionário. Essa observação vai de encontro com o observado em nossas bibliotecas de expressão, onde há a presença de transcritos desses genes nas primeiras horas do desenvolvimento, onde podemos encontrar transcritos maternos e zigóticos, embora não é possível distingui-los olhando somente dados de expressão. Nossos resultados, em conjunto com os dados disponíveis para *D. melanogaster*, revelam que os genes do relógio são expressos bem antes da formação do sistema nervoso central em ambos os insetos e devem atuar em diversos processos que acontecem no início da embriogênese, como o controle do ciclo celular e diferenciação de células para originar os diferentes tecidos embrionários em um espaço-tempo bem definido.

Figura 10 - Expressão dos genes do relógio *per*, *cry-m*, *clk*, *cyc*, *tim2*, *pdp*, *vri* e *cwo* em diferentes fases da embriogênese de *A. mellifera* e *D. melanogaster*. Em *A. mellifera*, estão representados os pontos onde foram detectados elevados níveis transcricionais dos genes do relógio, obtidos por RNAseq. As informações sobre os genes do relógio em *D. melanogaster* foram obtidos a partir de hibridação in situ em embriões de disponíveis em (<http://fly-fish.ccbr.utoronto.ca/>) e na literatura. Para os genes *cyc* e *cwo* de *D. melanogaster* não há dados disponíveis no Fly-FISH ou na literatura (Figura adaptada de Flavia C. P. Freitas).

4.5. Expressão dos genes do relógio durante o desenvolvimento larval e pupal de *A. mellifera*

Nessa etapa, realizamos a caracterização da expressão dos transcritos dos genes do relógio durante o desenvolvimento imaturo de abelhas, durante as fases do desenvolvimento larval, metamorfose e desenvolvimento pupal. Os perfis de expressão gênica obtidos refletem os transcritos presentes no corpo inteiro de larvas e pupas, englobando desse modo tanto o sistema nervoso central, onde se encontra o relógio circadiano central, bem como os tecidos periféricos. Demonstramos aqui pela primeira vez a expressão dos genes do relógio durante todo o desenvolvimento imaturo em um inseto. Primeiramente, apresentamos os resultados obtidos para os perfis de expressão dos genes do relógio e, em seguida, discutimos a relação destes com o desenvolvimento imaturo e os títulos hormonais.

Ao analisarmos os perfis de expressão dos genes *per* e *cry-m*, verificamos que estes são expressos de maneira diferencial ao longo do desenvolvimento larval e pupal de operárias de *A. mellifera* (Figura 11.A). Os dois genes apresentam perfis transcricionais similares nos estágios larvais L2 e L3, seguido de um pico de expressão de *per* em L4 e de *cry-m* L5F (Figura 11.B). Nas diferentes fases de L5, os níveis de *per* decaem e logo em seguida, em PP, ocorre outro pico de expressão para este gene, que decai horas depois, em PW. Nos estágios pupais seguintes (Pp, Pb e Pbm), os níveis transcricionais de *period* se elevam no decorrer do desenvolvimento, atingindo elevados níveis em Pbm. Já o gene do relógio *cry-m*, apresenta queda em seus níveis transcricionais após a fase de L5F, os quais se elevam gradativamente nos estágios de pupa (Pw, Pp e Pb) e atingem um pico de expressão elevado em Pb. Na fase de Pbm, os níveis de *cry-m* decaem, de forma antagônica com o que acontece com *per*.

Figura 11 - Perfil de expressão de *per* e *cry-m* durante o desenvolvimento larval (L2, L3, L4, L5F, L5S e PP) e pupal (Pw, Pp, Pb e Pbm) em operárias de *A. mellifera* obtido por qPCR. Os níveis de expressão foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e normalizados em relação aos níveis do gene endógeno *rpl32*. A) Todos os estágios analisados durante o desenvolvimento larval e pupal; B) Perfil de expressão gênica ampliado nos estágios larvais e durante a muda metamórfica. Colchetes em vermelho indicam o momento da muda metamórfica (PP até PW). O eixo X corresponde às fases do desenvolvimento analisadas.

Durante o desenvolvimento larval, verificamos elevados níveis transcricionais de *cyc* nos estágios de L5F e L5S (Figura 12.B), enquanto o gene *clk* apresentou níveis transcricionais mais basais ao longo dos estágios iniciais do desenvolvimento imaturo. Posteriormente, *clk* apresentou um aumento gradual em sua expressão, atingindo níveis mais elevados em Pw, juntamente com os níveis de *cyc*. No decorrer do desenvolvimento pupal, *clk* é altamente expresso em Pp e Pb e seus níveis decaem em Pbm. *Cyc* acompanha os elevados níveis transcricionais de *clk* em Pb e tem um decaimento similar em seus níveis de expressão em Pbm (Figura 12.A).

Figura 12 - Perfil de expressão de *cyc* e *clk* durante o desenvolvimento larval (L2, L3, L4, L5F, L5S e PP) e pupal (Pw, Pp, Pb e Pbm) em operárias de *A. mellifera* obtido por qPCR. Os níveis de expressão foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e normalizados em relação aos níveis do gene endógeno *rpl32*. A) Todos os estágios analisados durante o desenvolvimento larval e pupal; B) Perfil de expressão gênica ampliado nos estágios larvais e durante a muda metamórfica. Colchetes em vermelho indicam o momento da muda metamórfica (PP até PW). O eixo X corresponde às fases do desenvolvimento analisadas.

Os genes do relógio *pdp1* e *vri* apresentaram expressão diferencial ao longo do desenvolvimento larval e pupal de *A. mellifera* e de forma antagônica em vários dos estágios analisados (Figura 13). Enquanto os níveis transcricionais de *pdp1* são maiores em relação a *vri* durante os estágios de L2 a L5F, esse perfil se inverte de L5S a Pp. Em seguida os níveis de *pdp1* apresentam um pico de expressão em Pb de forma oposta aos níveis de *vri*, os quais decaem nesse estágio. Analisando o gene *pdp1* individualmente, observamos elevados níveis transcricionais desse gene no início do desenvolvimento larval (L2). Estes níveis decaem e retornam com um pico de expressão em L5F (Figura 13.B). Posteriormente ao evento metamórfico, níveis elevados para *pdp1* são observados na fase pupal Pb (Figura 13.A). Já o gene *vri* é pouco expresso durante as fases iniciais do desenvolvimento larval, apresentando um pico de expressão em L5S (Figura 13.B). Níveis mais baixos, porém elevados ainda são encontrados nas fases pupais de Pw e Pp (Figura 13.A).

Figura 13 - Perfil de expressão de *vri* e *pdp1* durante o desenvolvimento larval (L2, L3, L4, L5F, L5S e PP) e pupal (Pw, Pp, Pb e Pbm) em operárias de *A. mellifera* obtido por qPCR. Os níveis de expressão foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e normalizados em relação aos níveis do gene endógeno *rpl32*. A) Todos os estágios analisados durante o desenvolvimento larval e pupal; B) Perfil de expressão gênica ampliado nos estágios larvais e durante a muda metamórfica. Colchetes em vermelho indicam o momento da muda metamórfica (PP até PW). O eixo X corresponde as fases do desenvolvimento analisadas.

De forma interessante, o gene *tim2* apresentou elevados níveis transcricionais no início do desenvolvimento larval (L2), os quais decaem sequencialmente até L5F e, posteriormente, sofrem um aumento em seus níveis até culminar com um pico de expressão em Pb (Figura 14) e posterior queda em Pbm.

Figura 14 – Perfil de expressão de *tim2* durante o desenvolvimento larval (L2, L3, L4, L5F, L5S e PP) e pupal (Pw, Pp, Pb e Pbm) em operárias de *A. mellifera* obtido por qPCR. Os níveis de expressão foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e normalizados em relação aos níveis do gene endógeno *rpl32*. O eixo X corresponde as fases do desenvolvimento analisadas.

A validação do perfil transcricional do gene *cwo* ao longo dos estágios imaturos (larvas e pupas) de *A. mellifera* nos revelou dois momentos em que esse gene apresenta elevados níveis em sua expressão: um durante o desenvolvimento larval e outro no fim da fase pupal (Figura 15). No desenvolvimento larval, podemos observar que este gene apresenta elevados níveis transcricionais em L5F, culminando com um pico de expressão em L5S. Esse perfil de expressão ocorre de forma similar ao que foi visto para o gene *cyc*. No desenvolvimento pupal, esse gene acompanha o padrão de expressão encontrado para todos os outros genes do relógio, com exceção de *vri*, onde há um pico de expressão em Pb.

Figura 15 – Perfil de expressão de *cwo* durante o desenvolvimento larval (L2, L3, L4, L5F, L5S e PP) e pupal (Pw, Pp, Pb e Pbm) em operárias de *A. mellifera* obtido por qPCR. Os níveis de expressão foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e normalizados em relação aos níveis do gene endógeno *rpl32*. O eixo X corresponde as fases do desenvolvimento analisadas.

4.6. Relação dos perfis de expressão dos genes do relógio, desenvolvimento imaturo e títulos hormonais

A partir dos perfis de expressão encontrados para os genes do relógio ao longo do desenvolvimento imaturo (larvas e pupas) de operárias de *A. mellifera*, podemos inferir que estes devem atuar em diferentes momentos do desenvolvimento regulando a manutenção dos ritmos circadianos, caso estes ocorram de forma periódica durante 24 horas nessas fases do desenvolvimento, e/ou em outras funções atreladas a mecanismos fisiológicos que ocorrem em um espaço-tempo bem determinado tanto nas fases larvais como durante a metamorfose e as fases de pupa. Como comentamos na parte introdutória, o sistema endócrino exerce papel fundamental em traduzir e enviar informações a todos os tecidos para que diversas atividades fisiológicas e comportamentais ocorram no momento ideal. Esse papel é muito bem evidenciado no desenvolvimento imaturo, onde dois hormônios principais coordenam diversos processos desde a fase larval até a fase final de pupa. Os títulos dos ecdisteróides (20E) geralmente indicam que a muda deve ocorrer para que a larva mude para a próxima fase do desenvolvimento ou inicie o processo de metamorfose. Já no desenvolvimento pupal, os títulos de 20E sugerem a ocorrência de uma muda-imaginal, a última muda que ocorre durante o desenvolvimento imaturo. Já o Hormônio Juvenil (HJ) tem um papel fundamental no desenvolvimento larval, onde seus altos níveis atuam impedindo que a larva entre no processo de metamorfose até o momento em que esta tenha atingido o tamanho e peso adequados e completado todas as mudas necessárias (Figura 16). Este também apresenta níveis elevados durante a muda metamórfica, o que pode sugerir um papel em coordenar processos iniciais da metamorfose.

Figura 16 - Desenvolvimento pós-embriônico de abelhas *A. mellifera*. O esquema ilustra a ocorrência de quatro mudas larvais (L1-L2, L2-L3, L3-L4, L4-L5F) e uma muda metamórfica (PP-Pw), moduladas pelo balanço entre ecdisteroides (20E) e hormônio juvenil (HJ). A amplitude dos picos hormonais não está em escala, ou seja, não correspondem necessariamente aos seus títulos *in vivo*. As linhas tracejadas para o 20E correspondem às fases do desenvolvimento onde os títulos desse hormônio ainda não foram dosados, nos baseamos nos dados disponíveis para outros insetos para supor que o mesmo ocorre em abelhas. L2 a L5 correspondem aos cinco estágios larvais; L5F – larva de 5º estágio em fase de alimentação; L5S – larva de 5º estágio em fase de tecelagem de casulo; PP – pré-pupa; Pw – pupa de olho branco.

Tomando as fases iniciais do desenvolvimento larval, observamos que a expressão elevada de *tim2*, *pdp1* e *cyc* em L2 e seu decaimento de forma gradual nas próximas fases (L3 e L4) é similar aos títulos circulantes encontrados para o HJ em operárias de *A. mellifera* (Rembold, 1987; Rembold et al. 1992; Elekonich et al. 2003), o que pode indicar a existência de alguma relação entre esses genes na modulação ou em resposta a esse hormônio para atuarem em processos iniciais do desenvolvimento larval. No decorrer do desenvolvimento larval, o ciclo mitótico é modificado, a replicação do DNA ocorre e as células não se dividem. Dessa forma, *tim2* pode estar envolvido na regulação desses eventos nas fases iniciais do desenvolvimento larval, principalmente no que diz respeito à manutenção cromossômica, uma vez que o ciclo mitótico é alterado. Ainda, o gene *pdp1* apresenta papel importante em regular o crescimento da larva, os processos mitóticos e a endoreplicação em *D. melanogaster* (Reddy et al. 2000), o que culmina com a ideia de que este gene também pode estar envolvido nesses processos que ocorrem no início do desenvolvimento imaturo de abelhas.

Os elevados níveis de *per* em L4 e *cry-m* em L5F podem estar relacionados com os altos títulos de ecdisteróides que supostamente ocorrem em L4, o qual definiria a última muda larval que acontece entre os estágios L4-L5F. Outro pico na expressão de

per ocorre em PP (pré-pupa), coincidindo com os títulos de ecdisteróides que definem a muda-metamórfica (Rachinsky et al. 1990) (Figura 14.B). Desse modo, existe a possibilidade que estes dois genes estejam atuando em momentos importantes tanto no desenvolvimento larval, no processo da metamorfose e ainda podem estar envolvidos na manutenção dos ritmos circadianos em pupas, uma vez que estes apresentam uma expressão similar entre as fases de Pw a Pb. Já os elevados níveis transcricionais de *cyc* e *cwo* em L5F e L5F podem representar funções importantes que antecedem os eventos da metamorfose e também ter algum papel importante na fase de alimentação da larva, onde esta pode apresentar um ritmo na ingestão do alimento. Do mesmo modo, o aumento sequencial dos níveis transcricionais de *clk* a partir da fase L5F pode estar associado com os eventos que desencadeiam a metamorfose e aqueles que ocorrem durante este processo. Além disso, a expressão deste gene acompanha o aumento dos títulos de ecdisteróides que ocorre da fase L5F até um pico em PP em *A. mellifera* (Rachinsky et al. 1990), e nos questionamos se há uma relação deste gene em modular ou responder aos títulos de 20E.

O gene *vri* é um gene que é positivamente regulado pelo hormônio 20E, respondendo à sinalização por ecdisona, e sendo ativado pelo heterodímero formado por EcR/USP em neurônios circadianos em *D. melanogaster* (Itoh et al., 2011; Uryu et al., 2015). Seus transcritos já foram detectados no intestino, cérebro e discos imaginais em mosca-das-frutas. Além disso, este gene atua como um *enhancer* do gene *dpp* (*decapentaplegic*), o qual é um morfógeno e tem a função de induzir a proliferação e crescimento celular nos discos imaginais durante os estágios larvais das moscas-das-frutas (George & Terracol, 1997). No entanto, a superexpressão de *vri* é antiproliferativa, induz a apoptose e reduz a atividade de endoreplicação nos discos imaginais larvais e em embriões de *D. melanogaster*, além de reduzir o tamanho das glândulas salivares (Szuplewski et al., 2003). Dessa forma, olhando para nossos resultados, podemos verificar que os elevados níveis transcricionais de *vri* em L5S, estágio que precede o evento metamórfico, pode indicar uma função importante em regular os processos apoptóticos e endoreplicativos que irão ocorrer durante a metamorfose. Já o gene *Pdp1* é um fator transcricional que também está envolvido com o crescimento celular e apresenta elevados níveis de expressão no tecido muscular, corpo gorduroso, epiderme e intestino de embriões em desenvolvimento de *D. melanogaster* (Reddy et al. 2000). Além disso, esse gene é sensível às condições nutritivas e sua expressão é afetada de forma negativa quando há privação de nutrientes (Reddy et al. 2006). Seus níveis transcricionais mais elevados em L5F podem estar associados ao status nutritivo da abelha, onde a larva está

em intensa atividade de alimentação e apresenta um grande crescimento corporal. Neste caso em particular, a análise da expressão destes genes durante o desenvolvimento diferencial de rainhas e operárias poderá acrescentar dados importantes sobre esta questão.

Tomando nossos resultados em conjunto, podemos inferir que os genes do relógio apresentam um papel importante em modular várias etapas do desenvolvimento pós-embrionário de *A. mellifera*. A expressão desses genes durante o desenvolvimento larval, sugerem que estes podem tanto atuar gerando ritmos circadianos para controlar os tempos das mudas larvais e os ritmos alimentares, bem como realizarem outras funções não-circadianas, como o controle do crescimento larval, dos processos mitóticos e endoreplicativos e apoptose, dentre outros. Ainda, há a possibilidade desses genes estarem modulando ou serem regulados pelos títulos hormonais tanto do hormônio juvenil quanto dos ecdisteróides, uma vez que alguns picos de expressão culminam com os picos descritos para estes hormônios. Isso pode reforçar a ideia de que o ciclo circadiano interage com o sistema endócrino para regular o *timing* do desenvolvimento em insetos. De forma interessante, todos os genes do relógio, com exceção de *vri* apresentaram um pico em seus níveis transcricionais no estágio pupal Pb. Provavelmente, os genes do relógio devem apresentar uma função importante em coordenar os eventos finais que farão com que o corpo da abelha adulta seja totalmente formado. Além disso, nos estágios finais do desenvolvimento pupal, os genes do relógio podem estar envolvidos nos processos de pigmentação do corpo nos tecidos periféricos, bem como atuando na coordenação do ritmo de deposição da cutícula.

4.7. Efeito do tratamento com hormônio juvenil III na expressão dos genes do relógio em pupas de olho branco de *A. mellifera*

Na literatura, não existem trabalhos que descrevem uma possível relação do HJ com a modulação dos genes do relógio, pelo menos quando se diz respeito às fases larvais e de pupa. Considerando que este hormônio aparenta ter papéis importantes durante todas essas fases do desenvolvimento, optamos por investigar se este é capaz de alterar a expressão dos genes do relógio em pupas de abelhas operárias de *A. mellifera*. A escolha da fase de pupa de olho branco se deve ao fato de que nesse momento, os níveis de HJ estão em queda e se mantêm em níveis muito basais até o final do desenvolvimento da pupa (Figura 16). A ideia foi manter os níveis de HJ elevados na fase de pupa de olho branco e verificar se este hormônio ocasionaria algum efeito na expressão dos genes do

relógio, gerando uma resposta rápida (em 1 ou 1:30h) ou a longo prazo (24h) após o tratamento. Vale lembrar que as pupas de olho branco foram criteriosamente tratadas bem no início da sua fase de desenvolvimento, considerando que na fase anterior de pré-pupa (PP) os títulos de HJ se apresentavam elevados (Figura 16). Dessa forma mantivemos os altos níveis de HJ que, teoricamente, deveriam cair em PW. Outro ponto interessante é que esse tratamento é feito de forma tópica, o que diminui a mortalidade dos indivíduos tratados e permite o tratamento na ausência de luz. Utilizamos o gene *Kruppel homolog 1 (kr-h1)* como um controle para demonstrar que o tratamento com o HJIII é efetivo, uma vez que este gene responde muito bem aos altos níveis desse hormônio, sendo ativado após 1, 1:30 e 24 h do tratamento (Figura 17).

Quando verificamos os efeitos do tratamento com HJIII sobre os níveis transcricionais do gene *per*, observamos que este gene respondeu rapidamente, 1h após o tratamento os seus níveis decaíram em relação ao controle (Figura 17). Entretanto, em 1:30h não foram detectadas diferenças na expressão de *per* entre indivíduos controle e tratados, e em 24h verificamos que a expressão do gene volta a cair. Já o gene *cry-m*, apresentou resposta ao HJIII apenas em 1:30h após o tratamento nas pupas de olho branco, apresentando níveis mais elevados em relação ao controle (Figura 17).

Figura 17 – Efeitos do tratamento com hormônio juvenil III (HJIII) na expressão dos genes do relógio *kr-h1*, *per* e *cry-m* em pupas de olho branco de *Apis mellifera*. Os níveis de expressão foram obtidos por qPCR, calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e normalizados em relação aos níveis do gene endógeno *rpl32*. O gene *kr-h1* foi utilizado como controle para confirmar que o tratamento com HJIII é eficiente, uma vez que esse gene responde a este hormônio e forma positiva. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste t não pareado com $p < 0.05$. * diferença estatística em relação ao controle.

Os genes *clk* e *cyc* responderam ao hormônio 1:30h após o tratamento, apresentando maiores níveis transcricionais em pupas de olho branco tratadas em relação aos indivíduos controles, sendo que o gene *cyc* manteve essa resposta até 24h após o tratamento (Figura 18). Já o gene *tim2*, não apresentou diferenças entre os indivíduos tratados e controle durante todos os pontos coletados após o tratamento com HJIII (Figura 18). Assim, podemos concluir que os genes do relógio respondem de maneira diferente aos títulos hormonais, bem como apresentam diferenças na capacidade de recuperação dos níveis normais de expressão.

Figura 18 – Efeitos do tratamento com hormônio juvenil III (HJIII) na expressão dos genes do relógio *clk*, *cyc* e *tim2* em pupas de olho branco de *Apis mellifera*. Os níveis de expressão foram obtidos por qPCR, calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e normalizados em relação aos níveis do gene endógeno *rpl32*. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste t não pareado com $p < 0.05$.

O gene do relógio *pdpl* respondeu ao tratamento com HJIII apenas após 24h de tratamento das pupas de olho branco, aumentando sua expressão (Figura 19). Já o gene *vri*, respondeu de forma rápida ao tratamento hormonal, onde verificamos que este exibiu baixos níveis transcricionais em relação ao controle 1h após a aplicação do HJIII (Figura 19). Nos pontos referentes a 1:30h e 24h, os níveis de *vri* não demonstraram diferenças significativas entre os indivíduos controles e tratados. Por fim, o gene *cwo* não se apresentou responsivo ao tratamento com HJIII em todos os momentos analisados (Figura 19). Entretanto, observamos uma grande variação nos indivíduos testados para este gene principalmente em 1 e 1:30h. Este fato talvez possa ser corrigido com o aumento do número amostral.

Figura 19 – Efeitos do tratamento com hormônio juvenil III (HJIII) na expressão dos genes do relógio *pdp1*, *vri* e *cwo* em pupas de olho branco de *Apis mellifera*. Os níveis de expressão foram obtidos por qPCR, calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e normalizados em relação aos níveis do gene endógeno *rpl32*. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste t não pareado com $p < 0.05$.

Nossos resultados, em conjunto, revelaram que seis dos oito genes do relógio analisados tiveram seus níveis transcricionais alterados frente ao tratamento com o HJIII, pelo menos em algum dos pontos analisados após a aplicação do hormônio. Os genes *per*, *cry-m*, *clk*, *cyc* e *vri* responderam de forma rápida ao tratamento (1 ou 1:30h), enquanto o gene *pdp1* respondeu apenas após 24h de tratamento. Ambos *per* e *cyc* responderam também em 24 horas após o tratamento. Um estudo com o Hemiptera *Riptortus pedestris* relatou que o *knockdown* de *per* induz a secreção do HJ em fêmeas adultas, ou seja, baixos níveis transcricionais desse gene estariam associados com elevados níveis de HJ (Ikeno et al. 2010). Olhando para os nossos resultados, possivelmente a queda nos níveis de *per* em pupas tratadas com HJIII pode então confirmar a ideia de que este gene é modulado de forma negativa pelo hormônio juvenil.

Em *A. mellifera*, os efeitos do tratamento com o HJ na expressão de algum gene do relógio somente foram testados em operárias adultas. Nessas, foi verificado que os

níveis médios de *per* não foram alterados em abelhas nutrizas ou forrageiras, comparado aos controles (Bloch et al. 2007). No entanto, os autores discutem que não verificaram diferenças nos níveis de *per* entre os controles de operárias nutrizas e forrageiras, que foram tratados com acetona. Teoricamente, abelhas nutrizas deveriam ter menores níveis transcricionais de *per* em relação às forrageiras, e como isso não aconteceu entre os controles, os autores sugerem que a acetona poderia ter alterado (*upregulated*) os níveis de *per* entre os diferentes indivíduos testados. Se observamos a escala nos níveis de expressão desse gene entre os controles tratados com acetona, podemos ver que há a possibilidade desse gene não ter respondido nos indivíduos tratados com HJIII, o que ocorreu com os indivíduos controle, tratados com acetona. A acetona é utilizada como diluente do HJIII, e já foi testada em nosso laboratório como a melhor opção para diluir este hormônio e servir como controle nos experimentos. O que sabemos é que na literatura, quantidades excessivas no consumo de etanol podem alterar a expressão dos genes do relógio em mamíferos, em especial o gene *per* (Chen et al. 2004). Em *D. melanogaster*, larvas tratadas com etanol apresentaram alterações nos ritmos circadianos e na expressão de *per* (Ahmad et al. 2013). Como a acetona também é um orgânico oxigenado como o álcool e é formada pela desidrogenação e peroxidação do álcool isopropanol, nos questionamos se esta também poderia exercer algum efeito na expressão de *per* de forma similar ao que ocorre pelo etanol ou se nossos dados refletem de forma real o efeito do HJIII na expressão de *per*. Para resolver este problema, utilizamos como outro controle as réplicas biológicas que foram analisadas durante o desenvolvimento normal de pupas de olho branco (seção 4.5), no intuito de comparar com o controle utilizado no tratamento e verificar se os efeitos observados foram devidos à acetona ou ao HJ. Desse modo, verificamos que pelo menos em 1h de tratamento, o controle do desenvolvimento normal não apresenta diferença nos níveis transcricionais de *per* em relação ao tratamento com HJ, revelando que na verdade ocorreu um aumento na expressão de *per* no controle em que utilizamos acetona (Anexo C).

O gene *cry-m* teve seus níveis transcricionais alterados somente 1:30h após o tratamento com HJIII, com uma expressão aumentada. No desenvolvimento normal (seção 4.5), a fase de pupa de olho branco apresenta níveis de expressão basais, o que pode nos sugerir que este gene pode estar respondendo à alta dosagem de HJ aplicada em nosso tratamento. Os genes *clk* e *cyc* em *A. mellifera* são dois fatores transcricionais do tipo bHLH-PAS (Rubi et al. 2006) e a presença deste domínio confere à proteína a característica de formar um homo ou heterodímero para atuar funcionalmente em

determinadas vias moleculares (Kewley et al. 2004). Dentro dessa família de genes que apresentam este domínio, o *Methoprene-tolerant* (MET) apresenta um papel fundamental em mediar a resposta ao hormônio juvenil em *D. melanogaster* e apresenta alta afinidade pelo HJ, sendo considerado um receptor para este hormônio (Ashok et al. 1998; Miura et al. 2005; Konopova & Jindra, 2007; Charles et al. 2011). De forma interessante, foi relatado em *Aedes aegypti* que o gene do relógio *cyc* forma um heterodímero com o MET e se liga à região *e-box* regulatória de *Kr-h1*, o qual responde rapidamente ao HJ (Shin et al. 2012). Dessa forma, os autores sugeriram que *cyc* modula a expressão gênica de forma circadiana em resposta ao HJ, e ainda sugerem que a expressão do gene *kr-h1* dependente dos títulos de HJ ocorre de forma oscilatória e dependente dos ciclos de luz e escuro. Já no Hemiptera da espécie *Riptortus pedestris*, o *knockdown* do gene *cyc* em adultos fêmeas suprimiu a secreção do HJ (Ikeno et al. 2010). Tomando essas informações em conjunto com nossos dados, podemos observar que o gene *cyc* responde de forma positiva em pupas de olho branco de *A. mellifera*, assim como ocorre para o *kr-h1*, frente a altas dosagens de HJIII em 1 e 24h após o tratamento. Desse modo, nossos resultados ajudam a reafirmar que o gene *cyc* apresenta uma relação importante em regular as vias que respondem à sinalização pelo HJ em insetos e que seus níveis transcricionais podem modular de forma circadiana a secreção deste hormônio. De forma interessante, o gene *clk* também responde de forma positiva em 1:30h após o tratamento com HJ, e seus níveis mais elevados podem tanto estar relacionados com o heterodímero CLK/CYC que é formado para modular os ritmos circadianos ou talvez este gene possa também formar outros heterodímeros com outras proteínas, respondendo de formas alternativas aos altos títulos de HJ.

Em nossas análises ao longo do desenvolvimento larval e pupal, o gene do relógio *pdp1* apresentou níveis basais na fase de pupa de olho branco. Quando estas foram tratadas com HJIII, observamos que após 24h o gene *pdp1* teve seus níveis aumentados, o que pode indicar que este gene é responsivo aos títulos de HJ. Bajgar et al. (2013) relataram em uma série de experimentos que os genes do relógio *clk*, *cyc* e *pdp1* atuam em um *feedback* autoregulatório em resposta aos altos títulos de HJ que conferem o status reprodutivo de fêmeas de *Pyrrhocoris apterus*. Em resposta à secreção do HJ, os produtos de *clk* e *cyc* formam um heterodímero juntamente com MET e ativam a expressão de *pdp1* e outros genes da cascata *downstream* envolvida no status reprodutivo. Mais uma vez, nossos dados reforçam a ideia de que os genes *clk*, *cyc* e *pdp1* tem seus níveis de expressão regulados pelos títulos de HJ e que, possivelmente, seus níveis elevados em resposta a

este hormônio refletem que estes de algum modo estão interagindo em conjunto com outros genes que respondem à sinalização do HJ, como *MET* e *Kr-h1* para direcionar diferentes respostas fisiológicas. Como comentamos na seção 4.5 e 4.6, os níveis elevados de *pdp1* e *cyc* durante as fases iniciais do desenvolvimento larval provavelmente estão respondendo aos elevados níveis de hormônio juvenil, que nessas etapas tem por função impedir que a larva entre no processo de metamorfose antes do *timing* ideal.

O gene *vri* apresenta níveis transcricionais elevados na fase de pupa de olho branco, como foi visto em nossos resultados. Perante ao tratamento com HJIII, observamos que este gene foi down-regulado após 1h da aplicação hormonal. Entretanto, após 1:30h e 24h do tratamento hormonal, vimos que este gene não apresentou diferenças entre indivíduos controle e tratados, o que nos sugere que esse gene responde de forma rápida aos títulos de HJ e retorna aos seus níveis basais em curto período. Curiosamente, podemos observar que este gene se encontra em baixos níveis transcricionais durante as fases larvais L2, L3 e L4, nas quais os títulos de HJ estão elevados. Essa observação nos ajuda a reforçar a ideia de que o gene *vri* é modulado negativamente quando na presença de elevados títulos de HJ. No entanto, não há relatos na literatura sobre a relação desse gene com a via de sinalização de HJ. Os dados existentes se referem apenas aos títulos de ecdissteróides (Itoh et al., 2011; Uryu et al., 2015).

4.8. Expressão dos genes do relógio durante a idade cronológica adulta e ciclos diários em operárias de *A. mellifera*

Nessa etapa, analisamos os perfis de expressão dos genes do relógio ao longo da idade cronológica adulta em operárias de *A. mellifera*, usando quatro idades diferentes que refletissem abelhas jovens ou nutrizas (3 e 7 dias) e abelhas mais velhas ou forrageiras (15 e 25 dias). Para cada idade selecionada, verificamos também os níveis transcricionais dos genes do relógio ao longo do dia (7, 12, 17 e 22 horas) no intuito de verificar a presença ou ausência de oscilações circadianas. A partir das nossas análises, observamos que todos os genes do relógio são expressos em cabeças de operárias ao longo da idade cronológica adulta de *A. mellifera* (Figura 20). Os genes do relógio *per*, *cry-m* e *cwo* exibiram um padrão de expressão similar, apresentando elevados níveis transcricionais em cabeças de operárias com 25 dias de vida comparado às abelhas mais jovens. De forma contrária, o gene *pdp1* apresentou elevados níveis transcricionais em operárias jovens, com 3 dias de vida, comparado às mais velhas. A expressão média dos níveis de *clk* foram

maiores em cabeças de operárias com 25 dias comparado às abelhas com 3 e 15 dias, mas não apresentaram diferença significativa em relação às abelhas de 7 dias. Para os genes *cyc* e *vri*, operárias com 15 dias apresentaram diferenças em seus níveis transcricionais quando comparadas com abelhas de 3 dias e 7 dias, respectivamente. Os níveis de expressão do gene *tim2* não variaram ao longo da idade adulta em cabeças de operárias.

Figura 20 – Níveis transcricionais dos genes do relógio durante a idade cronológica adulta em cabeças de operárias de *A. mellifera* obtidos por qPCR. Os níveis de expressão foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e normalizados em relação aos níveis do gene endógeno *rp132*. Para cada idade cronológica adulta, nós utilizamos a média da expressão dos genes do relógio em cabeça de 3 a 5 indivíduos, a qual foi calculada a partir de cada ponto coletado ao longo de 24 horas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o método one-way ANOVA, seguido pelo teste de comparação par a par de Tukey, $p < 0.05$. O eixo X corresponde às idades cronológicas analisadas.

Nossos resultados revelaram que os perfis de expressão gênica encontrados em cabeças de operárias em diferentes pontos ao longo do dia apresentaram oscilações transcricionais ou ausência destas, dependendo da idade cronológica analisada (Figura 21 e 22). Desse modo, nós classificamos essas oscilações transcricionais de acordo com sua amplitude em: presente, atenuada ou ausente. As oscilações transcricionais encontradas para *per* e *cry-m* estão ausentes ou se apresentam de forma atenuada em operárias jovens (3 e 7 dias) e exibem uma grande amplitude em abelhas mais velhas (15 e 25 dias). Ambos *per* e *cry-m* demonstraram picos de expressão no começo do dia (7h) e no meio da fase

escura (22h) em cabeças de operárias com 15 dias (Figura 21.a). Em operárias com 25 dias de vida, há um pico de expressão de ambos estes genes na fase de escuro, às 22h. Além disso, observamos que ambos *per* e *cry-m* são expressos de forma sincronizada ao longo do dia em todas as idades cronológicas analisadas. Para o gene *clk*, observamos uma clara oscilação transcricional em operárias com 25 dias, com um pico e expressão na fase clara (12h) e outro na fase escura (22h) (Figura 21.b). Já o gene *cyc* apresentou uma oscilação transcricional mais atenuada em abelhas jovens e similar à encontrada para *clk* na idade de 25 dias (Figura 21.b).

Figura 21 – Perfis de expressão gênica dos genes *per* e *cry-m* (a) e, *clk* e *cyc* (b) ao longo do ciclo de 24 horas durante diferentes idades do desenvolvimento adulto em cabeças de operárias de *A. mellifera*. Os níveis de expressão, obtidos por qPCR, foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e normalizados em relação aos níveis do gene endógeno *rpl32*. Cada ponto selecionado ao longo de 24 horas (zeitgeber) representa a expressão média encontrada na cabeça de 3 a 5 indivíduos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o método one-way ANOVA, seguido pelo teste de comparação par a par de Tukey, $p < 0.05$. * ou # diferente de 7h; ** ou ## diferente de 12h; *** ou ### diferente de 17h. Barras em branco e preto na parte inferior aos gráficos refletem as fases clara e escura de acordo com os horários do dia analisados (eixo x), respectivamente.

De forma interessante, observamos uma forte oscilação nos níveis transcripcionais de *pdp1* ao longo do dia em operárias jovens (3 dias) comparado às outras idades, enquanto o oposto foi observado para o gene *vri* em abelhas mais velhas (25 dias) (Figura 22.a). Nas idades cronológicas onde *pdp1* e *vri* apresentam uma forte oscilação transcricional, ambos apresentam um pico de expressão na fase clara do dia (12h) e baixos níveis de expressão no início da fase clara do dia (7h) e na fase escura (22h). Oscilações transcripcionais do gene *cwo* foram observadas na cabeça de operárias com 3, 15 e 25 dias de vida adulta (Figura 22.c). Em operárias com 3 e 15 dias, ocorre um pico de expressão na fase clara, às 17h, implicando que há uma oscilação circadiana nessas idades. Em

operárias com 15 dias, os níveis de *cwo* também se apresentam altos na fase clara (17h) e atingem um pico de expressão na fase escura (22h). O gene *tim2* não apresentou oscilações transcricionais durante todas as idades cronológicas analisadas (Figura 22.b).

Figura 22 - Perfis de expressão gênica dos genes *vri* e *pdp1* (a), *tim2* (b) e *cwo* (c) ao longo do ciclo de 24 horas durante diferentes idades do desenvolvimento adulto em cabeças de operárias de *A. mellifera*. Os níveis de expressão, obtidos por qPCR, foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e normalizados em relação aos níveis do gene endógeno *rpl32*. Cada ponto selecionado ao longo de 24 horas (zeitgeber) representa a expressão média encontrada na cabeça de 3 a 5 indivíduos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o método one-way ANOVA, seguido pelo teste de comparação par a par de Tukey, $p < 0.05$. * ou # diferente de 7h; ** ou ## diferente de 12h; *** ou ### diferente de 17h. Barras em branco e preto na parte inferior aos gráficos refletem as fases clara e escura de acordo com os horários do dia analisados (eixo x), respectivamente.

As características do modelo *single-cohort colony* utilizado em nosso desenho experimental, onde todas as abelhas apresentam a mesma idade, nos possibilitou testar se a expressão dos genes estudados é influenciada pelo avanço da idade cronológica e/ou comportamento. Nossos resultados corroboram com o observado por Toma et al. (2000), onde os níveis transcricionais de *per* são maiores no cérebro de abelhas mais velhas (25 dias) quando comparados aos níveis encontrados em abelhas mais jovens (3 e 7 dias). Adicionalmente, nossos dados revelam que abelhas com 25 dias de vida apresentam maiores níveis de expressão de *per* comparado às abelhas com 15 dias de vida. Os genes *cry-m* e *cwo* se comportaram da mesma maneira que *per*, sendo os seus perfis de expressão relatados pela primeira vez em abelhas adultas de *A. mellifera*. Bloch et al.

(2001) elaborou a hipótese que abelhas forrageiras coletadas diretamente do campo, com mais de 21 dias, sempre apresentam elevados níveis transcricionais de *per* comparado a abelhas mais jovens, o que vai de encontro com nossos resultados obtidos na *single-cohort colony*, incluindo os genes *cwo* e *cry-m*. De forma contraditória, o mesmo estudo não observou diferenças nos níveis de expressão de *per* no cérebro de abelhas jovens (8 a 10 dias) em relação a abelhas mais velhas (23 a 25 dias) utilizando o mesmo modelo adotado em nosso trabalho (Bloch et al. 2001). Entretanto, outros estudos sugerem que os níveis transcricionais de *per* no sistema nervoso central de abelhas não estão estritamente ligados à idade cronológica, mas dependem de outros fatores como o forrageamento precoce, uma característica que foi observado em *single-cohort colonies* mantidas tanto no campo quanto em laboratório (Toma et al. 2000; Bloch et al. 2001).

Os altos níveis transcricionais de *per*, *cry-m* e *cwo* em abelhas operárias com 25 dias de vida podem refletir a intensa atividade forrageira que ocorre nesse momento da vida, a qual depende de ritmos circadianos robustos. Essa ritmicidade é comprovada por nossos resultados, onde observamos que estes genes apresentam uma forte oscilação transcricional durante o ciclo de 24 horas nessa idade do desenvolvimento e devem ser requeridos para garantir a manutenção dos ritmos que coordenam as diferentes atividades complexas que são desenvolvidas pela forrageira. Curiosamente, não verificamos diferenças nos níveis de expressão de *per*, *cry-m* e *cwo* entre abelhas de 3-7 dias com abelhas de 15 dias, que seriam as supostas forrageiras da colônia e teoricamente deveriam apresentar maiores níveis transcricionais, pelo menos para *per*. Como em uma *single-cohort colony* há ausência de forrageiras na população inicial que foi introduzida na colônia, composta apenas de abelhas recém-emergidas, sugerimos que a expressão dos genes *per*, *cry-m* e *cwo* é afetada de modo que estes genes já começam a ter uma elevação em seus níveis transcricionais cedo na vida adulta, sinalizando o preparo das abelhas jovens para forragearem precocemente.

Apesar de não encontrarmos diferenças entre os níveis transcricionais médios de *per*, *cry-m* e *cwo* entre operárias de 3 e 7 dias (nutrizes) e operárias de 15 dias (forrageiras), nós observamos uma nítida diferença entre as flutuações transcricionais que ocorrem durante 24 horas entre esses indivíduos, pelo menos para os genes *per* e *cry-m*. Ambos *per* e *cry-m* apresentam ausência de oscilações em sua expressão logo no início da vida adulta em abelhas com 3 dias, seguindo com oscilações mais atenuadas em abelhas com 7 dias. Já abelhas mais velhas com 15 e 25 dias, há a presença de fortes oscilações transcricionais de ambos os genes ao longo de 24 horas, o que é consistente

com outros estudos já publicados (Bloch et al. 2001; Shemesh et al. 2007). Essa característica observada, nos dá a sugestão de que a plasticidade comportamental em abelhas está associada com a oscilação transcricional de *per* e *cry-m* em cabeças de operárias, e isto reflete a divisão do trabalho entre abelhas jovens (arrítmicas) e abelhas mais velhas (rítmicas). Enquanto abelhas jovens (nutrizes) trabalham continuamente durante 24 horas exercendo as mesmas funções de cuidado com a cria de forma arrítmica, abelhas mais velhas (forrageiras) necessitam de fortes ritmos circadianos na expressão gênica de *per* e *cry-m* para desenvolver atividades complexas como forrageamento, navegação pela bússola solar, aprendizado, memorização e linguagem de dança. Além disso, como as abelhas forrageiras estão em constante contato com o ambiente externo da colônia, estas precisam perceber as variações em luminosidade e temperatura que ocorrem frequentemente e ajustar seus ritmos circadianos para exercer suas tarefas de forma eficiente durante o dia.

Em contraste, Fuchikawa et al. (2017) observaram que a oscilação nos níveis proteicos de *per* é similar no cérebro de nutrizes arrítmicas e forrageiras rítmicas. Essa observação, em conjunto com nossas análises, sugerem que a oscilação encontrada nos níveis proteicos de *per* em abelhas jovens e arrítmicas (nutrizes) não requerem uma oscilação nos seus níveis transcricionais. Desse modo, nossos resultados suportam a ideia de que a ontogenia dos ritmos circadianos está estritamente ligada à divisão de trabalho em abelhas sociais combinada aos níveis oscilatórios de *per* e *cry-m*. Ambos podem ser considerados como candidatos a marcadores moleculares que definem a maturação comportamental em operárias de *A. mellifera*.

De forma notável, nossos dados demonstraram que o gene *clk* apresentou oscilações em seus níveis transcricionais em cabeças de operárias com 25 dias de vida, contrastando com a ausência de oscilações encontradas em forrageiras por Rubin et al. (2006). A oscilação encontrada na expressão de *cyc* em operárias com 25 dias, ainda que de forma moderada, reflete que este gene está expresso de forma sincronizada com *clk*, o que confirma que ambos estão atuando juntos no mecanismo molecular circadiano para modular os ritmos circadianos. Em mamíferos, o gene do relógio *tim2* é expresso nas células da retina e aparentemente está relacionado com funções fotorreceptoras (Sangoram et al. 1998; Takumi et al. 1999). Em outro Hymenoptera, *Ceratosolen solmsi*, *tim2* apresenta uma expressão arrítmica em machos que vivem no interior do sincônio de flores e na ausência de luz. Já em fêmeas da mesma espécie, as quais deixam o sincônio cedo durante a vida adulta, *tim2* apresenta uma expressão rítmica durante o dia, o que

sugere que a oscilação transcricional desse gene é dependente do contato com a luz (Gu et al. 2014). Entretanto, nossas análises demonstraram que o gene *tim2* não apresenta flutuações transcricionais em operárias adultas em toda as idades investigadas ao longo de 24 horas. Esse resultado está de acordo com o reportado por Rubin et al. (2006), o que nos leva a crer que *tim2* se comporta de maneira diferente em abelhas sociais. Maiores estudos com esse gene são necessários para desvendar as funções desse gene em abelhas.

Como discutimos anteriormente, os genes *pdp1* e *vri* apresentam outras funções não-circadianas em embriões e larvas de *D. melanogaster* e que podem acontecer de forma similar em abelhas, caso sejam mecanismos conservados. Em nosso trabalho, nós demonstramos pela primeira vez como esses dois genes se comportam no desenvolvimento adulto de abelhas. A forte oscilação nos níveis transcricionais de *pdp1* durante o início da vida de operárias e de *vri* mais tardiamente em abelhas com 25 dias podem refletir diferentes papéis desses genes em momentos específicos da vida adulta de *A. mellifera*. A elevada expressão média de *pdp1* associada à sua forte oscilação em operárias muito jovens (3 dias) pode estar associada ao *status* nutricional destas, uma vez que já foi reportado na literatura que este gene é afetado pela disponibilidade de alimento no desenvolvimento larval de *D. melanogaster* (Reddy et al. 2006). O mesmo pode ocorrer no inseto adulto, já que a dieta e os regimes de alimentação regulam o relógio interno dos organismos (Chaudhari et al. 2017). Desse modo, sugerimos que a quantidade e o tipo de alimento ingerido durante a idade cronológica de abelhas podem afetar diretamente a expressão de *pdp1*.

Os elevados níveis transcricionais encontrados para o gene *cwo* às 17h em cabeças de operárias são similares aos encontrados por Rodriguez-Zaz et al. (2012). Além disso, padrões de expressão similares também foram observados, em nossas análises, nos intervalos de 7 a 17h em operárias com 15 e 25 dias de vida, mas não para o intervalo de 22h. Observando que este gene se comportou de forma diferente em algumas idades do desenvolvimento, não descartamos a ideia de que em um ambiente social, nem todas as abelhas individuais apresentam o mesmo ritmo circadiano, pelo menos quando a expressão gênica é considerada. Em uma comunidade social, os membros podem se comportar diferentemente de acordo com a oportunidade de interagir com os outros. O mesmo pode ocorrer com os ritmos circadianos. Como exemplo temos a expressão de *cwo*, o qual demonstrou uma sensibilidade à organização social da colônia quando testamos a expressão gênica utilizando para cada análise a cabeça de um indivíduo, e não um *pool*. Isto nos permite também concluir que a expressão de alguns genes do relógio

pode ser afetada devido a distribuição demográfica característica de uma *single-cohort colony*, onde o número e tipo de indivíduos é diferente ao de uma colônia de campo, pelo menos na fase inicial do experimento.

Tomando todos os resultados obtidos relacionados à expressão dos genes do relógio em operárias de *A. mellifera* ao longo do dia e do desenvolvimento adulto, demonstramos que todos os genes analisados se expressam na cabeça ao longo das diferentes idades analisadas, o que pode estar refletindo a expressão desses genes nos neurônios circadianos. Observamos padrões de expressão circadiana similares e sincronizados para alguns grupos de genes, *per* com *cry2* e *clk* com *cyc*, o que coincide com o modo como esses atuam dentro do ciclo autoregulatório de neurônios para gerar ritmos circadianos. Também verificamos que a relação de *per* e *cry2* com a divisão de trabalho entre operárias provavelmente está mais ligada ao modo como seus transcritos oscilam ao longo de 24 horas (arriticamente ou ritimicamente) do que com os valores de expressão pontuais encontrados em cada idade de desenvolvimento. De forma interessante, acreditávamos que em operárias com 25 dias, os genes do relógio pudessem apresentar uma expressão parecida com o que ocorre em alguns outros organismos que estão em processo de senescência, ou seja, uma queda em seus níveis transcricionais e atenuação em seus ritmos de expressão. Entretanto, alguns desses genes apresentaram elevados níveis transcricionais e oscilatórios em abelhas, e sugerimos que sua modulação aconteça de forma diferente em relação a outros organismos. Acreditamos que, mesmo em processo de senescência, genes como *per*, *cry-m*, *clk* e *cwo* se mantêm em níveis elevados para garantir que a abelha operária continue realizando suas atividades de forrageamento. Talvez a coleta de abelhas operárias em idades mais avançadas (>30 dias) possa também nos revelar que o processo de senescência esteja mais evidente em idades bem mais tardias do que se acredita.

Os resultados obtidos nessa seção nos permitiram elaborar o manuscrito “*Circadian clock genes are differentially modulated during the daily cycles and chronological age in the social honeybee (Apis mellifera)*”, o qual foi submetido durante o desenvolvimento deste projeto, sendo aceito e publicado na revista online *Apidologie* (DOI: [10.1007/s13592-017-0558-7](https://doi.org/10.1007/s13592-017-0558-7)) (Anexo D).

4.9. Rede de interação proteína-proteína para os genes do relógio em *A. mellifera*

A Figura 23 ilustra as interações físicas para os genes do relógio *per*, *cry-m*, *clk*, *cyc*, *tim2*, *pdp1* e *vri* baseadas em dados curados para órtologos em *D. melanogaster* e *M. musculus*. De acordo com nossa rede de interação proteína-proteína, nós buscamos por ontologia gênica para os genes órtologos em *D. melanogaster* e encontramos processos biológicos relacionados com a regulação celular, metabólica e desenvolvimento, principalmente aqueles relacionados a processos enzimáticos, catalíticos e estruturais (Anexo A). Já para os genes do relógio órtologos em mamíferos, a análise de ontologia gênica revelou genes associados a processos de replicação, metabolismo do DNA e importação de proteínas (Anexo B). Não foram encontradas interações físicas para os genes *cwo* e *pdp1* com outros genes nos dados disponíveis no banco de dados BioGRID.

Figura 23 – Rede de interação proteína-proteína representando as interações físicas putativas entre os genes do relógio e outras proteínas em *A. mellifera*. A análise foi baseada em dados curados disponíveis para *D. melanogaster* e *M. musculus* na plataforma online BioGRID (www.thebiogrid.org/). Interações físicas baseadas na ortologia com *D. melanogaster* correspondem aos nós em laranja ligados pelas arestas aos genes do relógio *per*, *cyc*, *clk* e *vri*. Interações baseadas na ortologia com *M. musculus* representam os nós em verde ligados aos genes *cry-m* e *tim2*.

Nossa rede de interação proteína-proteína revelou interações físicas entre as proteínas do relógio e outras proteínas que estão associadas a processos biológicos como: regulação pós-traducional, fosforilação, ubiquitinação e degradação. O gene *disc*

overgrown (DCO), também chamado de *doubletime* (DBT), codifica uma das proteínas que tem por função fosforilar PER, contribuindo para modular seus níveis traducionais no citoplasma. A fosforilação de PER por DBT permite que a proteína SLIMB, também presente em nossa rede de interação, reconheça o sítio fosforilado e recrute proteínas de degradação que participam do sistema ubiquitina-proteassoma (Price et al. 1998; Kloss et al. 1998; Ko et al. 2002; Cyran et al. 2005; Chiu et al. 2008; Weber et al. 2011). De acordo com outros dados de ontologia gênica disponíveis no banco de dados FlyBase (<http://flybase.org/>), a proteína DBT também está envolvida em processos morfogênicos da orientação das cerdas das asas de *D. melanogaster*, enquanto a proteína SLMB também participa de processos da embriogênese e proliferação celular. Ainda, observamos uma interação física entre VRI e SLMB, o que sugere uma função não-circadiana de ambas durante a embriogênese de *D. melanogaster*, como reportado na literatura (George & Terracol, 1997; Szuplewski et al. 2010). Encontramos também quatro proteínas envolvidas na via ubiquitina-proteossoma (SLIMB, USP8, RPS27A e UBI-p5E) que apresentaram interações com PER, VRI, CLK e CYC, o que nos sugere que esse sistema de degradação de proteínas tenha uma função importante em regular os produtos dos genes do relógio. De forma interessante, a proteína BRP (*bruchpilot*), a qual interage com PER, está aparentemente envolvida em processos de formação de memória e atividade locomotora (Wagh et al. 2006; Knapek et al. 2011). Além disso, o gene *brp* está associado à plasticidade circadiana sináptica no sistema visual de mosca-das-frutas (Woznicka et al. 2015).

De forma curiosa, as interações físicas encontradas para os genes do relógio *cry-m* e *tim2*, ortólogos em mamíferos, nos revelaram proteínas relacionadas aos processos de replicação e metabolismo do DNA. Ressaltamos aqui, que todas as proteínas encontradas que estabelecem interações físicas com esses dois genes também apresentam ortólogos em abelhas, o que nos sugere a ocorrência de interações similares com os produtos dos genes do relógio. Todas as proteínas que interagem com o gene *tim2* apresentam um papel essencial em regular a integridade do cromossomo e replicação do DNA (Gotter et al. 2000; Benna et al. 2010). Nas seções anteriores, demonstramos que o gene *tim2* apresenta altos níveis transcricionais nas primeiras horas do desenvolvimento embrionário de operárias e zangões de *A. mellifera*, em momentos onde estão ocorrendo principalmente clivagens, o que ajuda a corroborar a hipótese a respeito do envolvimento desse gene nas funções descritas acima. Já a proteína CRY-m demonstrou interações físicas com FBKL3 e SKP1, e o complexo gerado por essas três proteínas direcionam a

ubiquitinação de CRY-m e direciona a sua degradação, sugerindo um papel destas em modular os níveis de CRY-m no citoplasma e contrubuir para a regulação dos ritmos circadianos (Xing et al. 2013. Yoo et al. 2013). As interações físicas para CRY-m ainda revelaram proteínas envolvidas na importação nuclear, as carioferinas KPN2, KPN4 e KPN7, como possíveis candidatas em translocar o CRY-m do citoplasma para o núcleo.

A reconstrução da rede de interação proteína-proteína nos permitiu ampliar nossa visão a respeito das interações moleculares que potencialmente podem acontecer entre os produtos dos genes do relógio e genes não canônicos do mecanismo circadiano em *A. mellifera*. Além disso, essa análise nos revelou possíveis proteínas que estão envolvidas na regulação dos genes do relógio em nível traducional, uma vez que observamos proteínas responsáveis pela fosforilação e degradação destes. Acreditamos que essas interações devem ocorrer principalmente nos neurônios osciladores do sistema nervoso central, onde os ritmos circadianos são diretamente modulados.

4.10. Rede de interação miRNA-mRNA em *A. mellifera*

Nessa etapa, propusemos identificar através de predição computacional, miRNAs que possam ser potenciais reguladores dos componentes genéticos envolvidos na modulação dos ritmos circadianos. A partir da predição das interações miRNA-mRNA, foram encontrados 201 miRNAs de *A. mellifera* como possíveis reguladores dos oito genes do relógio em estudo (≤ -20 Kcal/mol e p-value < 0.05). Este resultado é interessante, uma vez que um grande número de miRNAs apresentaram sítios de ligação com as regiões 3'UTR dos *clock genes*. Como o sistema circadiano é altamente conservado na maioria das espécies, acreditamos que sua regulação pelos miRNAs seja complexa e ampla. Levando em conta que as análises de predição computacional também podem gerar resultados falso-positivos, nós selecionamos aqueles miRNAs que já foram previamente descritos para outros insetos e que apresentam possíveis papéis em regular os ritmos circadianos ou outras funções neuronais. A reconstrução da rede de interação miRNA-mRNA ilustra potenciais miRNAs que podem regular os genes do relógio, os quais já foram bem estudados em mosca-das-frutas ou apontados como reguladores do desenvolvimento de *A. mellifera*, como os miRNAs *let-7*, *mir-8*, *miR-9a*, *miR-34*, *miR-24*, *miR-31a*, *bantam* e *miR-263b* (Figura 24). Dentre esses genes, o *miR-263b* se apresentou enriquecido para os genes-alvos, sendo este um suposto regulador dos genes do relógio *clk*, *cry-m*, *tim2*, *pdp1*, *cyc* e *vri*.

Figura 24 – Rede de interação miRNA-mRNA. A rede ilustra os miRNAs que apresentam sítios de ligação putativos que interagem com as regiões 3'UTRS dos genes do relógio em *A. mellifera*. A predição foi baseada em parâmetros previamente determinados ($\Delta G \leq -20$ Kcal/mol; p value < 0.05). Os nós em branco e cinza representam os miRNAs preditos e os genes do relógio alvo, respectivamente, ligados por arestas.

Análises recentes revelaram uma série de miRNAs enriquecidos em imunoprecipitações do complexo RISC de neurônios osciladores em cérebro de *D. melanogaster*, o que sugere que estes atuam regulando a estabilidade ou a tradução dos genes do relógio, em especial dos genes *clk*, *vri* e *cwo* (Kadener et al. 2009). Os mesmos autores também demonstraram uma série de miRNAs altamente expressos nos neurônios circadianos quando realizaram o *knockdown* da enzima Dicer. Alguns desses miRNAs foram preditos em nossas análises, como o *let-7*, *bantam*, *miR-8*, *miR-9a*, *miR-34* e *miR-184*. Além disso, os miRNAs *let-7*, *bantam*, *miR-8*, *miR-9a*, *miR-34* e *miR-124* que apresentam funções neuronais já descritas na literatura (revisado por Asgari, 2013). A superexpressão de *bantam*, um potencial regulador de *clk*, nos neurônios de moscas adultas leva a longos períodos rítmicos (Kadener et al. 2009). Já a superexpressão ou deleção de *let-7* afeta a duração dos ritmos circadianos em mosca-das-frutas (Chen et al. 2014) e sugere-se que este miRNA forma um ciclo auto-regulatório no mecanismo circadiano, sendo ativado indiretamente por CLK/CYC através da via de ecdisteróides e regulando negativamente a expressão de *cwo*. Ainda, os miRNAs *let-7*, *miR-8* e *miR-34*

apresentam papéis essenciais em prevenir os processos neurodegenerativos e envelhecimento em *D. melanogaster* (Liu et al. 2012; Chawla et al. 2016). O *miR-9a* tem uma expressão oscilatória nos neurônios circadianos das moscas-das-frutas modula a excitabilidade neuronal através da regulação do gene *sirt2* (Chen & Rosbash, 2016). O *miR-263b*, enriquecido em nossas análises, já foi descrito como um miRNA que apresenta oscilações em seus níveis transcricionais no cérebro de *D. melanogaster*, além de sofrer modulação de acordo com os níveis de *cyc*. Todos os miRNAs ilustrados em nossa rede de interação já foram detectados no sistema nervoso central de *D. melanogaster*, o que nos abre a oportunidade de investiga-los experimentalmente em abelhas e verificar se estes apresentam funções similares em regular os genes do relógio e os ritmos circadianos.

4.11. Correlação da expressão gênica de miRNAs e genes do relógio ao longo do desenvolvimento embrionário de *A. mellifera*

Para realizar a validação da expressão dos miRNAs, selecionamos três miRNAs da nossa rede de interação miRNA-mRNA, baseando no que já foi descrito na literatura e suas funções. Selecionamos o *miR-263b* devido ao seu enriquecimento em nossa rede de interação miRNA-mRNA e, também por já ser descrito na literatura que este apresenta relação com os ritmos circadianos, como relatado na seção anterior. O *miR-31a* também foi selecionado baseando-se em sua detecção no sistema nervoso central de *D. melanogaster* e a aparente função neuronal nesse organismo. Já o *miR-34*, é um miRNA extremamente conservado em diversas espécies, e sua função em regular processos neurológicos está bem elucidada em alguns organismos, o que faz desse miRNA um alvo de estudos nesse sentido. Além disso, esse miRNA já é bem descrito em *A. mellifera*, e temos alguns trabalhos disponíveis na literatura que exemplificam seu papel em abelhas. Nessa seção, mostramos como esses miRNAs se comportam ao longo de diferentes momentos da embriogênese e como sua expressão está relacionada com os genes do relógio que potencialmente são regulados por esses três miRNAs.

Nossos resultados revelaram que o *miR-263b* foi detectado apenas em 38 horas do desenvolvimento embrionário de fêmeas de *A. mellifera*. Nesse momento da embriogênese, também foram detectados picos de expressão dos genes *cry-m*, *pdp1* e *vri*. Já os genes *per*, *cyc* e *tim2* apresentam uma expressão em antifase com o *miR-263b* em 38h do desenvolvimento (Figura 25). O gene do relógio *clk* apresenta um pico de

expressão em 24h do desenvolvimento embrionário, precedendo a detecção de miR-263b na gastrulação, em 38h.

Figura 25 – Correlação da expressão do *miR-263b* com seus alvos ao longo do desenvolvimento embrionário de *A. mellifera* obtido por qRT-PCR. Os níveis de expressão foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O Eixo primário (esquerda) corresponde à expressão relativa dos alvos e o eixo secundário (direita) corresponde à expressão relativa dos miRNAs. Para mRNAs os níveis de expressão foram normalizados em relação ao gene endógeno *rpl32*, enquanto para os miRNAs utilizou-se o gene *U5* como normalizador.

O *miR-34* apresentou elevados níveis transcricionais em 6 e 48h do desenvolvimento embrionário de forma oposta ao que ocorre com os genes do relógio *cry-m*, *pdp1* e *vri* (Figura 26). Ainda, em 38h do desenvolvimento do embrião, o *miR-34* apresenta baixos níveis de forma oposta ao que ocorre para *cry-m*, *pdp1* e *vri*. Este miRNA acompanha o perfil de expressão de *per*, *cyc* e *tim2* nos intervalos de 6 a 38h do desenvolvimento embrionário e posteriormente se comporta de forma oposta, apresentando um pico de expressão em 48 horas.

Figura 26 – Correlação da expressão do *miR-34* com seus alvos ao longo do desenvolvimento embrionário de *A. mellifera* obtido por qRT-PCR. Os níveis de expressão foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O Eixo primário (esquerda) corresponde à expressão relativa dos alvos e o eixo secundário (direita) corresponde à expressão relativa dos miRNAs. Para mRNAs os níveis de expressão foram normalizados em relação ao gene endógeno *rpl32*, enquanto para os miRNAs utilizou-se o gene *U5* como normalizador.

Por fim, o *miR-31a* também apresentou um pico de expressão em 38h do desenvolvimento embrionário em oposto ao que ocorre para os genes do relógio *per*, *cyc* e *tim2* (Figura 27). Já os genes do relógio *pdp1* e *vri* apresentam perfis transcricionais similares ao longo das fases do desenvolvimento analisadas no embrião.

Figura 27 – Correlação da expressão do *miR-31a* com seus alvos ao longo do desenvolvimento embrionário de *A. mellifera* obtido por qRT-PCR. Os níveis de expressão foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O Eixo primário (esquerda) corresponde à expressão relativa dos alvos e o eixo secundário (direita) corresponde à expressão relativa dos miRNAs. Para mRNAs os níveis de expressão foram normalizados em relação ao gene endógeno *rpl32*, enquanto para os miRNAs utilizou-se o gene *U5* como normalizador.

Tomando nossos resultados em conjunto, sugerem que os *miR-263b* e *miR-31a* podem apresentar papéis importantes nos eventos que ocorrem em 38 horas do

desenvolvimento embrionário, onde a gastrulação ocorre. Como já discutimos anteriormente, nesse momento o sistema nervoso central está sendo formado e a expressão desse miRNAs de forma oposta aos seus alvos pode estar relacionada à regulação dos genes do relógio nos primeiros neurônios que estão se formando. De acordo com os nossos resultados, podemos sugerir que o miR-34 apresenta papéis tanto na embriogênese inicial quanto na fase tardia do desenvolvimento. Possivelmente, os níveis de expressão encontrados em 6 horas de desenvolvimento embrionário podem refletir transcritos que foram herdados maternalmente, corroborando com Soni et al. (2013), os quais demonstraram que o *miR-34* é herdado desse mesmo modo em *D. melanogaster* e *D. rerio*. Além disso, a elevada expressão de miR-34 em 38 horas também pode estar relacionada ao seu papel regulador no desenvolvimento do sistema nervoso (Soni et al., 2013). Em termos de expressão, nossos resultados são muito claros em apontar que os miRNAs analisados atuam regulando os genes do relógio, especialmente quando olhamos para a correlação do miR-34 e seus alvos. Lembrando que estamos apenas nos referindo ao papel canônico atribuído aos miRNAs, ou seja, que eles estejam atuando como inibidores da expressão de seus alvos (Bartel, 2009).

4.12. Expressão de miRNAs durante o dia e idade cronológica adulta de operárias de *A. mellifera*

Nessa etapa, validamos também a expressão dos miRNAs selecionados, usando cabeças de operárias ao longo das idades cronológicas adultas e no decorrer de 24 horas, no intuito de verificar se os perfis de expressão dos miRNAs *miR-34*, *miR-31a* e *miR-263b* apresentam alguma relação com o avanço da idade ou se apresentam oscilações transcricionais nos indivíduos analisados. Detectamos a expressão dos três miRNAs em cabeças de operárias, porém observamos que estes apresentaram grandes variações de indivíduo para indivíduo analisado, o que gerou alguns desvios que não nos permitiram atribuir valores às diferenças observadas na maioria das idades analisadas. Essa variação encontrada individualmente pode estar relacionada à instabilidade desses pequenos RNAs associada à dinâmica em que estes agem molecularmente, se ligando e desligando das regiões 3'UTRS de um ou mais alvos. Quando avaliamos a expressão média em cada idade cronológica avaliada, verificamos que o miR-24 apresentou elevados níveis transcricionais em operárias com 25 dias de vida comparado às idades anteriores. Já para o miR-31a, observamos baixos níveis transcricionais deste miRNA em abelhas jovens

com 3 dias de vida em relação as demais. O miR-263b não apresentou diferenças entre todas as idades cronológicas analisadas.

Figura 28 – Perfil de expressão gênica dos microRNAs maduros *miR-34*, *miR-31a* e *miR-263b* ao longo da idade cronológica adulta em cabeça de operárias de *A. mellifera* obtido através de qRT-PCR. Os Valores médios de expressão gênica ao longo das idades de desenvolvimento de 3, 7, 15 e 25 dias foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e normalizados em relação aos níveis do gene endógeno *U5*. Foi utilizado o teste 1-Way ANOVA, com apenas um critério, seguido pelo teste t de Tukey, considerando $p < 0.05$. * diferente de 3 dias; ** diferente de 7 dias; *** diferente de 15 dias.

Quando observamos os perfis de expressão dos miRNAs em análises durante diferentes horários ao longo do dia, verificamos que o miR-34 apresentou uma aparente oscilação em seus níveis transcricionais na cabeça de operárias com 25 dias de vida, onde este exibiu baixos níveis de expressão nas fases claras do dia e um pico de expressão na fase escura, às 22h (Figura 29). Além disso, seus níveis médios de expressão elevados em operárias com 25 dias vão de encontro com o que já foi relatado na literatura, onde os níveis de expressão deste miRNA aumentam com o avanço da idade, no intuito de combater efeitos do envelhecimento como a perda da locomoção e deterioração cerebral (Liu et al., 2012a). Do mesmo modo que o *miR-34*, seus genes alvos *per* e *cry-m* também apresentam níveis médios de expressão elevados em operárias de 25 dias de vida e uma sincronia no modo em que oscilam durante o dia. Juntas, essas informações nos levam a crer que em nosso experimento, operárias com 25 dias de vida refletem muito bem a atividade forrageira através dos níveis elevados e cíclicos de *per* e *cry-m* na cabeça, juntamente com o *miR-34* que é expresso do mesmo modo e atua prevenindo a degeneração do sistema nervoso da abelha para que essa possa desempenhar atividades complexas fora da colmeia. Além disso, a elevada expressão de *miR-34* em operárias com 25 dias de vida pode ser um indicativo que estas já entraram em fase de senescência.

Figura 29 - Perfil de expressão gênica dos microRNAs maduros *miR-34*, *miR-31a* e *miR-263b* ao longo do dia em diferentes idades cronológicas na cabeça de operárias de *A. mellifera* obtido através de qRT-PCR. Os níveis de expressão gênica ao longo de 24 horas, nos horários de 7, 12, 17 e 22 h, foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e normalizados em relação aos níveis do gene endógeno *U5*. Foi utilizado o teste 1-Way ANOVA, com apenas um critério, seguido pelo teste t de Tukey, considerando $p < 0.05$. * diferente de 7h; ** diferente de 12h; *** diferente de 17h. Barras em branco e preto na parte inferior aos gráficos refletem as fases clara e escura de acordo com os horários do dia analisados (eixo x), respectivamente.

O *miR-263b* não exibiu um padrão de expressão que nos levasse a concluir que este apresenta oscilações transcricionais ao longo de 24h em cabeças de operárias com 3 e 15 dias. Em operárias com 7 dias nós observamos que este miRNA apresenta uma oscilação em seus transcritos entre os horários de 7h e 12h, enquanto em abelhas com 25 dias verificamos que os níveis do *miR-263b* diferem apenas na fase escura (22h), com um decaimento em seus transcritos. Um estudo usando *microarrays* detectou que o *miR-263b* apresenta oscilações transcricionais em cabeças de moscas adultas, porém não foram avaliadas diferentes idades do desenvolvimento (Yang et al. 2008). Nossos resultados para o *miR-263b* nos mostram que os níveis de expressão desse pequeno RNA não apresentam relação com o avanço da idade ou divisão do trabalho, uma vez que seu padrão de expressão pontual ou oscilante não apresentam uma característica para tais inferências. Já o *miR-31a* exibiu flutuações em seus níveis transcricionais em cabeças de operárias com 7 dias, onde encontramos maiores níveis de expressão nos horários de 17 e 22h comparado aos baixos níveis vistos em 7 e 12h. Em contrapartida, operárias com

25 dias de vida apresentaram o oposto nos níveis de expressão do miR-31a , onde aparecem maiores níveis transcricionais às 7 e 12 h, os quais decaem ao longo do dia até atingir baixos níveis em 17 e 22h. Em 15 dias, ainda que não foram encontradas diferenças estatísticas, podemos ver que há uma tendência em ocorrer o mesmo padrão de expressão encontrado para operárias com 25 dias. O fato do miR-31a apresentar elevados níveis médios em sua expressão quando comparamos operárias de 7, 15 e 25 dias em relação às operárias com 3 dias (Figura 28), pode refletir que este miRNA responde cedo na vida adulta em resposta a necessidade da colônia em recrutar abelhas jovens para iniciar a atividade forrageira, como discutimos anteriormente para os genes *per* e *cry-m*, os quais também seguem essa característica em seus padrões de expressão. Um estudo demonstrou que a expressão de *miR-31a* é alterada em mutantes de *cyc* em *D. melanogaster*, o que sugere que este miRNA além de potencial regulador de *cyc* também tem seus níveis regulados pelo seu alvo (Yang et al. 2008).

4.13. Validação das interações entre o miR-34 e seus alvos em *A. mellifera* pelo ensaio da luciferase

A partir da abordagem *in silico* que foi realizada através de ferramentas computacionais, nós obtivemos uma rede de interação entre os possíveis microRNAs candidatos a regular os genes do relógio, como demonstrado na seção 4.10. A partir disso, validamos a expressão gênica de alguns desses microRNAs e verificamos que o miR-34 apresentou os melhores resultados. Escolhemos então esse microRNA para seguir com nossas análises funcionais. A decisão de seguir com as análises funcionais com o miR-34 se deve ao fato desse microRNA ser conservado em insetos e estar diretamente relacionado a processos que ocorrem no sistema nervoso central. Além disso, nosso grupo já vem trabalhando há alguns anos com o miR-34 e recentemente publicou um trabalho onde foram validadas funcionalmente as interações do miR-34 com genes envolvidos no desenvolvimento embrionário, revelando novas funções para esse microRNA (Freitas et al., 2017).

Através das nossas análises pela ferramenta RNAhybrid, conseguimos prever possíveis sítios de interação do miR-34 nas regiões 3'UTRs de todos os genes do relógio, com exceção do gene *clk*. Lembramos que essa predição foi confirmada também em *D. melanogaster*. As Figuras 30 a 32 ilustram as regiões 3'UTRs dos genes candidatos, a localização de cada sítio de interação com o miR-34, bem como a validação da expressão gênica das regiões 3'UTRs contendo cada sítio. Ao todo selecionamos 12 sítios de

interação com o miR-34 como candidatos para validação e clonagem. Vale ressaltar que para alguns genes foram selecionados mais de um sítio, uma vez que já se sabe que o mesmo miRNA pode apresentar mais de um sítio de interação com a 3'UTR de um gene. A validação por RT-PCR nos gera um resultado importante, pois estamos validando a 3'UTR dos *clock genes* e confirmando o que está predito computacionalmente nos bancos de dados. Além disso, a amplificação da região da 3'UTR contendo exatamente o sítio de interação com o miR-34 serviu como molde para a realização das clonagens no vetor PSICHECK2, purificação dos plasmídeos contendo essas regiões e o ensaio por luciferase.

Figura 30 - Representação do sítio de ligação predito para o miR-34 na 3'UTR dos genes *per* e *cyc* de *A. mellifera* pelo programa RNAhybrid. A região codificadora dos genes está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para o miR-34, numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR em amarelo. O fragmento amplificado da 3'UTR através de RT-PCR contendo o sítio de interação com o miR-34 e o controle negativo estão ilustrados na imagem do gel de agarose 1,2% em destaque na parte inferior da figura.

Figura 31 - Representação do sítio de ligação predito para o miR-34 na 3'UTR dos genes *cry-m*, *cwo* e *vri* de *A. mellifera* pelo programa RNAhybrid. A região codificadora dos genes está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para o miR-34, numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR em amarelo. O fragmento amplificado da 3UTR através de RT-PCR contendo o sítio de interação com o miR-34 e o controle negativo estão ilustrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura. O x em vermelho representa aquelas regiões que não foram validadas com sucesso através da RT-PCR.

Figura 32 - Representação do sítio de ligação predito para o miR-34 na 3'UTR dos genes *tim2* e *pdp1* de *A. mellifera* pelo programa RNAhybrid. A região codificadora dos genes está representada pelo retângulo preto maior. As posições dos nucleotídeos dos sítios de ligação para o miR-34, numeradas a partir do códon de parada, são mostradas na 3'UTR em amarelo. O fragmento amplificado da 3UTR através de RT-PCR contendo o sítio de interação com o miR-34 e o controle negativo estão ilustrados na imagem do gel de agarose em destaque na parte inferior da figura. O x em vermelho representa aquelas regiões que não foram validadas com sucesso através da RT-PCR.

A predição dos sítios de ligação do miR-34 nas regiões 3'UTR dos genes do relógio identificou 12 sítios: 2 para cada um dos genes *per*, *cwo*, *vri*, *tim2* e *pdp1*; e 1 sítio para cada um dos genes *cry-m* e *cyc*. Através da técnica de RT-PCR, conseguimos amplificar e validar experimentalmente 8 sítios: sítios 1 e 2 para o gene *per*; sítio 1 para o gene *cyc*; sítios 1 e 3 para o gene *cwo*; sítios 2 e 3 para o gene *vri*; e sítio 1 para o gene *pdp1* (Figura 30-32). Entre todos os sítios preditos e/ou validados para os genes do relógio, nenhum ainda havia sido estudado experimentalmente. Após a validação das 3'UTRS, seguimos com a clonagem daqueles sítios que foram validados com sucesso no vetor PSICHECK2 e após o processo de clonagem e purificação, confirmamos aqueles sítios que foram clonados com sucesso. Dentre eles, seis sítios foram clonados, sendo os sítios 3 para o gene *vri* e *cwo* os únicos que não tiveram seus insertos confirmados.

A partir dos fragmentos dos sítios de ligação para o miR-34 clonados com sucesso, seguimos então com o ensaio pela luciferase para verificar se essas interações entre miR-34 e gene alvo são verdadeiras. O ensaio da luciferase consistiu em transfectar células HEK293T com vetor PsiCHECK2 + 3'UTR e moléculas miméticas do miR-34. Na condição de o sítio de ligação para o miRNA ser verdadeiro, há menos síntese da proteína

luciferase e, portanto, menor intensidade de luminescência. O bom funcionamento do sistema desenvolvido para o ensaio de luciferase foi verificado com o uso do vetor contendo a sequência controle (controle positivo). A sequência controle consistia em uma sequência complementar ao miR-34 (Figura 33a e 34a). A molécula mimética do miR-34 foi capaz de reconhecer a sequência controle e causar a diminuição da síntese da luciferase e, conseqüentemente, a diminuição da intensidade da luminescência produzida. Uma vez verificada a eficácia da molécula mimética do miR-34 em reconhecer o sítio de ligação perfeito, bem como o funcionamento do ensaio da luciferase, realizamos os experimentos com os vetores PsiCHECK2 contendo fragmentos da 3'UTR dos genes *cyc*, *per*, *pdp1*, *vri* e *cwo* (Figura 33 - 34). Ressaltamos aqui, que utilizamos dois miRNAs miméticos como controle negativo em nossos experimentos, de acordo com a melhor resposta obtida para cada 3'UTR testada. Para os ensaios com os sítios preditos para os genes *cyc*, *pdp1* e *vri*, utilizamos como controle negativo uma sequência randômica de um nemátoda disponibilizada pela empresa que fornece o miRNA mimético, a qual não apresenta atividade biológica. Para os sítios dos genes *per* e *cwo*, utilizamos como controle negativo o miR-210, o qual se apresentou mais eficiente para as análises.

A partir do ensaio pela luciferase, conseguimos validar os sítios preditos nas regiões 3'UTRs dos genes *cyc* e *cwo*, onde verificamos que ocorreu a diminuição na intensidade da luminescência produzida pela luciferase. Os sítios preditos para as 3'UTRs dos genes *per*, *pdp1* e *vri* não responderam à presença do miR-34 mimético, o que sugere que estes sítios não sejam funcionais. Entretanto, verificamos que o sítio 2 testado para o gene *per* exibiu um aumento na intensidade da luminescência ao invés de queda.

Figura 33 - Validação dos sítios de ligação preditos para o miR-34 na 3'UTR dos genes do relógio *cyc* e *per* pelo ensaio da luciferase. Mudanças na razão da atividade da luciferase quimérica da Renilla (Ren) e da luciferase do vaga-lume (VL). A luciferase quimérica Ren está ligada a 3'UTR dos genes-alvo que contém os sítios de ligação preditos para o miR-34; (a) representação esquemática do controle positivo, pareamento perfeito com a sequência do miR-34; (b) a 3'UTR do gene *cyc*; (c) e (d) as 3'UTRs do gene *per*. Test-t, *: $p < 0,05$.

Figura 33 - Validação dos sítios de ligação preditos para o miR-34 na 3'UTR dos genes do relógio *pdp1*, *vri* e *cwo* pelo ensaio da luciferase. Mudanças na razão da atividade da luciferase quimérica da Renilla (Ren) e da luciferase do vaga-lume (VL). A luciferase quimérica Ren está ligada a 3'UTR dos genes-alvo que contém os sítios de ligação preditos para o miR-34; (a) representação esquemática do controle positivo, pareamento perfeito com a sequência do miR-34; (b) a 3'UTR do gene *pdp1*; (c) a 3'UTR do gene *vri* e (d) a 3'UTR do gene *cwo*. Test-t, *: $p < 0,05$.

Relatamos em nosso trabalho, pela primeira vez, através do ensaio por luciferase, que os genes *cyc* e *cwo* apresentam sítios de ligação para o miR-34 e que estes são funcionais. Estes resultados além de confirmarem as observações obtidas pela análise de expressão, sugerem fortemente que o miR-34 possa ser um dos miRNAs que atuam regulando negativamente os transcritos de *cyc* e *cwo*. Há poucos trabalhos na literatura que identificaram e validaram sítios de ligação dos miRNAs que estão presentes nos genes do relógio. Pelos nossos resultados, podemos observar que ambos *cyc*, *cwo* e miR-34 apresentam uma oscilação robusta em seus níveis de expressão em cabeças de abelhas com 25 dias de vida, o que sugere que este miRNA deve atuar modulando os transcritos de *cyc* e *cwo* de forma cíclica ao longo do dia. Ainda, vimos através da validação por qPCR que o gene *cyc* apresenta uma expressão inversa ao miR-34 em 38 horas do desenvolvimento embrionário, o que sugere que os elevados níveis do miR-34 podem estar regulando negativamente o *cyc* no momento em que ocorre a gastrulação. Chen et al. (2014) conseguiram demonstrar experimentalmente que o gene *cwo* apresenta um sítio de ligação para o miRNA let-7, além de sugerir que este miRNA regula a expressão do gene em questão através de um *feedback* autoregulatório que responde à sinalização dos ecdisteróides. Quando há elevados níveis de ecdisteróides em moscas, o miR let-7 é regulado positivamente e inibe a tradução dos transcritos de *cwo*, impedindo que este possa se ligar a região *e-box* de *per* e *tim* para ativar sua transcrição, competindo com o heterodímero CLK/CYC. Diante dos nossos resultados, nos questionamos se o miR-34 também poderia atuar regulando os níveis transcricionais de *cwo* dependente das vias hormonais, seja pelos ecdisteróides ou hormônio juvenil em abelhas. Os tratamentos realizados com o Hormônio Juvenil podem nos auxiliar a responder essas questões.

De forma curiosa, o sítio 2 predito para o gene *per* respondeu de forma inesperada ao habitual quando exposto ao miR-34 mimético, onde vimos que a atividade da luciferase aumentou ao invés de diminuir. Apesar do mecanismo de ação dos miRNAs ser bem documentado no sentido de ocasionar a repressão traducional ou clivagem do mRNA, alguns estudos têm evidenciado o possível papel desses pequenos RNAs em regular a expressão dos mRNAs de forma positiva. E entre esses estudos, já foi descrito que os miRNAs podem tanto induzir a expressão gênica se ligando a 5'UTR ou até mesmo à 3'UTR dos mRNAs alvos (Vasudevan et al. 2007; Ghosh et al. 2008; Ørom et al. 2008; Campos-Melo et al. 2013; Campos-Melo et al. 2014). Dessa forma, sugerimos que esta ativação por miRNAs não é um fenômeno incomum e que o miR-34 pode estar atuando no sentido de regular positivamente os níveis de *per* em *A. mellifera*. A validação das

interações entre os miRNAs e as 3`UTRs dos genes do relógio nos abre novas oportunidades para investigar como a regulação pós-transcricional pode interferir na modulação dos ritmos circadianos e afetar diversos processos fisiológicos tanto em insetos como outros organismos. Nesse sentido, adicionamos mais um elemento regulador, o miR-34, que deve participar da modulação dos genes do relógio em insetos.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho revelou que os genes do relógio biológico de abelhas são depositados maternalmente nos ovócitos e permanecem ativos desde o início da embriogênese e desenvolvimento larval até a vida adulta. Ao longo da vida da abelha, os genes do relógio biológico garantem o ajuste ideal dos ritmos circadianos para que diferentes processos fisiológicos aconteçam, desde a divisão celular no embrião, mudas larvais e pupais, até o comportamento e divisão do trabalho em operárias adultas. Neste processo, o sistema endócrino tem uma relação importante em afetar a expressão dos genes do relógio. Em adicional, os miRNAs atuam na manutenção dos ritmos circadianos ao longo de todo o desenvolvimento das abelhas.

6. REFERÊNCIAS

AHMAD, S. Tariq et al. Larval ethanol exposure alters free-running circadian rhythm and per Locus transcription in adult *D. melanogaster* period mutants. **Behavioural brain research**, v. 241, p. 50-55, 2013.

ANDRE, Elisabeth et al. Disruption of retinoid-related orphan receptor β changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice. **The EMBO journal**, v. 17, n. 14, p. 3867-3877, 1998.

ANTOCH, Marina P. et al. Functional Identification of the Mouse Circadian Clock Gene by Transgenic BAC Rescue. **Cell**, v. 89, n. 4, p. 655-667, 1997.

ASCHOFF, Jürgen. Comparative physiology: diurnal rhythms. **Annual review of physiology**, v. 25, n. 1, p. 581-600, 1963.

ASGARI, Sassan. MicroRNA functions in insects. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 4, p. 388-397, 2013.

ASHOK, Mudgapalli; TURNER, Christopher; WILSON, Thomas G. Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 2761-2766, 1998.

BALSALOBRE, Aurélio; DAMIOLA, Francesca; SCHIBLER, Ueli. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. **Cell**, v. 93, n. 6, p. 929-937, 1998.

BARGIELLO, Thaddeus A.; YOUNG, Michael W. Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 7, p. 2142-2146, 1984.

BARTEL, David P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **cell**, v. 136, n. 2, p. 215-233, 2009.

BELL-PEDERSEN, Deborah et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 7, p. 544-556, 2005.

BENNA, C. et al. A second timeless gene in *Drosophila* shares greater sequence similarity with mammalian tim. **Current biology**, v. 10, n. 14, p. R512-R513, 2000.

BENNA, Clara et al. *Drosophila* timeless2 is required for chromosome stability and circadian photoreception. **Current Biology**, v. 20, n. 4, p. 346-352, 2010.

BINKLEY, Sue A.; RIEBMAN, J. B.; REILLY, K. B. The pineal gland: a biological clock in vitro. **Science**, v. 202, n. 4373, p. 1198-1120, 1978.

BLOCH, Guy; TOMA, Dan P.; ROBINSON, Gene E. Behavioral rhythmicity, age, division of labor and period expression in the honey bee brain. **Journal of Biological Rhythms**, v. 16, n. 5, p. 444-456, 2001.

BLOCH, Guy; MESHI, Avital. Influences of octopamine and juvenile hormone on locomotor behavior and period gene expression in the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 193, n. 2, p. 181-199, 2007.

BLOCH, Guy. The social clock of the honeybee. **Journal of biological rhythms**, v. 25, n. 5, p. 307-317, 2010.

BLOCH, Guy; HAZAN, Esther; RAFAELI, Ada. Circadian rhythms and endocrine functions in adult insects. **Journal of insect physiology**, v. 59, n. 1, p. 56-69, 2013.

BOISSIN, J.; ASSENMACHER, I. Circadian rhythms in adrenal cortical activity in the quail. **Biological Rhythm Research**, v. 1, n. 3, p. 251-265, 1970.

BULL, James C. et al. A strong immune response in young adult honeybees masks their increased susceptibility to infection compared to older bees. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 12, p. e1003083, 2012.

CAMPOS-MELO, Danae et al. Altered microRNA expression profile in amyotrophic lateral sclerosis: a role in the regulation of NFL mRNA levels. **Molecular brain**, v. 6, n. 1, p. 26, 2013.

CAMPOS-MELO, Danae et al. Comprehensive luciferase-based reporter gene assay reveals previously masked up-regulatory effects of miRNAs. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 9, p. 15592-15602, 2014.

CHARLES, Jean-Philippe et al. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 52, p. 21128-21133, 2011.

CHAWLA, Geetanjali et al. A let-7-to-miR-125 microRNA switch regulates neuronal integrity and lifespan in Drosophila. **PLoS genetics**, v. 12, n. 8, p. e1006247, 2016.

CHEN, Cui Ping et al. Chronic ethanol consumption impairs the circadian rhythm of pro-opiomelanocortin and period genes mRNA expression in the hypothalamus of the male rat. **Journal of neurochemistry**, v. 88, n. 6, p. 1547-1554, 2004.

CHEN, Wenfeng et al. Regulation of Drosophila circadian rhythms by miRNA let-7 is mediated by a regulatory cycle. **Nature communications**, v. 5, p. 5549, 2014.

CHEN, Xiao; ROSBASH, Michael. mir-276a strengthens Drosophila circadian rhythms by regulating timeless expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 21, p. E2965-E2972, 2016.

CHIU, Joanna C. et al. The phospho-occupancy of an atypical SLIMB-binding site on PERIOD that is phosphorylated by DOUBLETIME controls the pace of the clock. **Genes & development**, v. 22, n. 13, p. 1758-1772, 2008.

COHEN, Barbara; SIMCOX, Amanda A.; COHEN, Stephen M. Allocation of the thoracic imaginal primordia in the Drosophila embryo. **Development**, v. 117, n. 2, p. 597-608, 1993.

COLLINS, Ben; BLAU, Justin. Even a stopped clock tells the right time twice a day: circadian timekeeping in Drosophila. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 454, n. 5, p. 857-867, 2007.

CRISTINO, A. S. et al. Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality. **Insect molecular biology**, v. 15, n. 5, p. 703-714, 2006.

CRISTINO, A. S. et al. Neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders represent an interconnected molecular system. **Molecular psychiatry**, v. 19, n. 3, p. 294, 2014.

CYRAN, Shawn A. et al. vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the Drosophila circadian clock. **Cell**, v. 112, n. 3, p. 329-341, 2003.

CYRAN, Shawn A. et al. The double-time protein kinase regulates the subcellular localization of the Drosophila clock protein period. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 22, p. 5430-5437, 2005.

DE F MICHELETTE, E. R.; SOARES, A. E. E. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v. 24, n. 4, p. 431-440, 1993.

DEKENS, Marcus PS; WHITMORE, David. Autonomous onset of the circadian clock in the zebrafish embryo. **The EMBO journal**, v. 27, n. 20, p. 2757-2765, 2008.

DIBNER, Charna; SCHIBLER, Ueli; ALBRECHT, Urs. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 517-549, 2010.

DI CARA, Francesca; KING-JONES, Kirst. How clocks and hormones act in concert to control the timing of insect development. **Curr Top Dev Biol**, v. 105, p. 1-36, 2013.

DIDIANO, Dominic; HOBERT, Oliver. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 13, n. 9, p. 849, 2006.

DIDIANO, Dominic; HOBERT, Oliver. Molecular architecture of a miRNA-regulated 3' UTR. **Rna**, v. 14, n. 7, p. 1297-1317, 2008.

DUBRUILLE, Raphaele; EMERY, Patrick. A plastic clock: how circadian rhythms respond to environmental cues in *Drosophila*. **Molecular neurobiology**, v. 38, n. 2, p. 129-145, 2008.

DUNLAP, Jay C. Molecular bases for circadian clocks. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 271-290, 1999.

DUNLAP, Jay C.; LOROS, Jennifer J.; DECOURSEY, Patricia J. **Chronobiology: biological timekeeping**. Sinauer Associates, 2004.

EBAN-ROTHSCHILD, Ada; SHEMESH, Yair; BLOCH, Guy. The colony environment, but not direct contact with conspecifics, influences the development of circadian rhythms in honey bees. **Journal of Biological Rhythms**, v. 27, n. 3, p. 217-225, 2012.

ELEKONICH, Michelle M. et al. Larval juvenile hormone treatment affects pre-adult development, but not adult age at onset of foraging in worker honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of insect physiology**, v. 49, n. 4, p. 359-366, 2003.

ELSIK, Christine G. et al. Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 86, 2014.

FASANARO, Pasquale et al. ROD1 is a seedless target gene of hypoxia-induced miR-210. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44651, 2012.

FERGUSON, Edwin L.; ANDERSON, Kathryn V. Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo. **Cell**, v. 71, n. 3, p. 451-461, 1992.

FREITAS, Flávia CP et al. MicroRNA-34 directly targets pair-rule genes and cytoskeleton component in the honey bee. **Scientific reports**, v. 7, p. 40884, 2017.

FU, Loning; LEE, Cheng Chi. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 350-361, 2003.

FUCHIKAWA, T. et al. Neuronal circadian clock protein oscillations are similar in behaviourally rhythmic forager honeybees and in arrhythmic nurses. **Open biology**, v. 7, n. 6, p. 170047, 2017.

GARCIA, Joseph A. et al. Impaired cued and contextual memory in NPAS2-deficient mice. **Science**, v. 288, n. 5474, p. 2226-2230, 2000.

GEORGE, H; TERRACOL, R. The vrille gene of Drosophila is a maternal enhancer of decapentaplegic and encodes a new member of the bZIP family of transcription factors. **Genetics**, v. 146, n. 4, p. 1345-1363, 1997.

GERY, Sigal et al. The circadian gene per1 plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. **Molecular cell**, v. 22, n. 3, p. 375-382, 2006.

GIEBULTOWICZ, Jadwiga M. et al. Transplanted Drosophila excretory tubules maintain circadian clock cycling out of phase with the host. **Current Biology**, v. 10, n. 2, p. 107-110, 2000.

GHOSH, Tanay et al. MicroRNA-mediated up-regulation of an alternatively polyadenylated variant of the mouse cytoplasmic β -actin gene. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 19, p. 6318-6332, 2008.

GOTTER, Anthony L. et al. A time-less function for mouse timeless. **Nature neuroscience**, v. 3, n. 8, p. 755, 2000.

GU, Hai-Feng et al. Adaptive evolution of the circadian gene timeout in insects. **Scientific reports**, v. 4, p. 4212, 2014.

GULLAN, Penny J.; CRANSTON, Peter S. **The insects: an outline of entomology**. John Wiley & Sons, 2014.

HALL, Jeffrey C. Genetics and molecular biology of rhythms in Drosophila and other insects. **Advances in genetics**, v. 48, p. 1-280, 2003.

HE, Ying et al. The transcriptional repressor DEC2 regulates sleep length in mammals. **Science**, v. 325, n. 5942, p. 866-870, 2009.

HANDLER, Alfred M.; KONOPKA, Ronald J. Transplantation of a circadian pacemaker in Drosophila. **Nature**, v. 279, n. 5710, p. 236, 1979.

HELFRICH-F, Charlotte. The neural basis of Drosophila's circadian clock. **Sleep and Biological Rhythms**, v. 4, n. 3, p. 224-234, 2006.

HOUL, Jerry H. et al. CLOCK expression identifies developing circadian oscillator neurons in the brains of Drosophila embryos. **BMC neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 119, 2008.

HUANG, Zhi-Yong; ROBINSON, Gene E. Social control of division of labor in honey bee colonies. In: **Information processing in social insects**. Birkh, Basel, 1999. p. 165-186.

HURSH, Deborah A.; PADGETT, Richard W.; GELBART, William M. Cross regulation of decapentaplegic and Ultrabithorax transcription in the embryonic visceral mesoderm of Drosophila. **Development**, v. 117, n. 4, p. 1211-1222, 1993.

IKENO, Tomoko et al. Photoperiodic diapause under the control of circadian clock genes in an insect. **BMC biology**, v. 8, n. 1, p. 116, 2010.

IMMERGL, Karin; LAWRENCE, Peter A.; BIENZ, Mariann. Induction across germ layers in Drosophila mediated by a genetic cascade. **Cell**, v. 62, n. 2, p. 261-268, 1990.

INGRAM, Krista K. et al. The molecular clockwork of the fire ant Solenopsis invicta. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e45715, 2012.

ITOH, Taichi Q.; TANIMURA, Teiichi; MATSUMOTO, Akira. Membrane-bound transporter controls the circadian transcription of clock genes in *Drosophila*. **Genes to Cells**, v. 16, n. 12, p. 1159-1167, 2011.

IWAI, Sachio et al. Structure and expressions of two circadian clock genes, period and timeless in the commercial silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of insect physiology**, v. 52, n. 6, p. 625-637, 2006.

JAMES, Anthony A. et al. Embryonic expression of the period clock gene in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. **The EMBO journal**, v. 5, n. 9, p. 2313-2320, 1986.

KADENER, Sebastian et al. Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. **Genes & development**, v. 21, n. 13, p. 1675-1686, 2007.

KADENER, Sebastian et al. A role for microRNAs in the *Drosophila* circadian clock. **Genes & development**, v. 23, n. 18, p. 2179-2191, 2009.

KENNAWAY, David J.; BODEN, Michael J.; VARCOE, Tamara J. Circadian rhythms and fertility. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 349, n. 1, p. 56-61, 2012.

KEWLEY, Robyn J.; WHITELAW, Murray L.; CHAPMAN-SMITH, Anne. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 2, p. 189-204, 2004.

KING, David P. et al. Positional cloning of the mouse circadian clockgene. **Cell**, v. 89, n. 4, p. 641-653, 1997.

KING, David P.; TAKAHASHI, Joseph S. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. **Annual review of neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 713-742, 2000.

KLOSS, Brian et al. The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I ϵ . **Cell**, v. 94, n. 1, p. 97-107, 1998.

KNAPEK, Stephan; SIGRIST, Stephan; TANIMOTO, Hiromu. Bruchpilot, a synaptic active zone protein for anesthesia-resistant memory. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 9, p. 3453-3458, 2011.

KO, Caroline H.; TAKAHASHI, Joseph S. Molecular components of the mammalian circadian clock. **Human molecular genetics**, v. 15, n. suppl_2, p. R271-R277, 2006.

KO, Hyuk Wan; JIANG, Jin; EDERY, Isaac. Role for Slimb in the degradation of *Drosophila* Period protein phosphorylated by Doubletime. **Nature**, v. 420, n. 6916, p. 673, 2002.

KONOPOVA, Barbora; JINDRA, Marek. Juvenile hormone resistance gene Methoprene-tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 25, p. 10488-10493, 2007.

KUHLMAN, Sandra J.; CRAIG, L. Michon; DUFFY, Jeanne F. Introduction to Chronobiology. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, p. a033613, 2017.

KRIEGSFELD, Lance J. et al. Circadian rhythms in the endocrine system. In: **Hormones, brain and behavior**. 2002. p. 33-91

KRÜGER, Jan; REHMSMEIER, Marc. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. **Nucleic acids research**, v. 34, n. suppl_2, p. W451-W454, 2006.

LAL, Ashish et al. miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to “seedless” 3' UTR microRNA recognition elements. **Molecular cell**, v. 35, n. 5, p. 610-625, 2009.

LAZZARI, Claudio R.; INSAUSTI, Teresita C. Circadian rhythms in insects. **ML Fanjul, Moles & RA Roblero (eds.), Comparative Aspects of Circadian Rhythms. Transworld Research Network**, v. 37, n. 661, p. 2, 2008.

LIN, Shu-Chun et al. PDP1, a novel Drosophila PAR domain bZIP transcription factor expressed in developing mesoderm, endoderm and ectoderm, is a transcriptional regulator of somatic muscle genes. **Development**, v. 124, n. 22, p. 4685-4696, 1997.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LIM, Chunghun et al. Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian-clock amplitude in Drosophila. **Current Biology**, v. 17, n. 12, p. 1082-1089, 2007.

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

LIU, Fang et al. Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in Apis mellifera: comparison between nurses and foragers. **Insect molecular biology**, v. 21, n. 3, p. 297-303, 2012.

LOURENÇO, Anete Pedro et al. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, Apis mellifera, by quantitative real-time RT-PCR. **Apidologie**, v. 39, n. 3, p. 372-385, 2008.

MACEDO, Liliane Maria Fróes et al. MicroRNA signatures characterizing caste-independent ovarian activity in queen and worker honeybees (Apis mellifera L.). **Insect molecular biology**, v. 25, n. 3, p. 216-226, 2016.

MATSUMOTO, Akira et al. A functional genomics strategy reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the Drosophila circadian clock. **Genes & development**, v. 21, n. 13, p. 1687-1700, 2007.

MENZEL, Randolph et al. The knowledge base of bee navigation. **Journal of Experimental Biology**, v. 199, n. 1, p. 141-146, 1996.

MESHI, A.; BLOCH, G. Monitoring circadian rhythms of individual honey bees in a social environment reveals social influences on postembryonic ontogeny of activity rhythms. **Journal of biological rhythms**, v. 22, n. 4, p. 343-355, 2007.

MIGEON, Claude J. et al. The diurnal variation of plasma levels and urinary excretion of 17-hydroxycorticosteroids in normal subjects, night workers and blind subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 16, n. 5, p. 622-633, 1956.

MIURA, Ken et al. Characterization of the Drosophila Methoprene-tolerant gene product. **The FEBS journal**, v. 272, n. 5, p. 1169-1178, 2005.

MOHAWK, Jennifer A.; GREEN, Carla B.; TAKAHASHI, Joseph S. Central and peripheral circadian clocks in mammals. **Annual review of neuroscience**, v. 35, p. 445-462, 2012.

MOORE, D. Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 8, p. 843-857, 2001.

MYERS, Michael P. et al. Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, timeless. **Science**, v. 270, n. 5237, p. 805-808, 1995.

NAGARI, Moshe; BLOCH, Guy. The involvement of the antennae in mediating the brood influence on circadian rhythms in “nurse” honey bee (*Apis mellifera*) workers. **Journal of insect physiology**, v. 58, n. 8, p. 1096-1103, 2012.

NICHOLAS, B. et al. Association of *Per1* and *Npas2* with autistic disorder: support for the clock genes/social timing hypothesis. **Molecular psychiatry**, v. 12, n. 6, p. 581-592, 2007.

OKAMURA, Hitoshi; YAMAGUCHI, Shun; YAGITA, Kazuhiro. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. **Cell and tissue research**, v. 309, n. 1, p. 47-56, 2002.

ØROM, Ulf Andersson; NIELSEN, Finn Cilius; LUND, Anders H. MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. **Molecular cell**, v. 30, n. 4, p. 460-471, 2008.

PAHL, Mario et al. Circadian timed episodic-like memory—a bee knows what to do when, and also where. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 20, p. 3559-3567, 2007.

PANDA, Satchidananda; HOGENESCH, John B.; KAY, Steve A. Circadian rhythms from flies to human. **Nature**, v. 417, n. 6886, p. 329, 2002.

PIRES, Camilla Valente et al. Transcriptome analysis of honeybee (*Apis Mellifera*) haploid and diploid embryos reveals early zygotic transcription during cleavage. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0146447, 2016.

PITTENDRIGH, Colin S. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1960. p. 159-184.

PLAUTZ, Jeffrey D. et al. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. **Science**, v. 278, n. 5343, p. 1632-1635, 1997.

PRICE, Jeffrey L. et al. double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. **Cell**, v. 94, n. 1, p. 83-95, 1998.

SAKAI, Takaomi et al. A clock gene, period, plays a key role in long-term memory formation in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 45, p. 16058-16063, 2004.

SHANNON, Paul et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

SHIN, Sang Woon et al. bHLH-PAS heterodimer of methoprene-tolerant and Cycle mediates circadian expression of juvenile hormone-induced mosquito genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 41, p. 16576-16581, 2012.

RACHINSKY, Anna et al. Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. **General and comparative endocrinology**, v. 79, n. 1, p. 31-38, 1990.

RALPH, CHARLES L. et al. A melatonin rhythm persists in rat pineals in darkness. **Endocrinology**, v. 89, n. 6, p. 1361-1366, 1971.

REPPERT, Steven M.; WEAVER, David R. Comparing clockworks: mouse versus fly. **Journal of Biological Rhythms**, v. 15, n. 5, p. 357-364, 2000.

REDDY, Pranhitha et al. Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. **Cell**, v. 38, n. 3, p. 701-710, 1984.

REDDY, Karen L. et al. The *Drosophila* PAR domain protein 1 (Pdp1) gene encodes multiple differentially expressed mRNAs and proteins through the use of multiple enhancers and promoters. **Developmental biology**, v. 224, n. 2, p. 401-414, 2000.

REDDY, Karen L. et al. The *Drosophila* Par domain protein I gene, Pdp1, is a regulator of larval growth, mitosis and endoreplication. **Developmental biology**, v. 289, n. 1, p. 100-114, 2006.

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

REINBERG, Alain; SMOLENSKY, Michael H. Introduction to chronobiology. In: **Biological rhythms and Medicine**. Springer, New York, NY, 1983. p. 1-21.

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

REMBOLD, H. et al. Juvenile hormone titers during honey bee embryogenesis and metamorphosis [Caste differentiation]. 1992.

RICHTER, K. Daily changes in neuroendocrine control of moulting hormone secretion in the prothoracic gland of the cockroach *Periplaneta americana* (L.). **Journal of insect physiology**, v. 47, n. 4-5, p. 333-338, 2001.

ROBINSON, Gene E. et al. Juvenile hormone titers in European and Africanized honey bees in Brazil. **General and Comparative Endocrinology**, v. 66, n. 3, p. 457-459, 1987.

ROBINSON, Gene E. et al. Hormonal and genetic control of behavioral integration in honey bee colonies. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 109-112, 1989.

ROBINSON, Gene E. Regulation of division of labor in insect societies. **Annual review of entomology**, v. 37, n. 1, p. 637-665, 1992.

RODRIGUEZ-ZAS, Sandra L. et al. Microarray analysis of natural socially regulated plasticity in circadian rhythms of honey bees. **Journal of Biological Rhythms**, v. 27, n. 1, p. 12-24, 2012.

ROENNEBERG, Till; MERROW, Martha. Life before the clock: modeling circadian evolution. **Journal of biological rhythms**, v. 17, n. 6, p. 495-505, 2002.

RUBIN, Elad B. et al. Molecular and phylogenetic analyses reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on the molecular evolution of the circadian clock. **Genome Research**, v. 16, n. 11, p. 1352-1365, 2006.

RUIZ, Santiago et al. Spatio-temporal pattern of cells expressing the clock genes period and timeless and the lineages of period expressing neurons in the embryonic CNS of *Drosophila melanogaster*. **Gene Expression Patterns**, v. 10, n. 6, p. 274-282, 2010.

RUTHERFORD, Kim et al. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v. 16, n. 10, p. 944-945, 2000.

SAKURAI, Sho; KAYA, Masae; SATAKE, Shin'ichirol. Hemolymph ecdysteroid titer and ecdysteroid-dependent developmental events in the last-larval stadium of the silkworm, *Bombyx mori*: role of low ecdysteroid titer in larval-pupal metamorphosis and a reappraisal of the head critical period. **Journal of insect physiology**, v. 44, n. 10, p. 867-881, 1998.

SANDRELLI, F. et al. Comparative analysis of circadian clock genes in insects. **Insect molecular biology**, v. 17, n. 5, p. 447-463, 2008.

SANGORAM, Ashvin M. et al. Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. **Neuron**, v. 21, n. 5, p. 1101-1113, 1998.

SAUNDERS, David Stanley. **Insect clocks**. Elsevier, 2002.

SEEHUUS, Siri-Christine; KREKLING, Trygve; AMDAM, Gro V. Cellular senescence in honey bee brain is largely independent of chronological age. **Experimental gerontology**, v. 41, n. 11, p. 1117-1125, 2006.

SHEEBA, Vasu. The *Drosophila melanogaster* circadian pacemaker circuit. **Journal of genetics**, v. 87, n. 5, p. 485-493, 2008.

SHEMESH, Yair; COHEN, Mira; BLOCH, Guy. Natural plasticity in circadian rhythms is mediated by reorganization in the molecular clockwork in honeybees. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 10, p. 2304-2311, 2007.

SONI, Kartik et al. miR-34 is maternally inherited in *Drosophila melanogaster* and *Danio rerio*. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 8, p. 4470-4480, 2013.

SUN, Zhong Sheng et al. RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. **Cell**, v. 90, n. 6, p. 1003-1011, 1997.

SUN, Zuoming et al. Requirement for ROR γ in thymocyte survival and lymphoid organ development. **Science**, v. 288, n. 5475, p. 2369-2373, 2000.

SZUPLEWSKI, Sébastien; KOTTLER, Benjamin; TERRACOL, Régine. The *Drosophila* bZIP transcription factor Vrille is involved in hair and cell growth. **Development**, v. 130, n. 16, p. 3651-3662, 2003.

TAKAHATA, Sho et al. Transactivation mechanisms of mouse clock transcription factors, mClock and mArnt3. **Genes to Cells**, v. 5, n. 9, p. 739-747, 2000.

TAKUMI, Toru et al. A mammalian ortholog of *Drosophila* timeless, highly expressed in SCN and retina, forms a complex with mPER1. **Genes to Cells**, v. 4, n. 1, p. 67-75, 1999.

TAMAI, T. Katherine et al. Early embryonic light detection improves survival. **Current Biology**, v. 14, n. 3, p. R104-R105, 2004.

TEI, Hajime et al. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. **Nature**, v. 389, n. 6650, p. 512-516, 1997.

TOMA, Dan P. et al. Changes in period mRNA levels in the brain and division of labor in honey bee colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 12, p. 6914-6919, 2000.

TOMIOKA, Kenji; MATSUMOTO, Akira. A comparative view of insect circadian clock systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 9, p. 1397-1406, 2010.

TSANG, Anthony H.; BARCLAY, Johanna L.; OSTER, Henrik. Interactions between endocrine and circadian systems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 52, n. 1, p. R1-R16, 2014.

TUREK, Fred W. et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1043-1045, 2005.

UNDERWOOD, Herbert; GROOS, Gerard. Vertebrate circadian rhythms: retinal and extraretinal photoreception. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 38, n. 9, p. 1013-1021, 1982.

URYU, Outa; AMEKU, Tomotsune; NIWA, Ryusuke. Recent progress in understanding the role of ecdysteroids in adult insects: Germline development and circadian clock in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Zoological letters**, v. 1, n. 1, p. 32, 2015.

VASUDEVAN, Shobha; TONG, Yingchun; STEITZ, Joan A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1931-1934, 2007.

VELLA, Monica C. et al. The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3' UTR. **Genes & development**, v. 18, n. 2, p. 132-137, 2004.

XING, Weiman et al. SCF FBXL3 ubiquitin ligase targets cryptochromes at their cofactor pocket. **Nature**, v. 496, n. 7443, p. 64, 2013.

YANG, Maocheng et al. Circadian regulation of a limited set of conserved microRNAs in *Drosophila*. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 83, 2008.

YOO, Seung-Hee et al. PERIOD2: LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 15, p. 5339-5346, 2004.

YOO, Seung-Hee et al. Competing E3 ubiquitin ligases govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm. **Cell**, v. 152, n. 5, p. 1091-1105, 2013.

YU, Wangjie; HARDIN, Paul E. Circadian oscillators of *Drosophila* and mammals. **Journal of cell science**, v. 119, n. 23, p. 4793-4795, 2006.

YUAN, Quan et al. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. **Molecular biology and evolution**, v. 24, n. 4, p. 948-955, 2007.

ZEHRING, William A. et al. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. **Cell**, v. 39, n. 2, p. 369-376, 1984.

ZERA, Anthony J.; ZHAO, Zhangwu. Morph-associated JH titer diel rhythm in *Gryllus firmus*: Experimental verification of its circadian basis and cycle characterization in artificially selected lines raised in the field. **Journal of insect physiology**, v. 55, n. 5, p. 450-458, 2009.

ZHANG, Ray et al. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 45, p. 16219-16224, 2014.

ZHAO, Zhangwu; ZERA, Anthony J. The hemolymph JH titer exhibits a large-amplitude, morph-dependent, diurnal cycle in the wing-polymorphic cricket, *Gryllus firmus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, n. 1, p. 93-102, 2004.

ZHENG, Xiangzhong; SEHGAL, Amita. Probing the relative importance of molecular oscillations in the circadian clock. **Genetics**, v. 178, n. 3, p. 1147-1155, 2008.

ZIV, Limor; GOTHILF, Yoav. Period2 expression pattern and its role in the development of the pineal circadian clock in zebrafish. **Chronobiology international**, v. 23, n. 1-2, p. 101-112, 2006.

WAGER-SMITH, Karen; KAY, Steve A. Circadian rhythm genetics: from flies to mice to humans. **Nature genetics**, v. 26, n. 1, p. 23, 2000.

WAGH, Dhananjay A. et al. Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. **Neuron**, v. 49, n. 6, p. 833-844, 2006.

WANG, Bo et al. Adaptive evolution of vertebrate-type cryptochrome in the ancestors of Hymenoptera. **Biology letters**, v. 9, n. 1, p. 20120958, 2013.

WEBER, Frank et al. Post-translational timing mechanisms of the *Drosophila* circadian clock. **FEBS letters**, v. 585, n. 10, p. 1443-1449, 2011.

WEINERT, Heike et al. Impaired expression of the mPer2 circadian clock gene in the suprachiasmatic nuclei of aging mice. **Chronobiology international**, v. 18, n. 3, p. 559-565, 2001.

WEINSTOCK, George M. et al. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. 2006.

WEITZMAN, Elliot D. et al. Chronobiology of aging: temperature, sleep-wake rhythms and entrainment. **Neurobiology of aging**, v. 3, n. 4, p. 299-309, 1982.

WHARTON, Kristi A.; RAY, Robert P.; GELBART, William M. An activity gradient of decapentaplegic is necessary for the specification of dorsal pattern elements in the *Drosophila* embryo. **Development**, v. 117, n. 2, p. 807-822, 1993.

WHITMORE, David et al. Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. **Nature neuroscience**, v. 1, n. 8, p. 701-707, 1998.

WINSTON, Mark L. **The biology of the honey bee**. harvard university press, 1991.

WISOR, Jonathan P. et al. A role for cryptochromes in sleep regulation. **BMC neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 20, 2002.

WOŹNICKA, Olga et al. BRP-170 and BRP190 isoforms of bruchpilot protein differentially contribute to the frequency of synapses and synaptic circadian plasticity in the visual system of *Drosophila*. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, p. 238, 2015.

WURM, Yannick et al. The genome of the fire ant *Solenopsis invicta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 14, p. 5679-5684, 2011.

7. ANEXOS

7.1. Anexo A

Ontologia gênica para órtologos de genes de *D. melanogaster* que realizam interações proteína-proteína com os *clock genes*. A ontologia gênica foi realizada a partir das ferramentas online Gene Ontology Consortium e PANTHER com $p \leq 0.05$. A) Processo Biológico; B) Função molecular.

7.2. Anexo B

Ontologia gênica para órtologos de genes de *M. musculus* que realizam interações proteína-proteína com os *clock genes*. A ontologia gênica foi realizada a partir das ferramentas online Gene Ontology Consortium e PANTHER com $p \leq 0.05$. A) Processo Biológico; B) Função molecular

7.3. Anexo C

Efeitos do tratamento com o Hormônio Juvenil na expressão do gene do relógio *per* em pupas de olho branco de *A. mellifera* após 1, 1:30 e 24h de aplicação tópica diretamente no tórax. A figura mostra que os níveis de *per* foram afetados no controle em que foi utilizada a acetona, o diluente do hormônio juvenil. * diferente do controle com acetona ** diferente do HJ.

7.4. Anexo D

Os resultados obtidos a partir das análises realizadas durante o desenvolvimento adulto de operárias de *A. mellifera* nos permitiram elaborar o manuscrito “*Circadian clock genes are differentially modulated during the daily cycles and chronological age in the social honeybee (Apis mellifera)*”, o qual foi submetido durante o desenvolvimento deste projeto, sendo aceito e publicado na revista online *Apidologie* (DOI: [10.1007/s13592-017-0558-7](https://doi.org/10.1007/s13592-017-0558-7)). Neste artigo, também estão compreendidas as redes de interação miRN-mRNA e proteína-proteína.

Circadian clock genes are differentially modulated during the daily cycles and chronological age in the social honeybee (*Apis mellifera*)

Fabiano C. P. ABREU¹, Flávia C. P. FREITAS¹, Zilá L. P. SIMÕES²

¹Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

²Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

Received 19 July 2017 – Revised 9 November 2017 – Accepted 6 December 2017

Abstract – The circadian clock is an advantageous adaptive system that enables organisms to predict and anticipate the daily environmental changes. The circadian rhythms are generated molecularly through the expression of clock genes, based on autoregulatory feedback loops. Honeybees are an excellent model to investigate how the circadian rhythms are modulated accordingly to the social context, behavioral plasticity, and task-related activities. Here, we show how the clock genes behave during the daily cycles in adult worker heads of *Apis mellifera*. Our results point to the clock genes *period* and *cryptochrome* as essential regulators of the circadian rhythms associated to the behavioral maturation in this social insect. We also identified putative miRNA-target and protein-protein interactions involving honeybee clock genes, indicating regulatory networks behind the adjustment of the molecular clock.

circadian clock / clock genes / circadian rhythms / honeybees / miRNAs

1. INTRODUCTION

Temporal coordination of diverse physiological and behavioral processes allows organisms to adapt to environmental daily cycles. Internal clocks behind the temporal coordination process orchestrate the expression of specific genes and generate circadian rhythms, resulting in cyclic biological activities around the 24-h period (Dunlap et al. 2004; Bell-Pedersen et al. 2005). The molecular clockwork is highly conserved throughout evolution, and the ongoing

identification of their molecular components reveals remarkable similarities and differences between vertebrates, invertebrates, and plants (Reppert and Weaver 2000; Young and Kay 2001; Vansteensel et al. 2008).

Circadian rhythms in insects are well known and a wide range of studies demonstrated their intimate relationship with physiological processes as eclosion, ovoposition, ecdysis, metamorphosis, locomotor activity, behavior, and mating (reviewed by Saunders et al. 2002). Comparative analysis within insects from different orders revealed differences in the neuroanatomy of the circadian clock, genetic components, and modes of regulation of the circadian rhythms (Sandrelli et al. 2008; Tomioka and Matsumoto 2010). Interestingly, the molecular clock of honeybees and ants is more similar to mammals than to *Drosophila melanogaster* (Rubin et al. 2006; Weinstock et al. 2006; Ingram et al. 2012; Sadd et al. 2015). The honeybee *cryptochrome* (*cry-m*), for

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13592-017-0558-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Corresponding author: F. Abreu,

fabiano.genetica@usp.br

Manuscript editor: Klaus Hartfelder

example, is an ortholog to its correspondent in mammals and is absent in *Drosophila* genome (Rubin et al. 2006).

The molecular studies of the clockwork genes on *D. melanogaster* and *Mus musculus* (reviewed by Panda et al. 2002) and their expression pattern (Rubin et al. 2006) were the references for the construction of the theoretical knowledge on clockwork genes of *Apis mellifera*. It consists in autoregulatory feedback loops caused through the oscillatory expression of canonical clock genes in groups of neurons in the central nervous system (Bloch et al. 2003; Rubin et al. 2006; Fuchikawa et al. 2017). Molecular and phylogenetic analyses identified eight clock genes in *Apis mellifera*: *period* (*per*), *cryptochrome* (*cry-m* or *mammalian-type cry*), *clock* (*clk*), *cycle* (*cyc*), *timeout 2* (*tim2*), *par domain protein 1* (*pdp1*), *vrille* (*vri*), and *clockwork orange* (*cwo*) (Weinstock et al. 2006; Rubin et al. 2006; Rodriguez-Zas et al. 2012). The autoregulatory cycle starts with the formation of the heterodimer CLK/CYC that binds to regulatory sequences and activates the expression of *per* and *cry-m*. The products of *per* and *cry-m* accumulate at night in the cytoplasm of oscillatory neurons and act as negative elements forming the heterodimer PER/CRY-m that enters the nucleus and prevents their own expression binding to CLK/CYC heterodimer (Rubin et al. 2006). The functional domains of VRI and PDP1 are highly conserved to *D. melanogaster* domains. In honeybees, *clk* and *cyc* present putative binding sites for both VRI and PDP1, suggesting another autoregulatory feedback loop (Cyran et al. 2003; Rubin et al. 2006; Bloch 2010). The role of *cwo* and *tim2* in the modulation of the circadian rhythms in Hymenoptera is still unknown. Beyond the canonical clock genes, hundreds of transcripts exhibit circadian oscillations around the zeitgeber in brains of nurses and foragers of honeybees reflecting the clock-controlled genes (Rodriguez-Zas et al. 2012).

The post-transcriptional regulation performed by microRNAs also plays an important role in modulating the oscillatory expression of clock genes (Kojima et al. 2011, Luhur et al. 2013).

MicroRNAs were found to be rhythmic in *Drosophila* brain, mouse CNS, mouse retina, and *Arabidopsis*, and some of them are directly involved in modulating the circadian period and response to light (Cheng et al. 2007, Xu et al. 2007, Jung et al. 2007, Yang et al. 2008, Sire et al. 2009, Kadener et al. 2009). In honeybees, a set of microRNAs were identified as involved in caste determination (Weaver et al. 2007; Chen et al. 2010; Ashby et al. 2016), memory and learning (Cristino et al. 2014; Qin et al. 2014), foraging (Behura and Whitfield 2010; Liu et al. 2012a, b), embryogenesis (Pires et al. 2016; Freitas et al. 2017), and reproductive status (Macedo et al. 2016). However, there are no studies showing whether miRNAs affect the circadian system in honeybees.

Due to highly organized society, extraordinary cognitive capacity, and complex behavior, honeybees are an excellent model to investigate how the circadian rhythms can be influenced by the social interactions (Meshi and Bloch 2007; Bloch 2010; Shemesh et al. 2010; Eban-Rothschild et al. 2012; Nagari and Bloch 2012). The social synchronization is as important as light and temperature to entrain the clock of honeybees, and adult workers can exhibit different activity rhythms depending on the colony ambient and contact to conspecifics (Frisch and Koeniger 1994; Nagari and Bloch 2012; Fuchikawa et al. 2016). Further, the behavioral plasticity of honeybees associated to the division of labor is thought to be closely related to modulation of circadian rhythms (Bloch et al. 2001; Shemesh et al. 2007; Shemesh et al. 2010). Here, we tested if the daily oscillation of canonical clock genes changes in workers with different ages by assessing the expression profiles of the genes *per*, *cry-m*, *clk*, *cyc*, *cwo*, *tim2*, *vri*, and *pdp1* in heads of young (3- and 7-day-old) and old (15- and 25-day-old) bees. We used computational analysis to predict microRNAs as regulators of clock genes and to rebuild a protein interaction network that illustrates the physical interactions between the products of the canonical clock genes and other proteins. Our aim was to show how the circadian rhythm plasticity is related to the

complex behavior of honeybees through clock gene expression in a special colony, using an Africanized *A. mellifera* population from a tropical region. Studies focused on the molecular clock of social insects certainly will shed light on how the eusociality could be related to the evolution of internal clocks.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Bee samples

We worked with experimental colonies in the “single-cohort colony” model, which allow us the control of the adulthood, behavioral maturation, and sample bees of the same age. We removed honeycomb frames containing pupae, close to eclosion, from source colonies of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) from the experimental apiary of the Department of Genetics at the Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Ribeirão Preto, Brazil) and transferred them to dark incubator (32 ± 0.5 °C, $55 \pm 5\%$ relative humidity) to obtain emerging bees with 0–24 h. Approximately 1500 newly emerged worker bees were paint-marked on the thorax and introduced in an experimental observation hive provided with a virgin queen and a frame with pollen, honey, brood, and empty cells where the queen could lay eggs. The observation hive was kept in a dark room (to prevent light stimulation) with constant temperature (28 °C ± 1). An exit was built in the experimental hive so that the bees could fly away from the hive, collect food (forage), and experience the sunlight. Worker bees with 3, 7, 15, and 25 days old were collected at four zeitgeber times (7, 12, 17, 22 h) under red light. Sampled bees ($n = 3$ –5 per zeitgeber time) were individually immersed in liquid nitrogen and had their entire heads collected for subsequent extraction of total RNA. The sampling procedure was performed from September to October, during the spring. We kept the colony in the absence of light as soon as we started the experiment and did not use an artificial light-dark (LD) regime to synchronize the colony population. However, the colony was susceptible to be socially

synchronized by free-flying foragers that experienced the sunlight outside, so as by the nurse bees during the experimental flies.

2.2. RNA extraction for mRNA expression profile

Total RNA was extracted from entire heads of individually sampled bees using Trizol reagent (Invitrogen) accordingly to the manufacturer protocol. The extracted RNA was treated with RNase-free DNase (DNase I Amplification Grade—Invitrogen), and the total RNA was quantified using the NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer V3.03 (NanoDrop Technologies).

For mRNA expression analysis, an aliquot of 1.5 µg of total RNA was reverse transcribed using an oligoDT and the specific enzyme SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 U/µL, Invitrogen), as described by the manufacturer. Specific oligonucleotides were designed for *per*, *cry-m*, *clk*, *cyc*, *tim2*, *cwo*, *pdp1*, and *vri* using Primer3 tool (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) and validated through qPCR standard curve method (Livak and Schmittgen 2001) to evaluate their efficiency. Oligonucleotide sequences are listed in Supplemental Table S1. RT-cDNA samples were used as templates for qPCR amplification of the clock genes with the SYBR® Green Master Mix 2× (Applied Biosystems) and 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems). The gene expression was normalized against the *ribosomal protein L32* (*rpl32*), as suggested by Lourenço et al. (2008) and calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen 2001). Statistical analyses were performed using the one-way ANOVA test and Tukey’s pairwise comparison ($p < 0.05$).

2.3. Gene regulatory network for miRNA-mRNA interactions

We selected a region of 1000 pb downstream to the stop codon of clock genes to represent the 3’ UTR and performed the search for miRNA binding sites using the RNAhybrid tool (Kruger and Rehmsmeier 2006). We selected this parameter because the sequences of untranslated regions (5’ and 3’ UTRs) are not available for every gene in

the current version of honeybee genome (The Honeybee Genome Sequencing Consortium 2006; Elsik et al. 2014). To reduce false-positive miRNA-target interactions, we performed the search for miRNA binding sites in 3' UTRs of *Drosophila* genes and considered for further analysis the miRNA-target interactions conserved in both species. This approach has proven to be efficient in detecting functional miRNA-binding sites in honeybees as demonstrated by publications of our group (Cristino et al. 2014; Freitas et al. 2017). We considered only the interactions that are based on the seed region of miRNAs (2-7nt), free energy ≤ -20 Kcal/mol, and p value < 0.05 .

2.4. Protein-protein interaction network

To build a putative protein-protein interaction (PPi) network, we retrieved proteins that interact with clock genes in *Drosophila* and *Mus musculus* from BioGrid repository (version 3.4.138) (Chatr-aryamontri et al. 2017). The PPis involving conserved genes in honeybee were used to build a PPi network using Cytoscape tool, version 3.4.0 (Shannon et al. 2003). Functional analysis of PPi network was carried out based on information available at GeneOntology Consortium (www.geneontology.org), PANTHER Classification System (www.phantherdb.org) ($p \leq 0.05$), and FlyBase (www.flybase.org).

3. RESULTS

3.1. Chronological and daily patterns of clock gene expression during the adult development of *A. mellifera*

Our quantitative PCR (qPCR) analysis revealed that the clock genes *per*, *cry-m*, *clk*, *cyc*, *tim2*, *pdp1*, *vri*, and *cwo* are expressed in heads of adult workers in the chronological ages of *A. mellifera* (Figure 1). The clock genes *per*, *cry-m*, and *cwo* exhibited a similar expression pattern showing higher transcriptional levels in heads of old bees (25-day-old) compared to younger bees. Conversely, the clock gene *pdp1* showed an opposite expression pattern, with higher transcriptional

levels in the heads of young bees (3-day-old) compared to older bees. The average transcriptional levels of *clk* were higher in heads of 25-day-old bees compared to 3- and 15-day-old bees, but showed no significant differences related to 7-day-old bees. For *cyc* and *vri*, 15-day-old bees showed differences in their average transcriptional levels compared to 3-day-old and 7-day-old bees, respectively. The average transcriptional levels of *tim2* did not vary with different ages.

Daily expression patterns of clock genes in heads are evident in at least one chronological age. Based on the amplitude of the expression profile variation, we classified the transcriptional oscillations as absent, present, or attenuated present (Figures 2 and 3). Transcriptional oscillations of *per* and *cry-m* within a day were absent or attenuated present in young bees (3- and 7-day-old) and showed high amplitude in older bees (15- and 25-day-old). Both *per* and *cry-m* presented peaks of expression at the beginning of the day (7 h) and in the middle of the dark phase (22 h) in the heads of 15-day-old bees. In 25-day-old bees, we observed a peak of expression of *per* and *cry2* in the dark phase (22 h). For *clk*, we found a clear transcriptional oscillation in heads of 25-day-old bees with one peak at the light phase (12 h) and another at the dark phase (22h) (Figure 2 (b)). For *cyc*, the transcriptional oscillation was more attenuated in the young bees and similar to *clk* oscillation in 25-day-old bees.

Interestingly, *pdp1* showed a strong daily oscillation in heads of young bees (3-day-old) compared to *vri*, while the opposite was observed for *vri* in old bees (25-day-old) (Figure 3 (a)). Both *pdp1* and *vri* showed peaks of expression in the light phase of the day (12 h). For *cwo*, we observed transcriptional oscillations in heads of 3-, 15-, and 25-day-old bees (Figure 3 (c)). A peak of *cwo* expression was observed at the light phase (17 h) in heads of 3-day-old and 15-day-old bees, what implies a circadian oscillation at these ages. In 25-day-old bees, the levels of *cwo* are high in the light phase (17 h) and reach a peak of expression at the dark phase (22 h). Transcriptional oscillation of *tim2* was absent within a day

Figure 1. Transcriptional levels of clock genes during the chronological age in worker heads of *A. mellifera*. qPCR was used to obtain the relative gene expression which was normalized to the endogenous gene *rpl32* through the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. For each adult age, we used the mean expression of clock genes in heads of three to five individuals calculated from each time point collected during the day. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA, followed by Tukey's pairwise comparison, $p < 0.05$.

during the chronological age of worker bees (Figure 3 (b)).

3.2. Interaction networks

Our computational analysis revealed that the clock genes *per*, *cry-m*, *clk*, *cyc*, *tim2*, *pdp1*, *vri*, and *cwo* exhibited putative binding sites in their 3' UTR that are supposed to interact with miRNAs in *A. mellifera*. Due to the high number of miRNA-mRNA interactions recovered by our analysis and taking into account that computational predictions for binding sites of miRNAs can generate false-positive results, we selected miRNAs previously listed in other insects and with a possible role in regulating circadian and

neuronal functions at least in *D. melanogaster*. We reconstructed a miRNA-mRNA network using interactions predicted in both species (Figure 4a). The results point to potential miRNAs to regulate the clock genes that are well studied in fruit flies or reported to be involved in honeybee developmental processes, like *let-7*, *miR-8*, *miR-9a*, *miR-34*, *miR-124*, and *bantam*.

We found physical interactions for the clock genes *per*, *cry-m*, *clk*, *cyc*, *tim2*, *pdp1*, and *vri* based on curated data for orthologs in *D. melanogaster* and *M. musculus*. Based in our protein-protein interaction network (Figure 4b), we searched for gene ontology ($p \leq 0.05$) (Supplemental Figure S1) and found biological processes linked to cellular, metabolic, and

Figure 2. Daily expression patterns of clock genes *per* and *cry-m* (a) and *clk* and *cyc* (b), involved in a first autoregulatory feedback loop, during the chronological age in worker heads of *A. mellifera*. qPCR was used to obtain the relative gene expression which was normalized to the endogenous gene *rpl32* through the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Each zeitgeber time represents the mean expression in heads of three to five individuals. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA, followed by Tukey's pairwise comparison, $p < 0.05$. * or # different from 7 h, ** or ## different from 12 h, *** or ### different from 17 h. Black and white bars at the bottom reflect the sunlight hours with dark and light daily phases, respectively.

developmental regulation, mainly related to enzymatic, catalytic, and structural activities.

4. DISCUSSION

In this work, we analyzed the chronological and daily patterns of clock gene expression in heads of *A. mellifera* using four different adult ages representing young (3- and 7-day-old) and old (15- and 25-day-old) bees living in a single-cohort colony. The characteristics of a single-cohort colony as same-aged bees made possible to test the expression of clock genes are influenced by the chronological age and/or behavior. Our analysis showed that the average daily expression of *per* is higher in heads of old bees (25-day-old) compared to young bees (3- and 7-day-old) (Figure 1), consistent with Toma et al. (2000). In addition, our analysis pointed to higher daily expression of *per* in heads of 25-day-old bees compared to 15-day-old bees. We observed these same features for *cry-m* and *cwo*, which have not been demonstrated before. The higher

transcriptional levels of *per*, *cry-m*, and *cwo* in heads of 25-day-old bees may be related to the intense forager activity that depends on strong circadian rhythmicity. A previous study did not observe differences in the expression level of *per* in brains of young bees (8- to 10-day-old) compared to old bees (23- to 25-day-old) using single-cohort colonies (Bloch et al. 2001). Although it seems contradictory, other findings support that expression levels of *per* transcripts in the central nervous system of worker bees are not strictly linked to their chronological age but depend on other factors such as precocious foraging, a characteristic of both single-cohort colonies reared in field or laboratory (Toma et al. 2000; Bloch et al. 2001). In our analysis, average daily expression of *per*, *cry-m*, and *cwo* in heads of young bees (3–7-day-old) compared to potential foragers (15-day-old) showed no difference (Figure 1). The absence of foragers in the initial population of our single-cohort colony (composed of newly emerged workers) likely affects *per*, *cry-m*, and *cwo* mRNA levels, and the expression of these genes

Circadian clock genes of honeybees

Figure 3. Daily expression patterns of clock genes *pdp1* and *vri* (a), *tim2* (b), and *cwo* (c) during the chronological age in worker heads of *A. mellifera*. qPCR was used to obtain the relative gene expression which was normalized to the endogenous gene *rpl32* through the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Each zeitgeber time represents the mean expression in heads of three to five individuals. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA, followed by Tukey's pairwise comparison, $p < 0.05$. * or # different from 7 h, ** or ## different from 12 h, *** or ### different from 17 h. Black and white bars at the bottom reflect the sunlight hours with dark and light daily phases, respectively.

reaches higher levels earlier in adult life as a signal to prepare young bees to forage. We did not find variation in the average levels of *per*, *cry-m*, and *cwo* comparing 15-day-old bees and 3–7-day-old bees; nonetheless, we observed a striking difference between their daily transcriptional fluctuation in heads at least for *per* and *cry-m* (Figure 2 (a)). An absence or attenuated oscillation in daily expression of both genes found in young bees compared to the strong oscillation in old bees is consistent with other studies (Bloch et al. 2001; Shemesh et al. 2007). Our results suggest that the expression levels of *per* and *cry-m* are associated with the behavioral plasticity in honeybees and that the oscillations in their expression reflect the division of labor between young and old bees. While young bees (nurses) work arrhythmically

around the clock inside the colony in brood-care activities, old bees (foragers) need to be strongly rhythmic to develop complex tasks as foraging, sun navigation, learning, memory, and dance language. In contrast, Fuchikawa et al. (2017) found that the oscillation on protein levels of *per* is similar in brains of behaviorally rhythmic foragers and arrhythmic nurses. This observation in soma with our analysis suggests that cycling on proteins levels does not require cycling of the transcripts in arrhythmic nurses. Taken together, our analysis supports the idea that the ontogeny of circadian rhythms is closely linked to the division of labor in social insects and transcriptional levels of *per* and *cry-m*. Our results point to the clock genes *per* and *cry-m* as candidate molecular markers of behavioral maturation in honeybees.

Figure 4. a miRNA-mRNA interaction network. The network illustrates the putative miRNAs that were predicted to bind to 3' UTRs in transcripts of clock genes in the genome of *A. mellifera*. The prediction was based on previously determined parameters ($\Delta G \leq -20$ Kcal/mol; p value < 0.05). White nodes and gray nodes represent the predicted miRNAs and the target clock genes, respectively. **b** Protein-protein interaction network representing the putative physical interactions between clock genes and other proteins in *A. mellifera*. The analysis was based on curated data available for *D. melanogaster* and *M. musculus* in the BioGRID online tool (<http://thebiogrid.org/>). Physical interactions based on orthology with *D. melanogaster* correspond to orange nodes linked to clock genes *per*, *cyc*, *clk*, and *vri* (gray nodes). Interactions based on orthology with *M. musculus* represent the green nodes linked to clock genes *cry-m* and *tim2* (gray nodes).

Noteworthy, expression levels of *clk* do not oscillate within a day in young bees (3- or 7-day-old) but it does oscillate in old bees (25-day-old). Our data contrasts to a previous study that reported absence of oscillation in *clk* in forager bees (Rubin et al. 2006). The daily transcriptional levels of *cyc* are synchronized with *clk* in 25-day-old bees and it is unlikely that the moderate oscillations observed are due to the circadian influence. In mammals, *tim2* is expressed in retinoid cells, which indicates that this gene is related to photoreceptor function (Sangoram et al. 1998; Takumi et al. 1999). In another Hymenoptera, *Ceratosolen solmsi*, *tim2* has an arrhythmical expression in males that live inside the syconium of flowers in the absence of light. In young females that leave the syconium earlier, *tim2* showed a rhythmic expression around the day, suggesting that the oscillation of this gene is light dependent (Gu et al. 2014). However, our data show that *tim2* did not fluctuate during all the chronological age of worker bees (Figure 3 (b)). This result is in accordance with those reported by Rubin et al. (2006). Further experiments are

necessary to address how *tim2* participates in the circadian mechanism in honeybees.

Here, we showed for the first time the expression profiles of *vri* and *pdp1* in heads of honeybees. Besides the classical role of *pdp1* and *vri* in the modulation of circadian rhythms, non-circadian roles were found for *pdp1* and *vri* in embryos and larval development of flies (George and Terracol 1997; Reddy et al. 2000; Szuplewski et al. 2003). The strong transcriptional fluctuations detected for *pdp1* during the beginning of adult life and later in 25-day-old bees for *vri* point to different roles during the development of adult workers (Figure 3 (a)). The high transcriptional levels of *pdp1* in young bees (3-day-old) may be related to their nutritional status, once it was reported that this gene is affected by the availability of food during larval development in fruit flies (Reddy et al. 2006). As reported in the literature, the diet and feeding regime regulate the internal clock of organisms and we suggest that the amount and differential uptake of nutrients during the chronological age of honeybees affect directly *pdp1* expression (Chaudhari et al. 2017).

Analysis pointed to the conservation of protein domains between Hymenoptera *cwo* and its ortholog in *D. melanogaster*, indicating that this gene has conserved the same function within insects (Kadener et al. 2007; Lim et al. 2007; Matsumoto et al. 2007; Ingram et al. 2012; Rodriguez-Zas et al. 2012). We observed that the high transcriptional levels of *cwo* at 17 h in heads of old bees (Figure 3 (c)) are similar to those observed by Rodriguez-Zas et al. (2012). Similar fluctuation patterns of *cwo* expression profile from 7 to 17 h were observed in heads of 15-day-old and 25-day-old bees, but not at 22 h. We cannot discard that in a social environment, not all the bees will present the same circadian phase, at least when gene expression is considered. In a social community, the members behave differently due to the opportunity to interact each other. The same is supposed to occur with the circadian rhythm. An example is the expression of *cwo* that demonstrates sensitivity to colony social organization and varies when individual tests were performed. This enables us to say that a single-cohort colony affected the transcriptional modulation since it has a peculiar demographic distribution, at least at the initial experimental phase.

The identification of miRNAs in circadian neurons of *D. melanogaster* suggested that these small non-coding RNAs might regulate the stability or the translation of *clk*, *vri*, and *cwo* (Kadener et al. 2009). Additionally, computational simulations have demonstrated that miRNAs are involved in the modulation of the circadian rhythms altering its amplitude and periodicity (Nandi et al. 2009). Kadener et al. (2009) also described several miRNAs upregulated in circadian neurons of *D. melanogaster* when the enzyme Dicer was disrupted by the knockdown. Some conserved miRNAs found in our analysis are linked to neuronal functions: *let-7*, *miR-8*, *miR-9a*, *miR-34*, *miR-124*, and *bantam* (reviewed by Asgari 2013). Overexpression of *bantam*, a potential regulator of *clk*, in adult neurons of fruit flies leads to longer rhythmic periods (Kadener et al. 2009). Overexpression or deletion of *let-7* affects the length of circadian rhythms (Chen et al. 2014). It is suggested that *let-7* forms a regulatory cycle in the circadian clock being activated indirectly by CLK/CYC through the ecdysteroid

pathway and negatively regulates the expression of *cwo*. Further, *let-7*, *miR-8*, and *miR-34* are essential players in preventing neurodegeneration process and aging in *D. melanogaster* (Liu et al. 2012a, b; Chawla et al. 2016). *miR-92a* has an oscillatory expression in circadian neurons of fruit flies and modulates the neuronal excitability through regulation of *sirt2* (Chen and Rosbash 2016). The miRNAs *miR-31a*, *miR-124*, *miR-133*, *miR-184*, and *miR-263b* (Figure 4a) found in our analysis have been detected in the central nervous system of *D. melanogaster* (Kadener et al. 2009), which opens the opportunity to investigate experimentally how these miRNAs are involved in the modulation of circadian rhythms in honeybees.

Beyond the post-transcriptional regulation of clock genes, physical interactions at translational level are important to regulate the stability of clock proteins in the nucleus or in the cytoplasm (Weber et al. 2011; Reischl and Kramer 2011; Crane and Young 2014). Moreover, the canonical clock proteins not only act as transcriptional factors in the circadian machinery but also interact with other products to regulate non-circadian functions. Our protein-protein interaction network (Figure 4b) revealed physical interactions between clock proteins and non-clock proteins related to the biological processes: post-translational regulation, phosphorylation, ubiquitination, and degradation. The *discs overgrown* (DCO), also called *doubletime* (DBT), is one of the proteins found to phosphorylate PER contributing to modulate its translational levels in the cytoplasm (Price et al. 1998; Kloss et al. 1998; Cyran et al. 2005; Reischl and Kramer 2011; Weber et al. 2011). The protein *supernumerary limb* (SLMB) recognizes the phosphorylated site in PER and acts in recruiting other proteins to direct PER to degradation through the ubiquitin-proteasome system (Ko et al. 2002; Chiu et al. 2008). The proteins USP8, RPS27A, and UBI-p5E involved in the ubiquitin-proteasome system interact with CLK and CYC suggesting that a conserved degradation machinery is essential to the clearance of clock gene products. We also observed a physical interaction between VRI and SLMB, suggesting a possible non-circadian role during embryogenesis, as reported in the literature and in a specialized

database (FlyBase) (George and Terracol 1997; Szuplewski et al. 2010). Another possible role linked to the generation of circadian rhythms was observed for PER and BRP (*bruchpilot*) interaction; it is known from the literature that BRP is associated with the synaptic circadian plasticity in the visual system of fruit flies (Woźnicka et al. 2015). The *brp* gene is also described to be involved in functions related to adult locomotor behavior and short-term memory (Wagh et al. 2006; Knappek et al. 2011).

The physical interactions recovered for TIM2 and CRY-m, orthologous in mammals, revealed proteins related to metabolism and DNA replication processes. We reinforce here that all proteins found to interact physically with TIM2 and CRY-m based on *M. musculus* data present an ortholog in the honeybee, suggesting similar interactions. We observed that all proteins found to interact with TIM2 have an essential role in regulating the chromosome integrity and DNA replication (Gotter et al. 2000; Benna et al. 2010). CRY-m showed two physical interactions with FBXL3 and SKP1, probably originating a complex to polyubiquitinate CRY-m and direct it to degradation. This result suggested a possible role of this complex to regulate CRY-m stability and modulate the circadian rhythms (Xing et al. 2013; Yoo et al. 2013). The physical interactions for CRY-m also revealed proteins involved in the nuclear import, the Karyopherins KPN2, KPN4, and KPN7, as candidates to participate in CRY-m translocation from the cytoplasm to nucleus. Taken together, the reconstruction of protein-protein interaction network allowed us to extend our view on the possible interactions at a translational level that potentially regulate the stability of clock proteins and even establish non-circadian functions along the development of honeybees.

Finally, our work gave us the opportunity to discuss how the circadian clock genes are modulated in the central nervous system of Africanized honeybees reared under special conditions, taking into account that they are localized in a different geographic region compared to the honeybees living in the temperate climate. Here, we added new elements to understand how the conserved circadian machinery, analyzed under these circumstances, so as affected by climatic,

geographic, nutritional, and social contexts, modulates the circadian rhythms and the behavioral plasticity in social insects, especially honeybees.

Funding FAPESP, Process N° 2014/14194-4.

AUTHORS' CONTRIBUTION

All authors have contributed equally to the work: Fabiano C.P. Abreu and Zilá L.P. Simões elaborated the idea of this work, experimental procedures were performed by Fabiano C. P. Abreu, and Flavia C.P. Freitas performed the computational analyses.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Les gènes de l'horloge circadienne sont modulés de façon différentielle au cours des cycles quotidiens et de l'âge chronologique chez l'abeille domestique (*Apis mellifera*)

horloge circadienne / gene horloge / rythme circadien / abeille / miRNAs

Die Expression von Genen der circadianen Uhr ist differentiell moduliert in Bezug auf die Tageszyklen und das chronologische Alter der sozialen Honigbiene (*Apis mellifera*)

circadiane Uhr/ Uhr-Gene / circadiane Rhythmen / Honigbiene / micro RNAs

REFERENCES

- Asgari, S. (2013) MicroRNA functions in insects. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 43 (4): 388–97
- Ashby, R., Forêt, S., Searle, I., Maleszka, R. (2016) MicroRNAs in honey bee caste determination. *Sci. Rep.* 7; 6: 18794
- Behura, S. K., Whitfield, C. W. (2010) Correlated expression patterns of microRNA genes with age-dependent behavioural changes in honeybee. *Insect. Mol. Biol.* 19: 431–439.
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas T. L., Zoran, M. J. (2005)

- Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* 6, 544–56.
- Benna, C., Bonaccorsi, S., Wülbeck, C., Helfrich-Förster, C., Gatti, M., Kyriacou, C. P. & Sandrelli, F. (2010) *Drosophila* timeless2 is required for chromosome stability and circadian photoreception. *Curr. Biol.* 20 (4), 346–352.
- Bloch, G. (2010) The social clock of the honeybee. *J. Biol. Rhythms.* 25, 307–17.
- Bloch, G., Toma, D. P., Robinson, G. E. (2001) Behavioral Rhythmicity, Age, Division of Labor and *period* Expression in the Honey Bee Brain. *J. Biol. Rhythms.* 16 (5), 444–456.
- Bloch, G., Solomon, S. M., Robinson, G. E., Fahrback, S. E. (2003) Patterns of PERIOD and pigment-dispersing hormone immunoreactivity in the brain of the European honeybee (*Apis mellifera*): age- and time-related plasticity. *J. Comp. Neurol.* 464 (3): 269–284.
- Chatr-aryamontri, A., Oughtred, R., Boucher, L., Rust, J., Chang, C., et al. (2017) The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic Acids Res.* 45(D1):D369–D379.
- Chaudhari, A., Gupta, R., Makwana, K., Kondratov, R. (2017) Circadian clocks, diet and aging. *Nutr. Healthy Aging.* 4, 101–112.
- Chawla, G., Deosthale, P., Childress, S., Wu, Y.C., Sokol, N.S. (2016) A let-7-to-miR-125 MicroRNA Switch Regulates Neuronal Integrity and Lifespan in *Drosophila*. *PLoS. Genet.* 12 (8): e1006247
- Chen, X., Rosbash, M. (2016) MicroRNA-92a is a circadian modulator of neuronal excitability in *Drosophila*. *Nature Commun.* 8: 14707.
- Chen, X., Yu, X., Cai, Y., Zheng, H., Yu, D., Liu, G., Zhou, Q., Hu, S., Hu, F. (2010) Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in the honey bee *Apis mellifera*. *Insect. Mol. Biol.* 19: 799–805.
- Chen, W., Liu, Z., Li, T., Zhang, R., Xue, Y., Zhong, Y., Bai, W., Zhou, D., Zhao, Z. (2014) Regulation of *Drosophila* circadian rhythms by miRNA let-7 is mediated by a regulatory cycle. *Nat. Commun.* 5: 5549.
- Cheng, H. Y., Papp, J. W., Varlamova, O., Dziema, H., Russell, B., Curfman, J. P., Nakazawa, T., Shimizu, K., Okamura, H., Impey, S., et al. (2007). microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron.* 54, 813–829.
- Chiu, J. C., Vanselow, J. T., Kramer, A., & Edery, I. (2008). The phospho-occupancy of an atypical SLIMB-binding site on PERIOD that is phosphorylated by DOUBLETIME controls the pace of the clock. *Genes Dev.* 22 (13), 1758–1772.
- Crane, B. R., Young, M. W. (2014). Interactive features of proteins composing eukaryotic circadian clocks. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 191–219.
- Cristino, A. S., Barchuk, A. R., Freitas, F. C., Narayanan, R. K., Biergans, S. D., Zhao, Z., Simoes, Z. L., Reinhard, J., Claudianos, C. (2014) Neuroligin-associated microRNA-932 targets actin and regulates memory in the honeybee. *Nat. Commun.* 20; 5: 5529.
- Cyran, S. A., Buchsbaum, A. M., Reddy, K. L., Lin, M. V., Glossop, N. R., Hardin, P. E., Young, M. W., Storti, R. V., Blau, J. (2003) vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 112: 329–341.
- Cyran, S. A., Yiannoulos, G., Buchsbaum, A. M., Saez, L., Young, M. W., & Blau, J. (2005). The double-time protein kinase regulates the subcellular localization of the *Drosophila* clock protein period. *J. Neurosci.* 25 (22), 5430–5437.
- Dunlap, J., Loros, J., DeCoursey, P. (2004) *Chronobiology: biological timekeeping*. Sunderland: Sinauer Associates
- Eban-Rothschild, A., Shemesh, Y., Bloch, G. (2012) The colony environment, but not direct contact with conspecifics, influences the development of circadian rhythms in honey bees. *J. Biol. Rhythms.* 27 (3): 217:225.
- Elsik, C. G., Worley, K. C., Bennett, A. K., Beye, M., Camara, F., Childers, C. P., ... & Elhaik, E. (2014). Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC genomics*, 15(1), 86
- Freitas, F. C. P., Pires, C. V., Claudianos, C., Cristino, A. S., Simões, Z. L. P. (2017) MicroRNA-34 directly targets pair-rule genes and cytoskeleton component in the honey bee. *Sci. Rep.* 7: 40884.
- Frisch, B., Koeniger, N. (1994) Social synchronization of the activity rhythms of honeybees within a colony. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 35, 91–98
- Fuchikawa, T., Eban-Rothschild, A., Nagari, M., Shemesh, Y., Bloch, G. (2016) Potent social synchronization can override photic entrainment of circadian rhythms. *Nat. Commun.* 7: 11662.
- Fuchikawa, T., Beer, K., Linke-Winnebeck, C., Ben-David, R., Kotowoy, A., Tsang, V. W. K., Warman, G. R., Winnebeck, E. C., Helfrich-Foster, C., Bloch, G. (2017) Neuronal circadian clock protein oscillations are similar in behaviourally rhythmic forager honeybees and in arrhythmic nurses. *Open Biol.* 7: 170047
- George, H., Terracol, R. (1997) The vrille gene of *Drosophila* is a maternal enhancer of decapentaplegic and encodes a new member of the bZIP family of transcription factors. *Genetics* 146, 1345–1363.
- Gotter A. L., Manganaro T., Weaver D. R., Kolakowski L. F., Possidente B., Sriram S., MacLaughlin D. T., Reppert S. M. (2000) A time-less function for mouse *Timeless*. *Nat. Neurosci.* 3: 755–756.
- Gu, H., Xiao, J., Niu, L., Wang, B., Ma, G., Dunn, D. W., Huang, D. (2014) Adaptive evolution of the circadian gene timeout in insects. *Sci. Rep.* 4: 4212
- Ingram, K. K., Kutowoi, A., Wurm, Y., Shoemaker, D., Meier, R., Bloch, G. (2012) The Molecular Clockwork of the Fire Ant *Solenopsis invicta*. *PLoS One* 7(11): e45715.
- Jung, J. H., Seo, Y. H., Seo, P. J., Reyes, J. L., Yun, J., Chua, N. H. and Park, C. M. (2007). The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in Arabidopsis. *Plant. Cell.* 19, 2736–2748.

- Kadener, S., Stoleru, D., McDonald, M., Nawathean, P., Rosbash, M. (2007). Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes. Dev.* 21: 1675–1686.
- Kadener, S., Menet, J. S., Sugino, K., Horwich, M. D., Weissbein, U., Nawathean, P., Vagin, V. V., Zamore, P. D., Nelson, S. B. and Rosbash, M. (2009). A role for microRNAs in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev.* 23, 2179–2191.
- Kloss, B., Price, J. L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C. S., Young, M. W. (1998). The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase 1 ϵ . *Cell.* 94 (1), 97–107.
- Knappek, K., Sigrist, S., Tanimoto, H. (2011) Bruchpilot, a synaptic active zone protein for anesthesia-resistant memory. *J. Neurosci.* 31(9): 3453–3458
- Ko, H. W., Jiang, J., & Edery, I. (2002). Role for Slimb in the degradation of *Drosophila* Period protein phosphorylated by Doubletime. *Nature.* 420 (6916), 673–678
- Kojima, S., Shingle, D. L., & Green, C. B. (2011). Post-transcriptional control of circadian rhythms. *J Cell Sci.* 124(3), 311–320.
- Kruger, J., Rehmsmeier, M. (2006) RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res.* 34: W451–W454.
- Lim, C., Chung, B. Y., Pitman, J. L., McGill, J. J., Pradhan, S., Lee, J., Keegan, K. P., Choe, J., Allada, R. (2007) Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian-clock amplitude in *Drosophila*. *Curr Biol* 17:1082–1089
- Liu, F., Peng, W., Li, Z., Li, W., Li, L., Pan, J., Zhang, S., Miao, Y., Chen, S., Su, S. (2012a) Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in *Apis mellifera*: comparison between nurses and foragers. *Insect Mol. Biol.* 21: 297–303.
- Liu, N., Landreh, M., Cao, K., Abe, M., Hendriks, G. J., Kennerdell, J. R., Zhu, Y., Wang, L. S., Bonini, N. M. (2012b) The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature.* 482 (7386): 519–523.
- Livak, K. J., 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., Simoes, 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
- Luhur, A., Chawla, G., Sokol, N. S. (2013) MicroRNAs as components of systemic signaling pathways in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Top. Dev. Biol.* 105: 97–123.
- Macedo, L. M., Nunes, F. M., Freitas, F. C., Pires, C. V., Tanaka, E. D., Martins, J. R., Piulachs, M. D., Cristino, A. S., Pinheiro, D. G., Simões, Z. L. (2016) MicroRNA signatures characterizing caste-independent ovarian activity in queen and worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Mol Biol.* 25: 216–226.
- Matsumoto, A., Ukai-Tadenuma, M., Yamada, R. G., Houl, J., Umo, K.D., et al. (2007) A functional genomics strategy reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev.* 21:1687–1700
- Meshi, A., Bloch, G. (2007) Monitoring circadian rhythms of individual honey bees in a social environment reveals social influences on postembryonic ontogeny of activity rhythms. *J. Biol. Rhythms.* 22 (4): 343–355.
- Nagari, M., Bloch, G. (2012) The involvement of the antennae in mediating the brood influence on circadian rhythms in “nurse” honey bee (*Apis mellifera*) workers. *J. Insect. Physiol.* 58 (8): 1096–1103.
- Nandi, A., Vaz, C., Bhattacharya, A., Ramaswamy, R. (2009). miRNA-regulated dynamics in circadian oscillator models. *BMC Syst Biol.* 3, 45–47.
- Panda, S., Hogenesch, J. B., Kay, S. A. (2002) Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417 (6886): 329–335.
- Pires, C. V., Freitas, F. C., Cristino, A. S., Dearden, P. K., Simões, Z. L. (2016) Transcriptome Analysis of Honeybee (*Apis Mellifera*) Haploid and Diploid Embryos Reveals Early Zygotic Transcription during Cleavage. *PLoS One* 11(1): e0146447.
- Price, J. L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B., & Young, M. W. (1998). double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell.* 94 (1), 83–95.
- Qin, Q. H., Wang, Z. L., Tian, L. Q., Gan, H. Y., Zhang, S. W., Zeng, Z. J. (2014). The integrative analysis of microRNA and mRNA expression in *Apis mellifera* following maze-based visual pattern learning. *Insect Sci.* 21: 619–66.
- Reddy, K. L., Wohlwill, A., Katzen, A., Dzitoeva, S., Lin, M., Holbrook, S., Storti, R.V. (2000) The *Drosophila* PAR Domain Protein 1 (*Pdp1*) gene encodes multiple differentially expressed mRNAs and proteins through the use of multiple enhancers and promoters. *Dev. Biol.* 224, 401–414.
- Reddy, K. L., Rovani, M. K., Wohlwill, A., Katzen, A., Storti, R. V. (2006) The *Drosophila* Par domain protein 1 gene, *Pdp1*, is a regulator of larval growth, mitosis and endoreplication. *Dev. Biol.* 289: 100–114
- Reischl, S., Kramer, A. (2011). Kinases and phosphatases in the mammalian circadian clock. *FEBS Lett.* 585 (10), 1393–1399.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R. (2000) Comparing clockworks: mouse versus fly. *J. Biol. Rhythms.* 15, 357–64.
- Rodriguez-Zas, S. L., Southey, B. R., Shemesh, Y., Rubin, E. B., Cohen, M., Robinson, G. E., Bloch, G. (2012) Microarray Analysis of Natural Socially-Regulated Plasticity in Circadian Rhythms of Honey Bees. *J. Biol. Rhythms* 27(1): 12–24
- Rubin, E. B., Shemesh, Y., Cohen, M., Elgavish, S., Robertson, H. M., Bloch, G. (2006) Molecular and phylogenetic analyses reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on

- the molecular evolution of the circadian clock. *Gen. Res.* 16:1352–1365
- Sadd, B. M., Barribeau, S. M., Bloch, G., de Graaf, G. C., Dearden, P. (2015) The genomes of two key bumblebee species with primitive eusocial organization. *Genome Biol.* 16(1): 76.
- Sandrelli, F., Costa, R., Kyriacou, C. P., & Rosato, E. (2008). Comparative analysis of circadian clock genes in insects. *Insect. Mol. Biol.* 17 (5), 447–46
- Sangoram, A. M., Saez, L., Antoch, M. P., Gekakis, N., Staknis, D., et al. (1998) Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron.* 21, 1101–1113
- Saunders, D. S. (2002). *Insect clocks*. Amsterdam: Elsevier.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13(11): 2498–2504.
- Shemesh, Y., Cohen, M., Bloch, G. (2007) Natural plasticity in circadian rhythms is mediated by reorganization in the molecular clockwork in honeybees. *FASEB J.* 21, 2304–2311.
- Shemesh, Y., Eban-Rothschild, A., Cohen, M., Bloch, G. (2010) Molecular dynamics and social regulation of context-dependent plasticity in the circadian clockwork of the honey bee. *J. Neurosci.* 30, 12517–25.
- Sire, C., Moreno, A. B., Garcia-Chapa, M., Lopez-Moya, J. J., San Segundo, B. (2009). Diurnal oscillation in the accumulation of Arabidopsis microRNAs, miR167, miR168, miR171 and miR398. *FEBS Lett.* 583, 1039–1044.
- Szuplewski, S., Kottler, B., & Terracol, R. (2003). The *Drosophila* bZIP transcription factor Vrille is involved in hair and cell growth. *Development.* 130 (16), 3651–3662.
- Szuplewski, S., Fraisse-Véron, I., George, H., Terracol, R. (2010) vrille is required to ensure tracheal integrity in *Drosophila* embryo. *Dev. Growth Differ.* 52 (5): 409–418.
- Takumi, T., Nagamine, Y., Miyake, S., Matsubara, C., Taguchi, K., et al. (1999) A mammalian ortholog of *Drosophila* timeless, highly expressed in SCN and retina, forms a complex with mPER1. *Genes Cells.* 4, 67–75.
- Toma, D. P., Bloch, G., Moore, D., Robinson, G. E. (2000) Changes in *period* mRNA levels in the brain and division of labor in honey bee colonies. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* 97:6914–6919.
- Tomioka, K., Matsumoto, A. (2010) A comparative view of insect circadian clock systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:1397–1406.
- Vansteensel, M. J., Michel, S., Meijer, J. H. (2008) Organization of cell and tissue circadian pacemakers: A comparison among species. *Brain Res. Rev.* 58 (1): 18–47
- Wagh, D. A., Rasse, T. M., Asan, E., Hofbauer, A., Schwenkert, I., et al. (2006) Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron.* 49(6): 833–844.
- Weaver, D. B., Anzola, J. M., Evans, J. D., Reid, J. G., Reese, J. T., Childs, K. L., Zdobnov, E. M., Samanta, M. P., Miller, J., Elsik, C. G. (2007) Computational and transcriptional evidence for microRNAs in the honey bee genome. *Genome Biol.* 8 (6): R97.
- Weber, F., Zorn, D., Rademacher, C., & Hung, H. C. (2011). Post-translational timing mechanisms of the *Drosophila* circadian clock. *FEBS Lett.* 585 (10), 1443–1449
- Weinstock, G. M., Robinson, G. E., Gibbs, R. A., Worley, K. C., Evans, J. D. et al. (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443 (7114), 931–949.
- Woźnicka, O., Görlich, A., Sigrist, S., Pyza, E. (2015) BRP-170 and BRP190 isoforms of Bruchpilot protein differentially contribute to the frequency of synapses and synaptic circadian plasticity in the visual system of *Drosophila*. *Front. Cell. Neurosci.* 9: 238
- Xing, W., Busino, L., Hinds, T. R., Marionni, S. T., Saifee, N. H., Bush, M. F., ... & Zheng, N. (2013). SCFFBXL3 ubiquitin ligase targets cryptochromes at their cofactor pocket. *Nature*, 496 (7443), 64–68
- Xu, S., Witmer, P. D., Lumayag, S., Kovacs, B., Valle, D. (2007). MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J. Biol. Chem.* 282, 25053–25066.
- Yang, M., Lee, Jung-Eun., Padgett, R. W., Edery, I. (2008) Circadian regulation of a limited set of conserved microRNAs in *Drosophila*. *BMC Genomics*, 9:83.
- Yoo, S. H., Mohawk, J. A., Siepkma, S. M., Shan, Y., Huh, S. K., Hong, H. K., ... & Nussbaum, J. (2013). Competing E3 ubiquitin ligases govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm. *Cell*, 152 (5), 1091–1105.
- Young, M. W., Kay, S. A. (2001) Time zones: A comparative genetics of circadian clocks. *Nat. Rev. Genet.* 2 (9): 702–715