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

**Regulação gênica dos processos iniciais do desenvolvimento
de embriões haploides e diploides de *Apis mellifera***

CAMILLA VALENTE PIRES

**Ribeirão Preto
2014**

CAMILLA VALENTE PIRES

**Regulação gênica dos processos iniciais do desenvolvimento de embriões haploides e
diploides 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
2014**

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

PIRES, Camilla Valente

Regulação gênica dos processos iniciais do desenvolvimento de embriões haploides e diploides de *Apis mellifera*, 2014.

152p.: il

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. Embriões diploides e haploides 3. Regulação gênica 4. Ativação do ovo 5. Ativação do genoma zigótico

Apoio Financeiro:

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes/Proex) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processos 2010/08150-3 e 2011/03171-5

PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Parecer: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Parecer: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Parecer: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Parecer: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Parecer: _____
Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 2014.

A Deus. Aos meus pais, irmãos,
familiares, amigos, professores e
Bernardo pela torcida por esta
conquista

... dedico.

AGRADECIMENTOS

À Professora Zilá pela humildade, paciência e profundo conhecimento e confiança depositados em mim.

À Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi, ao Prof. Dr. Francis e Dr. Alexandre Cristino pelas inestimáveis contribuições científicas ao longo do doutorado.

Ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Soares, por toda prontidão em que me atendeu em momentos de urgência.

À Flávia Cristina de Paula Freitas, pela convivência amiga e profissional, seus conhecimentos e contribuições que fizeram diferença na minha formação.

À equipe e amigos do laboratório, por terem proporcionado momentos de alegria e sabedoria. Em especial Professor Klaus Hartfelder, Professor Angel Barchuk, Professora Livia, Professor Rodrigo, Aline, Daniel, Claudinéia, Dayana, Érica, Felipe, Juliana, Karina, Liliane, Marcela, Michelle, Natalia, Omar, Rogério, Tathyana e Vanessa.

Aos técnicos do bloco A, em especial Luiz Aguiar e Vera Figueiredo, por toda ajuda e conhecimento passados a mim.

Ao Professor Peter K. Dearden e seus respectivos alunos e funcionários, por me aceitarem em seu laboratório e fornecer auxílio técnico científico.

Aos meus pais pela confiança, carinho e cuidado nunca deixados de lados mesmo longe.

Ao Bernardo pela motivação, ajuda e companheirismo, amizade e amor.

À tia Pretinha e meus irmãos, em nome de todos meus familiares, pelos créditos depositados, e pelas manifestações de carinho e respeito.

Aos amigos de Viçosa e Ribeirão Preto pela sempre torcida, amizade e horas de diversão.

Ao Curso de Pós-graduação em Genética – FMRP/USP pela oportunidade, aos seus alunos e docentes pela convivência sadia e crescimento cooperativo e, em especial, à funcionária Susie Adriana Penha Nalon.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo suporte financeiro.

Aos que não citei, as razões do esquecimento são tantas e, certamente, alheias ao meu profundo agradecimento pelas suas contribuições.

A Deus.

“A capacidade de tomar decisões e fazer avaliações sábias diante da incerteza é uma habilidade rara. Porém, como qualquer habilidade, pode ser aperfeiçoada com a experiência.” (Leonard Mlodinow, *O Andar do Bêbado*)

RESUMO

Regulação gênica dos processos iniciais do desenvolvimento de embriões haploides e diploides de *Apis mellifera*

O desenvolvimento embrionário é o resultado de uma sequência controlada de eventos modulados por sinais ambientais e mecanismos intracelulares. Em Hymenoptera, esse processo tem um caráter especial devido ao sistema de determinação do sexo (Haplodiploide). Neste sistema, os ovos fecundados se desenvolvem em fêmeas (diploides) e os ovos não fecundados em machos (haploides). Assim, eventos importantes, como a ativação do ovo e transição materno-zigótica, eventos iniciais da embriogênese, são elementos-chave para compreender o desenvolvimento de ambos os tipos de embriões. Ativação do ovo é um evento complexo acionado em resposta a estímulos externos, necessários para o início da embriogênese. Em abelhas a ativação do ovo ocorre independentemente da fecundação e parece ser desencadeado durante a passagem pelo trato reprodutivo da mãe. Além disso, se o ovócito não for fecundado ele irá se desenvolver em um organismo haploide. No entanto, se o ovo recebe o espermatozóide até 30 minutos depois da ativação, o ovo se desenvolve em um organismo diploide. Em *Drosophila*, a ativação do ovo é também independente da fecundação. O estímulo inicial que desencadeia o desenvolvimento é devido tensões mecânicas sofridas pelo ovócito durante a ovulação pela passagem através do trato reprodutivo. Neste modelo, o primeiro sinal de ativação inclui a ativação da via dependente de cálcio. Moléculas maternas que são incorporadas no ovócito durante ovogênese, atuam durante a ativação do ovo, bem como no início da embriogênese. Os eventos iniciais da embriogênese também são caracterizados pela ausência de altos níveis de transcrição zigótica. As moléculas depositadas atuam na ativação do ovo, quebrando a dormência da divisão celular permitindo a ocorrência do início do desenvolvimento embrionário. Mas, o embrião em desenvolvimento gradualmente degrada e substitui essas moléculas herdadas da mãe, em um processo conhecido como transição materno-zigótica. Nosso principal objetivo foi o entendimento da comunicação entre as moléculas herdadas e as recém produzidas durante os primeiros passos do desenvolvimento de *Apis mellifera*. Para alcançar nosso objetivo, 16 bibliotecas de RNAseq (mRNA e miRNA) foram construídas utilizando amostras de RNA total de embriões diploides e haploides de diferentes idades e ovócitos maduros. A análise do transcriptoma mostrou que existem genes diferencialmente expressos entre os dois tipos de embriões já em 1 h de desenvolvimento. Além disso, nossa análise permitiu a identificação de mRNAs e miRNAs maternos e zigóticos, além de processos com que estas moléculas se relacionam. As análises mostraram também que um mesmo miRNA pode atingir diferentes mRNAs em cada tipo de embrião, na mesma fase de desenvolvimento. Além disso, um mesmo gene pode ser diferentemente regulado nos dois tipos de embriões. Por exemplo, *broad/GB48272*, que é classificado como materno em embriões diploides é regulado por quatro miRNAs diferentes e em embriões haploides é classificado como zigótico, regulado por apenas um miRNA. Análise das bibliotecas de RNAseq e hibridação *in situ* mostrou o padrão de expressão de *zelda* em embriões jovens de abelhas. *Zelda* é um ativador chave do genoma zigótico em *Drosophila* e regula eventos importantes na embriogênese se ligando a um motivo conservado, TAGteam. Em *A. mellifera*, encontramos um motivo TAGteam putativo que tem sido relacionado à transcrição zigótica precoce. Além disso, a hibridização *in situ* e PCR mostraram três pri-miRNAs (*ame-mir-375-3p*, *ame-mir-34-5p* e *ame-mir-263b-5p*) que se expressam durante a clivagem. A presença de pri-miRNAs evidenciou o início da transcrição zigótica durante a clivagem. Em suma, podemos dizer que este é o primeiro trabalho em *Apis mellifera* a descrever os eventos de iniciais do desenvolvimento embrionário

comparando embriões haploides e diploides usando os recentes protocolos de bioinformática e os avanços da biologia molecular.

ABSTRACT

Gene regulation of early developmental processes of haploid and diploid embryos of *Apis mellifera*

Embryonic development is the result of a precisely controlled sequence of events modulated by environmental signals and intracellular mechanisms. In Hymenoptera, this process takes a special character due the sex-determination system (haplodiploidy). In this system, fertilized eggs develop in females (diploid) and unfertilized eggs in males (haploid). Thus, important events such as egg activation and maternal-zygotic transition, events of the early embryogenesis are key elements to understand the development of both types of embryos. Egg activation is a complex event triggered in response to external stimuli and necessary for the onset of embryogenesis. In honeybees egg activation occurs independently of fertilization and seems to be triggered during the passage through mother's reproductive tract. Furthermore, if the egg is not fertilized it will develop into haploid organism. However, if the egg receives the sperm up to 30min after activation, this egg develops into a diploid organism. In *Drosophila*, the egg activation is also fertilization independent. Initial stimulus that triggers the development is due mechanical stresses suffered by the egg during ovulation and passage through the reproductive tract. In this model, the first activation signal includes activation of calcium-dependent pathway. Maternal molecules that are incorporated into the oocyte during oogenesis, act during egg activation, as well as in early embryogenesis. Early embryogenesis events are also characterized by absence of high levels of zygotic transcription. The deposited molecules drive egg activation, breaking cell division dormancy permitting the beginning of embryonic development. But, the developing embryo gradually degrades and substitutes these mother-inherited molecules, in a process known as mother-to-zygote transition. Our main objective was the understanding of the deep crosstalk among the inherited molecules and the newly ones produced during the first steps of *Apis mellifera* embryogenesis. To achieve our objective 16 deep sequenced RNA (mRNA, miRNA) libraries were constructed using different age diploid and haploid embryos, and mature oocytes. Genome-wide transcriptome analysis was performed and interactive regulatory networks were constructed. Our analysis permitted the identification of maternal and zygotic mRNAs and miRNAs and related processes. Based on expression profiles of mRNAs and miRNAs in mature oocytes and haploid and diploid embryos of 2, 6 and 18-24 h of development, we constructed integrative regulatory networks (miRNA:mRNA) showing that the same miRNA could target different mRNAs in each type of embryo, in the same phase of development. As example we cite broad/GB48272, which is classified as maternal in diploid embryos and regulated by four different miRNAs. However, in haploid embryos it is zygotic and regulated by only one miRNA. Analysis of RNAseq and in situ hybridization showed the expression pattern of *zelda* in early honeybee embryos. *Zelda* is a key activator of *Drosophila* early zygotic genome and regulates important events in early embryogenesis binding to TAGteam motif. In *A. mellifera*, we found a putative TAGteam motif that has been implicated in early zygotic transcription. Moreover, in situ hybridization and PCR assay showed three pri-miRNAs (*ame-mir-375-3p*, *ame-mir-34-5p* and *ame-mir-263b-5p*) expressed during cleavage. The presence of pri-miRNAs is the first evidence of early zygotic transcription during cleavage. In short, we could say that this is the first work on *Apis mellifera* describing the early embryonic developmental events comparing haploid and diploid embryos using modern bioinformatics tools and advanced molecular analysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Apis mellifera</i> : o modelo biológico	1
1.2. Partenogênese	3
1.3. Formação do ovo e ovulação em abelhas	4
1.4. Ativação do ovo	5
1.5. Transição materno-zigótica (MZT- <i>Maternal-to-Zygotic Transition</i>)	8
1.6. Desenvolvimento embrionário de <i>Apis mellifera</i>	11
1.7. Bases moleculares da embriogênese de <i>A. mellifera</i>	12
1.8. MiRNAs, as moléculas reguladoras	13
1.9. Questões a serem respondidas sobre o desenvolvimento das abelhas	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Coleta do material biológico	19
3.2. Extração do RNA total	20
3.3. Construção das bibliotecas de pequenos RNA e mRNA	21
3.4. Análises das bibliotecas	21
3.5. Normalização dos dados de expressão gênica	23
3.6. Hibridação <i>in situ</i>	24
3.6.1. Coleta de material biológico	24
3.6.2. Fixação de embriões	25
3.6.3. Preparação da sonda	25
3.6.4. Hibridação <i>in situ</i> (mRNA e pri-miRNA)	30
3.6.5. Soluções:	31
3.7. Há diferença na expressão gênica entre embriões haploides e diploides no início da embriogênese? Os eventos e moléculas envolvidas na ativação do ovo e transição materno-zigótica são os mesmos quando considerados embriões haploides e diploides? (Questões 1 e 2)	33
3.7.1. Genes diferencialmente expressos	33
3.7.2. Coeficiente de correlação de Pearson	33
3.7.3. Busca por ortólogos de <i>Drosophila melanogaster</i>	34
3.7.4. Busca por funções dos genes diferentemente regulados	34
3.8. Há a participação de moléculas reguladoras, como os miRNAs, específicas para cada tipo de embrião? (Questão 3)	36
3.8.1. Predição de alvos para os miRNAs	37
3.8.2. Construção das redes de regulação (miRNA:mRNA)	38
3.9. Qual a origem – materna ou zigótica - das moléculas reguladoras do início da embriogênese de <i>A. mellifera</i> ? O genoma zigótico é ativado em até 24 h de desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i> ? Esta ativação é diferente entre embriões haploides e diploides?	40
3.9.1. Genes maternos e genes zigóticos	41

3.9.3.	Conservação de reguladores da transição materno-zigótica	44
4.	RESULTADOS	47
4.1.	Descrição das bibliotecas	47
4.1.1.	Identificação dos mRNA	47
4.1.2.	Identificação de pequenos RNAs	49
4.2.	Hibridação <i>in situ</i>	52
4.3.	Questões 1 e 2	53
4.3.1.	Genes diferencialmente expressos	53
4.3.2.	Genes com perfis de expressão antagônicos	55
4.4.	Questão 3	67
4.4.1.	Redes de regulação gênica (miRNA:mRNA)	67
4.4.2.	<i>Ame-mir-375-3p</i>	76
4.4.3.	<i>Ame-mir-34</i>	78
4.4.4.	<i>Ame-mir-263b</i>	79
4.4.5.	<i>Ame-mir-184 e ame-mir-9a</i>	81
4.5.	Questão 4 e 5	84
4.5.1.	Genes maternos e genes zigóticos	84
4.5.2.	Expressão e localização de pri-miRNAs	98
4.5.3.	Análise dos genes reguladores da transição materno-zigótica	101
5.	DISCUSSÃO	115
5.1.	Diferenças na expressão genica entre embriões haploides e diploides (Questões 1 e 2)	115
5.2.	Rede de regulação gênica miRNA:mRNA (Questão 3)	122
5.3.	Transição materno-zigótica (Questões 4 e 5)	133
6.	CONCLUSÕES	145
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

ANEXO

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Apis mellifera*: o modelo biológico

As abelhas da espécie *Apis mellifera*, Linneaus, 1758 (Hymenoptera, Apidae, Apinae, Apini) são insetos holometábolos, ou seja, aqueles que apresentam metamorfose completa, passando por quatro estágios de desenvolvimento: embrionário, larval, pupal e adultos.

Nos himenópteros, a determinação de sexo é haplodiploide, onde fêmeas originam-se de ovócitos fertilizados, portanto diploides ($2n=32$), e os machos, denominados zangões, se originam de ovócitos não fertilizados, haploides ($n=16$). Em uma colônia de *A. mellifera* existem dois fenótipos femininos, chamados de castas, distintos quanto à morfologia e fisiologia e comportamento, a rainha e as operárias.

Um ovo, independentemente de ser ou não fecundado, eclode após 3 dias (72 h) de desenvolvimento embrionário. As larvas originadas são intensamente alimentadas e se caracterizam por 5 estágios larvais. A partir do terceiro estágio larval a quantidade e a qualidade do alimento oferecido determinam o destino das fêmeas: a larva que originará a rainha continua sendo alimentada com geleia real, enquanto as futuras operárias recebem uma mistura de geleia real, mel e pólen. A grande quantidade de geleia real que é fornecida às larvas é um dos fatores que levam ao aumento nos níveis hormônio juvenil (HJ) e resulta na diferenciação dessas larvas em rainhas. A diferença nos títulos de HJ, como consequência da alimentação casta-específica, resulta na expressão diferencial de genes entre rainhas e operárias (Evans & Wheeler 1999; Cristino *et al.* 2006; Barchuk *et al.* 2007). Portanto, as larvas fêmeas tem potencial para seguir duas vias de desenvolvimento: uma que levará a caracteres morfológicos específicos de rainhas e outra à morfologia típica de operárias (Rembold 1987; Rachinsky *et al.* 1990). As larvas

haploides são alimentadas da mesma forma que uma larva que originaria uma operária (Snodgrass 1984) e darão origem aos machos.

Ao final do 5º estágio larval ocorre a muda metamórfica, quando acontece a transição larva-pupa. No estágio pupal ocorre substituição dos tecidos e órgãos larvais por tecidos de um indivíduo adulto, como as: asas, pernas, antenas, entre outros (revisado em Cruz-Landim 2009).

Em uma colônia dita normal há uma equilibrada distribuição demográfica, estando presentes em proporções definidas as formas imaturas, operárias adultas de todas as idades, bem como a presença de alimento armazenado. Esta condição permite uma harmoniosa divisão do trabalho entre os membros da colônia, inclusive o reprodutivo, os cuidados com a cria e busca por alimento (revisado em Cruz-Landim 2009).

A rainha adulta é pelo menos duas vezes maior que uma operária adulta e possui tem uma sobrevida maior. Na região tropical uma operária sobrevive, em média, 45 dias e uma rainha, um ano e meio. A rainha possui anatomia especializada para reprodução e, geralmente, é a única fêmea fértil da colônia. A rainha é poliândrica, realizando a partir do quinto dia após a emergência três vôos para acasalamento (em africanizadas). Ela possui um par de ovários bem desenvolvido, com cerca de 180 ovários cada (revisado em Winston, 1987). As operárias adultas são facultativamente estéreis e possuem em cada um de seus ovários entre 2-10 ovários funcionais. A condição de esterilidade das operárias pode ser revertida em função da orfandade, ou seja, na ausência da rainha ocorre ativação dos ovários e postura de ovos não fertilizados, que produzirão exclusivamente zangões. Na colônia, a rainha suprime o desenvolvimento dos folículos ovarianos das operárias por meio da liberação de feromônios produzidos por glândulas mandibulares (Snodgrass 1984; Van Oystaeyen *et al.* 2014).

A função dos machos dentro da colônia se restringe à cópula. Na maioria das espécies de abelhas sociais a produção de machos é cíclica e intercalada com fases de produção de fêmeas da mesma rainha, obedecendo a características reprodutivas da espécie (revisado em Cruz-Landim 2009). Geralmente a época de produção de machos é aquela em que há abundância de alimento. As operárias nestas épocas produzem favos com células mais largas, ou seja, células de cria para zangões. Estas células maiores seriam responsáveis pela postura de ovos haploides, pois a rainha ao introduzir o abdômen na célula este não seria comprimido e a espermateca não seria estimulada para liberação de espermatozoides. Os ovos desta forma são haploides, portanto, darão origem aos machos. Eventualmente, as operárias podem ativar seus ovários e produzirem ovos que darão origem a zangões.

1.2. Partenogênese

'*Lucina sine concubitu*', assim foi chamado, por muito tempo, o processo pelo qual uma fêmea é capaz de produzir um ovo que se desenvolve sem ser fertilizado. Segundo Mittwoch (1978), Richard Owen em 1849 utilizou o termo partenogênese, pela primeira vez, para definir o desenvolvimento sem influencia imediata do macho. Mais tarde essa definição foi revisada, pois foi observado que partenogênese ocorria em organismos onde a fêmea tinha contato com macho, como ocorre em afídeos, onde a partenogênese é chamada cíclica. Em Himenópteros Mittwoch (1978) denominou partenogênese facultativa, podendo ocorrer desenvolvimento de ovos fecundados e não fecundados.

Em todos os himenópteros, os machos se desenvolvem de ovos não fecundados e as fêmeas de ovos fecundados. Este tipo de partenogênese é denominado de partenogênese arrenótoca, na qual ovos não fecundados dão origem a apenas machos.

O fenômeno pelo qual uma rainha não fecundada ou uma operária em postura origina organismos haploides tem sido objeto de estudo desde longa data como evidenciou Tucker (1958), ao citar estudos de 1892. Além disso, os mecanismos de ativação do ovo que resulta na formação do zigoto e mantém o desenvolvimento embrionário de um organismo haploide, permanece ainda desconhecido, sendo um dos principais objetivos desse trabalho.

1.3. Formação do ovo e ovulação em abelhas

Para entendermos a ativação do ovo em *A. mellifera* e assim buscar respostas para a ativação do ovo e suas diferenças no ovo fecundado e não fecundado é importante entendermos como ocorre a formação do ovo nesta espécie.

A ovogênese em abelhas é dividida em sete fases, sendo as 4 primeiras (I, II, III, IV) chamadas de fase pré-vitelogênica, as fases V e VI, vitelogênica, e a sétima (VII) corresponde à coriogênese. A pré-vitelogênica (I e II) se caracteriza pela multiplicação das células germinativas (divisões meióticas), formando os cystócitos, que se apresentam em rosetas. As rosetas se desfazem e um dos cystócitos, sem qualquer diferença morfológica, irá formar o ovócito, sendo reconhecido pouco mais tarde, por ser maior que os demais. Esse ovócito em formação, nesta fase, apresenta um núcleo com cromatina dispersa e ocupando uma posição basal em relação aos demais cystócitos. Na fase III começa organização dos folículos ovarianos, que são formados por duas câmaras separadas por células foliculares. Uma das câmaras contem células que formam as células nutridoras e a outra o ovócito. Este ovócito é esférico, possui núcleo pequeno e com cromatina dispersa, é chamado de vesícula germinativa e se localiza, no final, na região anterior do ovócito. Na fase IV o ovócito cresce e se alonga, devido a deposição de nutrientes por parte das células nutridoras. Na fase de vitelogênese (fases V e VI) vários

grânulos de vitelo são depositados no ovócito, o que dificulta a visualização da vesícula germinativa. Durante a vitelogênese o ovócito permanece em prófase I (meiose) com DNA duplicado. Na fase VII, coriogênese, a câmara nutridora não existe mais restando o ovócito recoberto pelas células foliculares. Estas células aparentemente apresentam regionalização e marcas hexagonais na superfície do córion e na região anterior do ovócito, sendo que na porção posterior, o córion se apresenta liso. Quando terminada a formação do córion, as células foliculares estão destacadas do ovócito. O ovócito está todo tomado por vitelo nesta fase, salvo o periplasma (citoplasma periférico). Ao final da coriogênese os ovócitos apresentam-se em metáfase I da meiose, a qual só se completa com a fecundação (revisado em Cruz-Landim 2009).

O ovo de *A. mellifera* tem forma elíptica. Os ovos dos insetos em geral, e também o das abelhas, apresentam o vitelo distribuído na região central e por isso são classificados como ovos centrolécitos. O córion apresenta marcas hexagonais formadas por impressões das células foliculares que o recobrem. No centro desses hexágonos existem poros, responsáveis pelas trocas gasosas. Na região anterior do ovo as marcas hexagonais se convergem formando a região da micrópila, que contém perfurações, por onde entrariam os espermatozoides (DuPraw 1967; Cruz-Landim 2009).

A passagem do ovócito pelo oviduto, com a consequente saída do mesmo do envoltório folicular (camada de células foliculares) é a chamada ovulação. A ovulação nas abelhas ocorre quando o ovócito está na metáfase da primeira divisão meiótica. A meiose termina com a ativação do ovo e início das divisões nucleares (revisado em Cruz-Landim 2009).

1.4. Ativação do ovo

A ativação do ovo, composta de uma multiplicidade de eventos e desencadeada em resposta aos estímulos externos, é necessária para o início da embriogênese (Horner &

Wolfner 2008). Em abelhas a fecundação não é necessária para a ativação (Cruz-Landim 2009). É bem provável que as mudanças no ambiente iônico, pH ou estimulação mecânica possam provocar a ativação, como ocorre em organismos cujos ovos são ativados independente da fecundação (Tadros & Lipshitz 2009a). A ovulação ocorre quando o ovócito está metáfase I da meiose (Cruz-Landim 2009) que se completa depois da ativação de ovo.

Sasaki and Obara (2002) provaram que com um estímulo mecânico há ativação do desenvolvimento em *A. mellifera*. Essa ativação em um ambiente natural pode ser causado pela passagem do ovo pelo trato reprodutivo materno. Eles ainda mostraram que se esse ovo não for fecundado ele vai se desenvolver em organismo haploide. Mas, se o ovo receber os espermatozoides em até 30min após a ativação, este ovo se desenvolve em um organismo diploide. Os autores ainda sugerem que os músculos semi-circulares que envolvem o oviduto tem a função de estimular mecanicamente o ovócito no momento de sua postura.

"A ativação de um ovo não fecundado é o primeiro passo fisiológico para a partenogênese em Hymenoptera" (Sasaki & Obara 2002). No entanto, pouco se conhece sobre as bases moleculares dessa ativação.

Em *D. melanogaster*, insetos não partenogenéticos, a ativação do ovo ocorre anteriormente à fecundação (Tadros & Lipshitz 2009a). A estimulação mecânica durante a passagem do ovócito pelo oviduto e a reidratação parecem disparar a ativação do ovo e conclusão da meiose. Estudos recentes apontam para uma ligação entre a sinalização pelo Ca^{+2} e a retomada da meiose, que em *Drosophila* está estacionada em anáfase II. A sinalização pelo cálcio dispara uma cadeia de eventos que termina na degradação proteína Ciclina B, que causa inativação do complexo cdkI/ciclinaB, impedindo que a meiose continue. Esta inativação parece ser causada pelo APC (complexo ativador de anáfase):

quando a via de sinalização de Ca^{+2} é ativada na célula, por estímulos independentes da fecundação, a calcipressina SRA (Sarah), um inibidor da fosfatase calcineurina Ca^{+2} /calmodulina-dependente, de alguma forma ativa o APC. Desta forma, a meiose se completa antes da entrada do espermatozoide. (Horner *et al.* 2006; Takeo *et al.* 2006; Horner & Wolfner 2008; Stetina & Orr-Weaver 2011).

Durante a ativação do ovo, RNAs são recrutados para tradução (Stitzel & Seydoux 2007). As moléculas da ativação do ovo não são transcritas “*de novo*” no ovócito (Stetina & Orr-Weaver 2011). O que acontece é que os mRNAs que as codificam ou as próprias proteínas encontram-se inativados desde a maturação dos ovócitos (Krauchunas *et al.* 2012). Estas moléculas maternas incorporadas pelos ovócitos durante a ovogênese agem durante a ativação do ovo assim como, no início da embriogênese (Tadros *et al.* 2007b).

Em *Drosophila*, por exemplo, a proteína Pumilo silencia o mRNA codificador da ciclina B. Mas, durante a ativação do ovo o complexo PAN GU quinase ativa sua transcrição pela extensão da cauda poli A (Leah & Terry 2007). Além disso, existem evidências de que microRNAs (miRNAs) podem estar silenciando alguns mRNAs não permitindo sua tradução (Nakahara *et al.* 2005), entre o a maturação do ovócito e o início da embriogênese desse mesmo organismo.

A fosforilação ou desfosforilação de proteínas também é uma maneira de manter a proteína materna inativada até o momento da ativação do ovo, sendo um rápido mecanismo de regulação (Krauchunas *et al.* 2012). Em *Drosophila*, cerca de 300 proteínas candidatas a ativação do ovo foram identificadas por Krauchunas *et al.* (2012). Estas proteínas foram identificadas por abordagens proteômicas e descritas como sendo aquelas que mudavam seu estado entre ovócitos maduros e ovos não fecundados, mas ativados. Dentre as proteínas identificadas existem aquelas envolvidas na via de

sinalização de cálcio e outras proteínas que ainda não haviam sido descritas como participantes do processo.

Depois da sinalização de Ca^{+2} , ativação do ovo e finalização da meiose é preciso que fatores mitóticos estejam ativos para iniciar as divisões de clivagem, ou seja, para iniciar a embriogênese (Stetina & Orr-Weaver 2011). Em *Drosophila* existem reguladores especializados na ativação das divisões mitóticas após a conclusão da meiose. Por exemplo, o complexo PAN GU quinase (PNG) (Lee 2003) é requerido na condensação dos cromossomos na interfase e também na tradução de *smaug* (SMG). SMG, por sua vez, facilita a passagem do controle materno do desenvolvimento, para o zigótico, através da degradação de mRNAs maternos (Tadros *et al.* 2007a).

Os eventos de degradação de mRNAs também é uma das características da ativação do ovo. Componentes da via de ubiquitinação foram detectados em ovócitos maduros e no início da embriogênese de camundongo, *Caenorhabditis elegans* e *zebrafish* (*Danio rerio*) (Stitzel & Seydoux 2007). Moléculas maternas atuam nessa fase para degradação de outras moléculas maternas até que o controle do desenvolvimento seja todo passado ao zigoto (Tadros *et al.* 2007b).

1.5. Transição materno-zigótica (MZT- *Maternal-to-Zygotic Transition*)

Os eventos iniciais da embriogênese caracterizam-se pela ausência de transcrição de mRNA zigóticos (Semotok & Lipshitz 2007). Dois processos acontecem durante a transição do controle do desenvolvimento de materno para o zigoto (MZT- *Maternal-to-Zygotic Transition*). Primeiro, um subconjunto de mRNAs maternos é degradado e segundo, o genoma do zigoto é ativado. A transcrição zigótica é também responsável pela produção de proteínas e de miRNAs que suportam o *feedback* para aumento na eficiência da degradação dos mRNAs maternos. Além disso, os mRNAs sintetizados “de novo”

nesta fase são ativadores transcricionais que aumentam a eficiência de transcritos zigóticos. A partir deste momento, o controle do desenvolvimento começa a ser transferido da mãe para o genoma zigótico (Tadros & Lipshitz 2009b).

O primeiro evento é de degradação de moléculas maternas. Esta degradação ocorre inicialmente pelas próprias moléculas maternas e depois das primeiras transcrições zigóticas, por moléculas codificadas pelo genoma zigótico (Tadros & Lipshitz 2009).

Um exemplo de moléculas maternas que atuam nessa degradação é a proteína Smaug (SMG) e o fator de transcrição Zelda (*Zinc-finger early Drosophila activator*), também chamado de Vielfaltig (Vlf) em *Drosophila*.

O mRNA *smg* é transcrito maternalmente e depois da ativação do ovo ele é traduzido com auxílio do complexo PNG (Tadros *et al.* 2007a). Smaug é requerido em altos níveis na transição materno-zigótica (Benoit *et al.* 2009). Embriões de *Drosophila*, mutantes para *smg*, apresentaram defeitos no ciclo celular, nas divisões finais da clivagem para a formação da blastoderme sincicial e na gastrulação.

Outro exemplo é *zelda*, um transcrito materno que além de atuar na degradação de outros transcritos maternos, atua como fator de transcrição que se liga a motivos conservados, presentes na região promotora de genes primariamente transcritos pelo genoma zigótico em *Drosophila*, chamados TAGteam (ten Bosch *et al.* 2006; Hsiao-Lan *et al.* 2008). Este motivo parece estar também presente em genes zigóticos de *Aedes aegypti* (Biedler *et al.* 2012). Os genes regulados por este fator geralmente estão ligados à determinação do sexo, padronização dorsa-ventral e celularização, além de coordenar a produção gênica durante a transição materno-zigótica em *Drosophila* (ten Bosch *et al.* 2006; Sung *et al.* 2013). *zelda* é degradado durante a fase de celularização, mas logo depois ele é produzido pelo zigoto (Liang *et al.* 2008).

Os miRNAs, que também conFiguram como fatores importantes que atuam nesta transição, são produzidos zigoticamente na primeira onda de transcrição de produtos zigóticos (Bushati *et al.* 2008b; Abrams & Mullins 2009; Tadros & Lipshitz 2009a). Exemplos clássicos são os membros do cluster de miRNA-309 em *Drosophila* (Benoit *et al.* 2009) (Figura 1), que é transcrito com a atuação de *smaug* (Liang, *et al.* 2008). Outro exemplo muito bem descrito de miRNA envolvido na transição materno zigótica é o miRNA-430 em *zebrafish* (Schier & Giraldez 2006; Abrams & Mullins 2009).

Em organismos como ouriço-do-mar, *zebrafish*, *C. elegans*, camundongos e insetos, durante a MZT, a ativação do genoma zigótico ocorre em ondas crescentes de transcrição. Em *Drosophila*, essa ativação se dá em duas ondas de transcrição. (Tadros & Lipshitz 2009). Logo após a ativação do ovo, a clivagem se inicia. São 13 divisões nucleares sem citocinese (sem divisão celular) (Alberts *et al.* 2008), sendo as 7 primeiras divisões acontecem no interior do embrião e a partir da oitava os núcleos começam a migrar pra periferia (Alberts 2008). No 8º ciclo ocorre a primeira e menor onda de transcrição zigótica, sendo que muitos dos genes transcritos nesta onda estão ligados à determinação do sexo, celularização e padronização dorsa-ventral (ten Bosch *et al.* 2006). As divisões nucleares do 10º ao 13º ciclo mitótico ocorrem próximos à superfície do embrião, no citoplasma periférico, para a formação da blastoderme sincicial. E no 14º ciclo, as membranas plasmáticas começam a invaginar, formando a blastoderme celular (Campos-Ortega & Hastenstein 1997; Alberts *et al.* 2008). É neste ciclo que ocorre a segunda e maior onda de transcrição zigótica (ten Bosch *et al.* 2006). Este padrão de ativação do genoma em duas ondas também foi identificado em *A. aegypti* (Biedler *et al.* 2012).

Figura 1: Ação de moléculas maternas (*smaug*) e zigótica (*miR-309*) na transição materno-zigótica (retirado de Benoit *et al.* 2009).

O momento exato em que a transição materno-zigótica ocorre é variável entre as espécies de metazoários (Tadros & Lipshitz 2009). Sabe-se que a primeira divisão de clivagem em machos de *A. mellifera* acontece de três a quatro horas depois da postura do ovo (Cruz-Landim 2009). Mas, não se sabe quando o zigoto começa a transcrever seus próprios genes. Desta forma, o momento exato da transição materno-zigótica nesta espécie ainda não é conhecido. O entendimento e descrição deste momento em abelhas também é um dos objetivos deste trabalho.

1.6. Desenvolvimento embrionário de *Apis mellifera*

O desenvolvimento embrionário de *A. mellifera* tem a duração de 72 h (Nelson 1915), mais prolongado que a embriogênese de *Drosophila*, que tem duração de 24 h (Campos-Ortega & Hastenstein 1997). Em *A. mellifera* a embriogênese se inicia com a primeira divisão de clivagem e é do tipo superficial, como em muitos outros insetos holometábolos, sendo os ovos do tipo centrolécito, com vitelo concentrado na sua região central. Estas divisões resultam em núcleos que migram para o citoplasma periférico do embrião, formando um grande sincício. As divisões dos núcleos iniciam-se entre 0 h e 7 h

após a postura do ovo (Nelson 1915). Depois do alojamento dos núcleos na periferia do embrião, as membranas plasmáticas se formam, isolando os núcleos e o citoplasma circundante, formando a blastoderme celular, que se completa 33 horas após a postura. A gastrulação então se inicia. Movimentos celulares formam os diferentes folhetos germinativos (ectoderme, mesoderme e endoderme). Este processo se completa depois de 44 horas da postura do ovo, quando começa a formação da banda germinativa na região ventral e a diferenciação da membrana serosa na região dorsal. É nesta fase que começam ocorrer diferenciações celulares (40 a 55 horas depois da postura), por exemplo, a diferenciação do sistema nervoso na linha mediana ventral do embrião, das estruturas ectodérmicas e do intestino médio primordial, entre outras estruturas. O embrião então passa por processos que resultam na formação do corpo da larva e sua eclosão se dá após 72 horas após a postura (Nelson 1915; revisado em Cruz-Landim 2009).

Esta descrição da embriogênese de *A. mellifera* é feita de acordo com estudos realizados em embriões diploides, sendo que sobre a embriogênese específica de zangões existem poucos dados. Li *et al.* (2011) publicaram o perfil de proteínas expressas em 3 (três) diferentes períodos do desenvolvimento embrionário de zangões de *A. mellifera ligustica* (24 h, 48 h e 72 h de desenvolvimento). Neste, foram descritas 62 proteínas diferencialmente expressas entre as três fases analisadas. Este estudo traça o perfil de proteínas do embrião de zangão inferindo sobre os processos biológicos mais frequentes em cada fase analisada.

1.7. Bases moleculares da embriogênese de *A. mellifera*

Sabe-se que nas primeiras horas do desenvolvimento embrionário dos metazoários, entre a fertilização e a gastrulação, a expressão gênica é altamente dinâmica (Arbeitman 2002). Muitos destes genes expressos durante a embriogênese atuam com morfógenos, quando

os produtos maternos são degradados e o genoma zigótico já está ativo. Os genes do embrião, no entanto, se expressam de acordo com os compartimentos formados pela distribuição dos produtos maternos (Campos-Ortega & Hastenstein 1997).

Na anotação do genoma de *A. mellifera* (Honeybee Genome Sequencing Consortium 2006) não foram identificados ortólogos para muitos dos genes de *D. melanogaster*, ativos nesta fase da vida. Estas ausências mostram que diferentes mecanismos estariam atuando no desenvolvimento de espécies distintas. Mas, a organização e expressão de genes Hox (homeobox), envolvidos no controle do posicionamento, desenvolvimento e diferenciação das células no embrião (Campos-Ortega & Hastenstein 1997), em *A. mellifera* e *Drosophila*, mostram-se bastante conservados (Dearden *et al.* 2006a). Além disso, genes envolvidos em processos celulares distintos e também ligados ao desenvolvimento estão aparentemente conservados em abelhas, como por exemplo, os genes das vias de sinalização de Notch (Wilson *et al.* 2010b) envolvidos na formação dos eixos embrionários e segmentação, além de *even-skipped* e *paired*, que atuam na modulação do eixo antero-posterior com expressão em faixas por todo o corpo do embrião, como ocorre em *Drosophila* (Osborne & Dearden 2005b).

1.8. MiRNAs, as moléculas reguladoras

Um importante regulador da expressão gênica na embriogênese de diversos organismos, como já dito, são os miRNAs. Estas são moléculas de RNAs não-codificadores de 20-24 nucleotídeos (nt). Geralmente são transcritos por uma RNA polimerase II. Os transcritos primários (pri-miRNA) são sintetizados e, ainda no núcleo, eles são processados pela Drosha/Pasha (RNase III endonuclease) formando as moléculas precursoras dos miRNAs (pre-miRNAs) de 70 nt. Os pre-miRNAs são transportados para o citoplasma por

proteínas especializadas (RanGTP/Exp-5), onde são clivados pela Dicer-1 (Dcr-1) e Loquacious (Loqs) dando origem ao miRNA de fita-dupla maduro (miRNA 3p) e ao miRNA* (complementar ao miRNA maduro, chamado de miRNA 5p). Esta molécula se une a um conjunto de proteínas formando RISC (RNA-induced silencing complex), que contém a AGO-1, onde ocorre do pareamento miRNA maduro a 3'UTR do gene-alvo, na sua grande maioria. RISC leva o miRNA maduro à regulação negativa da expressão dos genes-alvo por dois mecanismos pós-transcrição: degradação do mRNA e repressão da tradução (Bartel 2007; Bushati & Cohen 2007; Lucas & Raikhel 2013) (Figura 2).

Em animais, o modo de ação dos miRNAs é a inibição da tradução, onde o miRNA se liga ao mRNA alvo impedindo que ele seja traduzido (Bartel 2009). Entretanto, estudos mostram que os miRNAs também reduzem os níveis de mRNA-alvo em mamíferos (Guo *et al.* 2010; Somel *et al.* 2010) em *zebrafish* (Giraldez *et al.* 2006) e em *Drosophila* (Bushati *et al.* 2008b). Bethune *et al.* (2012) propõem que os miRNAs agem primeiramente inibindo a tradução pela ligação do miRNA ao seu mRNA-alvo, em seguida, ocorre a desestabilização do mRNA-alvo, que seria feito pelos complexos PAN-2 e PAN-3 e CCR4-NOT, provavelmente devido à parada na tradução. Com a inibição deste processo a cauda poli-A fica mais instável aumentando a inibição na tradução e recrutamento da maquinaria que remove o *cap* do mRNA, que é degradado.

Os miRNAs foram descritos em vários estágios do desenvolvimento de insetos (Aravin *et al.* 2003; Behura 2007) e novos dados vem sendo acrescentados às bases de dados especializadas. Em *D. melanogaster*, os miRNAs estão envolvidos em vários processos ligados ao desenvolvimento embrionário como por exemplo, apoptose (Brennecke *et al.* 2003; Stark *et al.* 2003; Xu *et al.* 2003), divisão celular (Leaman *et al.* 2007) e ovogênese (Nakahara *et al.* 2005).

O sequenciamento em larga escala (sequenciamento de nova geração) dos miRNAs de *Bombyx mori* acrescentou 14 novos miRNAs aos bancos de dados e identificou 101 miRNAs conservados (Jagadeeswaran *et al.* 2010). Em *A. mellifera* o sequenciamento de uma biblioteca de pequenos RNAs relativos a uma mistura de diferentes estágios do desenvolvimento utilizando plataforma de sequenciamento de nova geração, SOLID, acrescentou novos miRNAs à base de dados especializada (mirBase) (Chen *et al.* 2010). Liu *et al.* (2012a) usaram esta mesma plataforma para comparação dos perfis de miRNAs expressos em operárias nutrízes e forrageiras para anotação de novos miRNAs. A 20ª versão do miRBase (Kozomara & Griffiths-Jones 2011) hospeda 222 miRNAs de *A. mellifera*.

Figura 2: Sugestão de um modelo da biogênese dos miRNAs em insetos (retirado de Lucas & Raikhel 2013) mostrando a sequência de ação das principais enzimas de processamento, Drosha e Dicer (Dcr), no núcleo e no citoplasma, respectivamente, até a formação do complexo RISC com a ligação do miRNA maduro a 3'UTR do gene-alvo, para a regulação do mesmo.

Zondag *et al.* (2012) analisando duas bibliotecas de pequenos RNAs de embriões de *A. mellifera* de 24 h de desenvolvimento, geradas por sequenciamento de nova

geração, mostraram que os miRNAs também desempenham um papel importante no desenvolvimento embrionário desta abelha. Além disso, muitos miRNAs são compartilhados entre várias espécies de metazoários, salvo o *mir-1*, cuja a expressão é diferente entre *A. mellifera* e outros organismos. Zondag *et al.* (2012) ainda fizeram a predição e expressão de 16 novos candidatos a miRNAs de *A. mellifera*, mas ainda não estão depositados no banco de dados, miRBase (Kozomara & Griffiths-Jones 2011).

Por isso, a análise e atribuição de função aos miRNAs podem representar uma importante ligação entre a descrição do desenvolvimento e o entendimento das relações genoma/fenótipo.

1.9. Questões a serem respondidas sobre o desenvolvimento das abelhas

Ainda que inúmeras informações já estejam disponíveis, questões importantes acerca do início do desenvolvimento embrionário de *A. mellifera* ainda permanecem. A Figura mostra três pontos que pretendemos esclarecer:

1. Ativação do ovo
2. Transição materno-zigótica
3. Diferenças entre embriões haploides e diploides nos dois primeiros processos.

A partir desta abordagem pretendemos responder cinco questões com o objetivo de esclarecer sobre as bases moleculares que regem o início da embriogênese de *A. mellifera*.

Questão 1: Há diferença na expressão gênica entre embriões haploides e diploides no início da embriogênese?

Questão 2: Os eventos e moléculas envolvidas na ativação do ovo e transição materno-zigótica são os mesmos quando considerados embriões haploides e diploides?

Questão 3: Há a participação de moléculas reguladoras, como os miRNAs, específicas para cada tipo de embrião?

Questão 4: Qual a origem – materna ou zigótica - das moléculas reguladoras do início da embriogênese de *A. mellifera*?

Questão 5: O genoma zigótico é ativado em até 24 h de desenvolvimento de *Apis mellifera*? Esta ativação é diferente entre embriões haploides e diploides?

Para responder estas questões geramos redes de interação gênica a partir do sequenciamento de última geração de mRNAs e microRNAs de embriões haploides e diploides de 2 h, 6 h, e 24 h de desenvolvimento, e ainda, de ovócitos maduros, que atuaram como tempo zero de desenvolvimento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar elementos reguladores da ativação do ovo, da ativação do genoma zigótico, bem como as possíveis diferenças entre haploides e diploides no início da embriogênese de *Apis mellifera*.

2.2. Objetivos específicos

- Construção das bibliotecas de mRNA e de pequenos RNAs de ovócitos maduros, de embriões haploides e diploides de 0-1 h, 0-2 h, 0-6 h, 18-24 h de desenvolvimento;
- Identificação de genes e miRNAs expressos em ovócitos maduros, embriões haploides e diploides de até 24 h de desenvolvimento, destacando possíveis diferenças entre os dois tipos de embriões;
- Construção de redes gênicas de regulação por microRNAs no início da embriogênese (0 a 24 h do desenvolvimento) de embriões haploides e diploides de *A. mellifera*;
- Comparação entre as redes de regulação de embriões haploides e diploides: genes ligados a ativação do ovo, transição materno-zigótica e além de outros processos da embriogênese, destacando a regulação da expressão e diferenças entre embriões haploides e diploides;
- Perfil de expressão e localização por hibridação *in situ* de alguns genes e miRNAs considerados importantes para a ativação do ovo e desenvolvimento embrionário de *A. mellifera*;
- Busca pela origem (materna ou zigótica) dos reguladores do início da embriogênese de *A. mellifera*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A estratégia e a metodologia utilizada está resumida no esquema e detalhada abaixo.

3.1. Coleta do material biológico

Embriões em diferentes fases do desenvolvimento foram coletados em colônias mantidas no apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo.

Para obter embriões com idades controladas, uma rainha foi presa por diferentes intervalos de horas sobre favos, específicos para postura de zangões, para coleta de embriões haploides, ou para específicos para operárias, para a coleta de embriões diploides. Também foi usado para a coleta de embriões haploides, uma colônia mantida órfã, ou seja, sem rainha, para que as operárias ativassem os ovários e assim pudessem fazer postura de ovos haploides. Os favos com postura, tanto aqueles que originariam macho quanto aqueles que originariam fêmeas, tiveram a área de postura protegida para evitar posturas ulteriores e permaneceram nas colônias originais. Foram coletados

embriões haploides de 0-1 h, 0-2 h, 0-6 h, 18-24 h e embriões diploides de 0-1 h, 0-2 h, 0-6 h, 18-24 h de idade. Ovócitos maduros foram coletados diretamente dos ovários de uma rainha em postura, não permitindo, contudo, que os ovos passassem pelo oviduto, garantindo uma amostra constituída apenas de marcadores maternos.

3.2. Extração do RNA total

Depois de coletados os embriões foram colocados em microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL de TRIzol® (Invitrogen) e depois as amostras foram congeladas a -80°C até a extração do RNA total. As amostras em TRIzol® foram descongeladas a temperatura ambiente. A cada amostra foram adicionados 100 µL de clorofórmio (MERCK) e os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e levados a uma centrifugação a 12.000 rpm, a 4°C por 20 minutos. Ao final da centrifugação, as amostras apresentaram duas fases: uma fase branca aquosa (onde estava o RNA) e outra vermelha (contendo proteínas e o restante do TRIzol®). A fase branca foi transferida para outro tubo onde foram adicionados 250 µL de álcool isopropílico (MERCK) e 1µL de glicogênio (concentração de 10 µg/µL). As amostras foram então, armazenadas no freezer -20°C por dois dias para que o glicogênio potencializasse a precipitação.

Após essa etapa de precipitação, as amostras foram retiradas do freezer e deixadas à temperatura ambiente por 40 minutos. Em seguida o material foi submetido a uma segunda centrifugação a 14.000 rpm a 4°C por 30 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionado 500 µL de etanol 75% (MERCK). Uma nova centrifugação foi realizada a 10.000 rpm a 4°C por 10 minutos para separação do RNA total. O sobrenadante foi descartado com cuidado e os tubos abertos foram colocados em um termobloco Digital Dry Bath Incubator (Boekel) a 55°C por 10 minutos para evaporação do álcool remanescente. O RNA foi, então, ressuspensionado em 15-30 µL de

água ultrapura tratada com dietilpírocarbonato (DEPC, 0,1% (v/v), Sigma) e autoclavada. Para completa dissolução do RNA precipitado, as amostras foram deixadas em um termobloco a 55 °C por 5 minutos.

A pureza (estimada por meio da razão 260/280 nm entre os valores da leitura) e concentração (dada em µg/µL) da solução final de cada amostra foram obtidas por absorbância óptica a 280 nm, em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies). Posteriormente, as amostras foram congeladas a -80°C até serem encaminhadas ao sequenciamento.

3.3. Construção das bibliotecas de pequenos RNA e mRNA

O RNA total das amostras foi enviado uma *facility* da University of North Carolina, na cidade Chapel Hill, USA (<http://www.unc.edu/htsf/index.html>).

Para a construção das bibliotecas os pequenos RNAs (menores que 200 nt) foram isolados. Posteriormente eles foram sequenciados pelo protocolo *single-end sequencing* (36 a 50 ciclos) pela plataforma de sequenciamento de nova geração Illumina (Genome Analyse II, Life Sciences) SingleEnd40x.

Para a construção das bibliotecas de mRNA, os transcritos maiores que 200nt foram separados e depois sequenciados pela mesma plataforma.

Desta forma, foram geradas 7 bibliotecas de pequenos RNA (ovócitos maduros; 0-2 h, 0-6 h e 18-24 h de embriões diploides; 0-2 h, 0-6 h, 18-24 h de embriões haploides) e 9 bibliotecas de mRNA (ovócitos maduros; 0-1 h, 0-2 h, 0-6 h e 18-24 h de embriões diploides; 0-1 h, 0-2 h, 0-6 h, 18-24 h, de embriões haploides).

3.4. Análises das bibliotecas

Procedimentos padrão foram usados para organização do produto de sequenciamento.

A remoção dos adaptadores das sequências (*reads*) das bibliotecas tanto de pequenos RNAs quanto de mRNAs foi feita utilizando o software Cutadapt (Martin M. 2011).

O mapeamento das *reads* originadas das bibliotecas tanto de pequenos RNAs e quanto de mRNA foi feito em banco de dados de transcritos de abelhas, um construído e idealizado em nosso laboratório (Tabela 1). Este mapeamento foi feito utilizando o programa BWA (Li & Durbin 2009), usando os parâmetros *default*. Para mapeamento dos mRNA e pequenos RNAs foram excluídas *reads* menores que 10 pb.

A partir deste mapeamento, um arquivo em formato SAM foi gerado. Deste arquivo foi possível extrair informações tais como: quais genes estão expressos em cada fase do desenvolvimento analisada e o número de *reads* mapeadas em cada conjunto de transcritos do banco de dados.

Tabela 1: Banco de dados de transcritos de abelhas usado para mapeamento das bibliotecas de sequenciamento de nova geração (de mRNAs e pequenos RNAs).

Sequências Expressas	Bases de dados	Organismos	# de sequências	Referências
Genes Codificadores	Amel_4.5	<i>A. mellifera</i>	15314	genome.ucsc.edu/
miRNA	miRBase18	<i>A. mellifera</i>	226	www.mirbase.org
rRNA	SILVA	Insetos	2762151	www.arb-silva.de
tRNA	GtRNAdb	Insetos	78403	gtmadb.ucsc.edu
Outras ncRNAs	NONCODE	Eucariotos	423903	www.noncode.org/NONCODERv3
Patógenos	NCBI	Bactérias, Fungos e Vírus de doenças em abelhas	933	www.ncbi.nlm.nih.gov

As bibliotecas de pequenos RNAs foram ainda mapeadas em outro banco dados. Primeiro foram separadas as *reads* de 19 e 24 pb, tamanhos esperados para miRNAs (Bartel 2007). Depois estas *reads* foram mapeadas nas sequências *hairpin* dos miRNAs de *A. mellifera*, recuperados do miRBase 18, que seriam a sequências do pré-miRNAs. As *reads* foram classificadas como miRNA ‘5p’ ou miRNA ‘3p’ com base na posição de mapeamento no *hairpin*. Ou seja, se uma *read* mapeasse do centro para a extremidade 5p da sequência do pré-miRNA ele seria o miRNA-5p, se a *read* mapeasse do centro para

extremidade 3p, o miRNA seria classificado com o miRNA-3p. Esta abordagem não só identificou miRNAs maduros já descritos na base de dados miRBase mas também identificou novos miRNAs maduros ainda não depositados neste banco de dados (Anexo 6). A identificação dos miRNA (5p ou 3p) e a contagem das *reads* mapeadas foram feitas utilizando *scripts* customizados em Python.

3.5. Normalização dos dados de expressão gênica

A normalização do número de *reads* por gene e por miRNA identificados foi feita de acordo com (Mortazavi *et al.* 2008). Estes autores desenvolveram uma unidade de expressão normalizada, RPKM:

$$\text{RPKM} = \frac{\text{Número de reads unicamente mapeadas no gene}}{\text{Tamanho do gene em (kilobases) x Número de reads totais unicamente mapeadas (million reads)}}$$

Mortazavi *et al.* (2008) descrevem o RPKM (*Reads per kilo bases million*) como uma medida da densidade de *reads*, que reflete a concentração molar de um transcrito na amostra, normalizada pelo comprimento do gene (transcrito) e o número de *reads* totais da biblioteca. Isto facilitaria a comparação dos níveis de transcrição, tanto dentro como entre os pontos do desenvolvimento em estudo.

Para esta normalização, foi feita utilizando o programa Office Excel 2010 (Microsoft).

Foram considerados genes e miRNAs expressos quaisquer sequência que apresentasse RPKM >0.

3.6. Hibridação *in situ*

Para avaliar e localizar a expressão de genes e miRNAs julgados importantes para o início da embriogênese de *A. mellifera* foi feito o ensaio de hibridação *in situ*.

O protocolo utilizado para este ensaio foi baseado em Dearden *et al.* (2009b), Dearden *et al.* (2009a) e Osborne and Dearden (2005a). Sendo que para hibridação *in situ* de miRNAs ainda se seguiu Zondag *et al.* (2012). O procedimento está resumido no esquema abaixo:

Parte do protocolo de construção das sondas para hibridação *in situ* e a própria hibridação *in situ* foram feitos no Laboratório de Evolução e Desenvolvimento, Departamento de Bioquímica, Universidade de Otago, Dunedin, Nova Zelândia, sob supervisão do Professor Peter K. Dearden.

3.6.1. Coleta de material biológico

A coleta de material foi feita como descrita no item item 3.1, sendo que ao final da coleta os embriões são armazenados em solução fixadora como descrito abaixo.

3.6.2. Fixação de embriões

O protocolo usado para fixação dos embriões foi o proposto por Dearden *et al.* (2009a).

Depois de coletados os embriões foram colocados em tubos de 1,5 mL em uma solução fixadora (20 a 30 embriões por tubo). Essa consiste em uma mistura 1:1 de heptano e formaldeído 4% em PBS 1X (0,8% NaCl, 0,02% KCL, 0,144% Na₂ hPO₄ e 0,025% KH₂PO₄) volume final, 1 mL. Este fixador forma duas fases: a fase superior é o heptano e na inferior o formaldeído. O tubo com os embriões no fixador foi deixado *overnight* (mínimo de 16 h), sob agitação. Após incubação foi feita a remoção da fase que contém o fixador e adicionado 500 µL de metanol (MeOH) a -20°C. Em seguida foi feita agitação em *vortex* por 30s. O metanol e o restante do heptano foram retirados. Em seguida os embriões foram lavados com 1 mL de metanol 2X. Então, os embriões foram armazenados em 1 mL de metanol a -20°C.

3.6.3. Preparação da sonda

As sondas são feitas com nucleotídeos marcados com Digoxigenina (DIG), produzidas por transcrição *in vitro*, como descrito abaixo:

3.6.3.1. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Primeiramente oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para amplificação de um fragmento de 300 a 700pb.

Para as sondas que hibridizarão com microRNA, os *primers* foram desenhados de modo que um fragmento de 300 a 700pb fosse amplificado, tendo no centro desse fragmento a sequência do precursor do miRNA, o qual deseja-se hibridar. As sequencias precursoras dos miRNAs foram obtidas no miRBase 18 (<http://www.mirbase.org>).

Os iniciadores específicos de cada gene e miRNA estudados foram desenhados manualmente ou com auxílio do programa Primer3 (<http://gmdd.shgmo.org/primer3/?seqid=47>) (Rozen & Skaletsky 2000). A especificidade dos mesmos foi avaliada por BLASTN contra o genoma da abelha e visualizada na plataforma ARTEMIS, que permite avaliar o tamanho do transcrito gerado e potencial tamanho de fragmento genômico.

3.6.3.2. Amplificação e purificação do fragmento

O molde utilizado (*template*) para a amplificação do fragmento foi o cDNA relativo ao RNA total extraído de embriões de *Apis mellifera*, preparado utilizando o protocolo segundo orientações do fabricante, para SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 U/μL, Invitrogen), o qual transcreve reversamente RNAs que apresentam a cauda poliA.

A amplificação do cDNA feita por PCR (Reação da Polimerase em Cadeia): 10 μL de Master Mix (Promega), 1,4 μL de água ultrapura autoclavada, 0,8 μL de cada iniciador específico (10 pmol/μL) e 1 μL de cDNA (2500 ng). A temperatura de 94 °C por 30 segundos foi usada para separação das fitas de cDNA, seguido a temperatura ideal de pareamento específica de cada iniciador por 45 segundos e 72 °C por 40 segundos. A temperatura de pareamento utilizada nas amplificações por PCR variou conforme as características de cada par de iniciador (Tabela 2). O número de ciclos de reações foi de 33 ciclos.

Depois de amplificados os fragmentos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1%, para verificação da presença da banda correspondente ao tamanho. Quando esta banda estava presente, esta foi extraída do gel e purificada, utilizando o kit de purificação *GeneJET™ Gel Extration Kit Fermentas*, seguindo as especificações do fabricante.

3.6.3.3. Reação de ligação, transformação e sequenciamento

O fragmento purificado foi inserido em vetor pGEM-T easy ou pBluscript II KS (+/-). Para reação de ligação ao vetor *pGEM-T Easy* 3 µL do produto PCR purificado do gel foram adicionados em 5 µL de tampão de ligação, 1 µL de vetor (pGEM-T Easy) e 1 µL da enzima T4 DNA ligase. A reação de ligação foi incubada *overnight* a 4°C. Para a ligação utilizando o pBluscript II KS (+/-), em 40µL do produto PCR foram adicionados 5 µL de vetor pBluscript II KS (+/-), 5 µL tampão de ligação, 1 µL de T4 DNA ligase e o volume foi completado para 50 µL com água ultrapura. Esta reação foi incubada *overnight* a 16°C em banho-maria.

Foram utilizadas as células competentes obtidas a partir de células bacterianas *Escherichia coli*, da linhagem DH5α, seguindo o protocolo do manual de laboratório (Orkin 1990). A transformação das células competentes ocorreu por choque térmico (30 minutos no gelo e 1 minuto à 42°C -gelo). Após a transformação as células foram incubadas à 37°C por 1 h em meio líquido LB (Luria Bertani) sem penicilina. Após a incubação, as células foram semeadas em placas contendo: (100 µL em meio de cultura LB-ágar (1,5%) contendo Ampicilina (USB; 100 µg/mL), X-Gal (5-Bromo-chloro-3 indolyl-B-D-Galactoside- USB; 4 µg/mL), de maneira que apenas as células transformadas se desenvolveram no meio. As placas com o meio de células foram incubadas *overnight* a 37°C. Ao final da incubação as colônias brancas presentes na placas eram aquelas colônias transformantes com inserto.

Para verificar a presença do inserto no plasmídeo foi feita uma PCR de uma colônia, utilizando os primers M13 *Forward* e *Reverse*, que amplificam a região do plasmídeo que contém o inserto, foi feita para verificar a presença do inserto no plasmídeo. As colônias brancas foram selecionadas da placa de transformação e colocadas em uma solução de PCR, contendo 0,2 µL M13 F e 0,2 µL M13 R (100

pmol/ μ L), 2,5 μ L De tampão da Taq polimerase 10x, 5 mM de dNTPs, 50 mM de $MgCl_2$, completando o volume para 25 μ L com água ultrapura. Uma colônia azul, que contém o plasmídeo sem o inserto foi selecionada para ser o controle negativo. A temperatura de 94 °C por 30 segundos foi usada para separação das fitas, seguido da temperatura de pareamento específica dos primers de 55°C por 45 segundos e 72 °C por 40 segundos. O número de ciclos de reações foi de 40 ciclos. O resultado da PCR foi feito analisado em gel de agarose 1% com tampão 1x TBE, corado com brometo de etídio. Foram selecionadas colônias que amplificaram um fragmento com o tamanho esperado.

As colônias transformadas contendo os fragmentos (colônias brancas) foram selecionadas e cultivadas, em tubos Falcon, *overnight* à 37°C, sob agitação, em meio LB líquido com ampicilina (40mg/mL). Os plasmídeos foram extraídos utilizando o kit *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) ou *High Pure plasmid isolation* (Roche) seguindo o protocolo de cada fabricante. Para verificar a presença do inserto o plasmídeo foi clivado com a enzima EcoRI (digestão de 8 μ L de DNA por 2 horas à 37°C) e analisado em gel de agarose 1% com tampão 1x TBE, corado com brometo de etídio.

Os plasmídeos que continham o inserto foram enviados para o sequenciamento usando o sequenciador AB13730XL (Genetics Services in Anatomy Department, da Universidade de Otago, Dunedin, Nova Zelândia). Para cada 150ng/ μ L de DNA plasmidial foi adicionado: 1 μ L de primer M13 F, 1 μ L M13 R e o volume completado com água ultrapura para 5 μ L.

3.6.3.4. Linearização do plasmídeo, purificação do DNA plasmideal e transcrição *in vitro*

Os plasmídeos com os insertos de interesse foram linearizados com enzimas específicas (Tabela 2) nos dois sentidos de orientação de transcrição, isto para gerar as sondas *sense* e *anti-sense* de cada gene ou pri-miRNA em análise.

A reação de digestão consiste em 1 µg do plasmídeo purificado, 1µL da enzima de restrição 5' ou 3', 4 µL do tampão de reação específico para enzima, completando-se com água ultrapura para 50 µL, incubando a 37°C, *overnight*, para a digestão completa.

Depois de linearizado o plasmídeo foi extraído usando protocolo de fenol-clorofórmio, da seguinte forma: Adicionando-se 155 µL de água ultrapura na reação de digestão e 200 µL de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (Sigma), em um tubo de 1,5 mL. Seguiu-se com centrifugação por 5min na velocidade máxima. O sobrenadante formado foi colocado em um novo tubo (1,5 mL) e adicionou-se 200 µL de clorofórmio (*vortex*), em seguida centrifugou-se mais uma vez por 5min na velocidade máxima. Ao sobrenadante formado e colocado em um novo tubo (1,5 mL), adicionou-se 15 µL acetato de sódio (3M) e 375 µL de etanol absoluto gelado. Para a precipitação do DNA, deixou incubado a -20°C, *overnight*. Para a formação do *pelet*, foi feita a centrifugação por 20min na velocidade máxima, a temperatura ambiente. Ao sobrenadante formado, passado a um tubo novo com muito cuidado, adicionou-se 200 µL de etanol 70% para lavar o *pelet* formado. Em seguida, leva-se novamente a centrifugação por 5min na velocidade máxima. Todo etanol foi removido e o *pelet* foi deixado a 58°C para secar. O DNA plasmidial em 27 µL de água DEPC (RNAase free).

Para a transcrição de RNA *in vitro* foram adicionados nos 27 µL do plasmídeo purificado e linearizado 4 µL de DIG RNA *labeling mix* (10x) (Roche Applied Science), 2 µL RNase *Inhibitor* (Roche Applied Science), 2 µL T7 polimerase (Roche Applied Science), 2 µL T3 polimerase (Roche Applied Science), 4 µL de tampão de Transcrição (específico para as enzimas de transcrição) (Roche Applied Science) e 1 µL DTT (Roche Applied Science). Esta reação foi incubada a 37°C por 4h. Depois disso foi adicionado a cada reação 1 µL de DNase (Invitrogen) e incubadas por mais 15min a 37°C.

Para precipitar os fragmentos gerados, foram adicionados a cada reação 4µL de acetato de sódio 3 M e 100 µL de etanol absoluto, e foram incubados a -20°C, *overnight*. As amostras foram levadas a centrifugar por 30 min, a 4°C e 10000 rpm. O sobrenadante foi removido, com cuidado, e adicionou-se 200 µL de etanol 70% para lavar e remover os nucleotídeos não incorporados. Outra centrifugação foi feita a temperatura ambiente, a 10000 rpm, por 5 min. Mais uma lavagem com 200 µL de etanol 70% e outra centrifugação por (5 min, temperatura ambiente, a 10000 rpm) foram feitas. Ao remover o sobrenadante, o pellet (sonda de RNA) formado foi levado a 58°C para secar. Ele foi ressuspenso em 10 µL de água DEPC (RNAase free). Em seguida foram adicionados 50 µL de solução de hibridação e a sonda a -20°C.

3.6.4. Hibridação *in situ* (mRNA e pri-miRNA)

O metanol presente nos embriões fixados foi removido e os embriões lavados com 1 mL de Ptw (0,1% de Tween em PBS 1X).

Os embriões foram transferidos para um tubo de vidro contendo 2 mL de Ptw e submetidos a uma rápida sonicação, até antes que a solução fique turva. Este passo é crucial para que a membrana coriônica se solte. Nota: durante as sonicações resíduos se soltam dos embriões.

Os embriões em Ptw foram transferidos para uma placa de Petri para a dissecação. Com auxílio de um lupa, uma micro agulha ou pinça de dissecação todo o córion e toda membrana vitelínica foi removida.

Os embriões dissecados foram colocados em 1 mL em PTw e 1 μ L de Proteinase K (20 mg/mL) foi adicionado. Eles foram incubados nessa solução por 10min a temperatura ambiente.

Em seguida esta solução foi removida e os embriões foram levados a refixação com adição do 4% formaldeído (100 μ L de formaldeído 40% em 900 μ L de PTw), por 15 min a temperatura ambiente. A solução fixadora foi removida e os embriões lavados 3X com 1 mL PTw.

Logo após as lavagens, o Ptw foi removido e 1 mL da solução de hibridação foi adicionado. Os embriões com esta solução foram incubados por 2 h a 58°C, para sonda de mRNA, e a 60°C, *overnight*, para sondas de miRNA.

Pouco antes de acabar o tempo de incubação, foi feita a digestão da sonda, colocando um volume igual de sonda e tampão carbonato, e incubando por 10 min a 60°C. O volume da sonda digerida deve ser suficiente para que ela fique com uma concentração de 4 ng/ μ L durante a hibridação. Ao final da digestão, a sonda foi adicionada em 50 μ L de solução de hibridação.

A solução de hibridação dos embriões foi removida e a solução de hibridação contendo a sonda foi adicionada. Os embriões incubados por 48 h, a 60°C para sondas de pri-miRNA; e *overnight* a 58°C, para sondas de mRNA.

Ao final da incubação, a solução de hibridação com a sonda foi removida e 1 mL de tampão de lavagem foi adicionado e os embriões incubados por 5 min a 60°C (pri-miRNA) ou 58°C (mRNA). Estas lavagens foram repetidas mais 5X ao longo do dia. Depois da última lavagem, os embriões foram incubados *overnight*, a 60°C (pri-miRNA) ou a 58°C (mRNA).

Após incubação o tampão de lavagem foi removido e os embriões lavados 3X com 1 mL de PTw.

PTw+BSA foram adicionados aos embriões, por 30 min à temperatura ambiente. Esta solução foi removida e 1 mL da solução de anticorpo, anti-DIG (1:2000, diluído em PTw+BSA) foi adicionada. Os embriões foram incubados a 4°C *overnight* (pri-miRNA) ou temperatura ambiente, por 90min (mRNA) e após a incubação lavados 3X com PTw. Esta lavagem foi repetida mais 5X ao longo do dia com PTw, mantidos em leve agitação.

Pouco antes da última lavagem foi feito o tampão AP, que deve estar fresco.

Duas lavagens com tampão AP foram feitas, por 5min cada lavagem. Em 1 mL de tampão AP, foram adicionados 4,5 µL de NBT e 3,5 µL de BCIP (Tampão de coloração) e esta solução adicionada nos embriões.

A coloração foi monitorada sob estereomicroscópio, (sonda *sense* não deve corar os embriões e a *anti-sense* sim), os embriões foram lavados 3X com PTw. Metanol:PTw (1:1) foram adicionados aos embriões e incubados por 5 min. Eles foram lavados com metanol gelado até que os embriões ficassem com uma coloração característica azulada.

Os embriões foram reidratados com 1:1 metanol:PTw, por 5min, Em seguida foram lavados 3X com PTw. O Ptw foi removido e glicerol 70% adicionado e os embriões armazenados a 4°C, até a montagem das lâminas.

As lâminas foram visualizadas e as imagens obtidas utilizando microscópio Olympus BX61 do Laboratório de Evolução e Desenvolvimento, Departamento de Bioquímica, Universidade de Otago, Dunedin, Nova Zelândia, sob a supervisão do Professor Peter K. Dearden. As fotos foram editadas no CorelDRAW Graphics Suite X6.

3.6.5. Soluções:

Solução de hibridação:

50% formamida ultra-pura

4X SSC
 1X Denharts
 250 µL/mL de tRNA ou RNA total de levedura
 250 µL/mL de DNA de timo de vitelo
 50 µL/mL de heparina
 0,1% de Tween 20
 5% de sulfato de dextran

PBS 10X

1L
 2,56g de NaH₂PO₄
 11,94g de NaHPO₄
 102,2g NaCl
 pH 7,4

Tampão de Lavagem

50% de formamida, 2X de SSC, 0.1% de Tween 20
 (50 mL – 25 mL formamida, 5 mL de 20xSSC, 50 µL de Tween 20)

PTw

PBS + 0.1% Tween
 50 ml = 1xPBS de 50 mL e 50 µL of Tween 20.

PBTw + BSA:

PBS + 0.1% Tween + 0.1% BSA (Soroalbumina bovina)

Tampão AP: 100 mM de Tris 9.5, 100 mM de NaCl, 50 mM de MgCl₂, 0.1% de Tween 20

NBT (azul de 4-nitro cloreto de tetrazólio) (Roche): 75 mg/mL em DMF
 BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) (Roche): 50 mg/mL em DMF

20x SSC

500 mL: 87.5 g de NaCl, 44 g de Citrato de sódio

50x Denhardts

0.5 g Ficoll (tipo 400), 0.5 g polivinilpirrolidona, 0.5g BSA e água para 50 mL

Tabela 2: Nomes, sequencias, temperatura de ligação dos *primers*, tamanhos do fragmento gerado na amplificação, plasmídeo usado para clonar os fragmentos que geraram as sondas para hibridação *in situ*, e as enzimas de restrição utilizadas na linearização do plasmídeo contendo o fragmento de interesse.

Gene	Primers	Temperatura de amplificação	Tamanho do fragmento	Plasmídeos/Enzimas de restrição
<i>Ame-zelda/GB52047</i>	F 5'GTACTACGATGCCTCACCAG 3' R 5'TGATCATACCGTCCGTGTTTC 3'	60°C	411bp	pGem (5'ApaI; NdeI)
<i>pir-ame-miR-263b</i>	F 5' TCTCTCCACGACTGCAAGAA 3' R 5'ATTGTTGATCAAAGGATTCCTCA 3'	61°C	628bp	pGem (5'ApaI; 3'NdeI)
<i>pri-ame-miR-34</i>	F 5'TCATCGAATTCACCGTGGAG 3' R 5'TAATCACCAGGAGAATACTGA 3'	60°C	399bp	pBlue (5'BamHI; 3'HindI)
<i>pri-ame-miR-375</i>	F 5'GTACTTGTTTCGCGCTTCTC 3' R 5'CGCTGCATATACCACTGA 3'	62°C	403bp	pGem (5'ApaI; 3'NdeI)

3.7. Há diferença na expressão gênica entre embriões haploides e diploides no início da embriogênese? Os eventos e moléculas envolvidas na ativação do ovo e transição materno-zigótica são os mesmos quando considerados embriões haploides e diploides? (Questões 1 e 2)

3.7.1. Genes diferencialmente expressos

Foi feita uma busca por genes diferencialmente entre embriões haploides e diploides, expressos em cada fase do desenvolvimento embrionário analisada (0-1 h, 0-2 h, 0-6 h e 18-24 h). Para isto utilizamos o software DEGseq (Wang *et al.* 2010) no pacote R. Método MARS (*MA-plot-based method with random sampling model*) para determinar o *fold change* significativa (*p value* <0,001) entre cada biblioteca de embriões haploides e diploides, em um determinado ponto do desenvolvimento.

3.7.2. Coeficiente de correlação de Pearson

O coeficiente de correlação de Pearson mede a correlação linear, positiva ou negativa, entre duas matrizes, sendo que quanto mais perto de 1 mais correlacionado está a tendência entre as duas matrizes e quanto mais perto de -1 mais antagonicamente

relacionadas estão aquelas matrizes (Vieira 2008). Assim, este tipo de cálculo poderia nos indicar se existem genes com perfis de expressão antagônicos entre embriões haploides e diploides de *A. mellifera*.

Desta forma, foi gerado um coeficiente de correlação para cada gene (mRNA), usando como matriz 1 os valores de RPKM, de cada gene, das bibliotecas de ovócitos maduros, 0-1 h, 0-2 h, 0-6 h e 18-24 h de embriões haploides e como matriz 2 valores de RPKM de cada gene, das bibliotecas de ovócitos maduros e de embriões diploides de 0-1 h, 0-2 h, 0-6 h e 18-24 h. Lembrando que a biblioteca de ovócitos maduros é a mesma para haploides e diploides, uma vez que os ovos foram coletados em ovários de rainhas, antes de passar pelo oviduto. Foram considerados genes ou miRNAs com perfil de expressão antagônico entre os dois sexos, ou seja, negativamente correlacionados, com valores de coeficiente menores que -0,1.

O cálculo do coeficiente de correlação de Pearson foi feito usando programa Office Excel 2013 (Microsoft).

3.7.3. Busca por ortólogos de *Drosophila melanogaster*

Os genes identificados como diferencialmente regulados entre embriões haploides e diploides de até 24 h de desenvolvimento, foram convertidos em ortólogos de *D. melanogaster*, utilizando *scripts* em Python para efetuar o BLAST recíproco de genes de *D. melanogaster* contra os genes de *A. mellifera* e vice-versa.

3.7.4. Busca por funções dos genes diferentemente regulados

Os genes expressos exclusivamente em embriões haploides, ou diploides, os que mostraram perfil de expressão antagônico entre os dois tipos de embriões e os genes diferencialmente expressos em cada fase do desenvolvimento foram usados em uma

busca por genes ligados à ativação do ovo (Horner & Wolfner 2008; Stetina & Orr-Weaver 2011; Krauchunas *et al.* 2012), dentre os genes diferencialmente expressos em 0-1 h e 0-2 h; transição materno-zigótica (Grosshans *et al.* 2003; Gilbert 2010; Sung *et al.* 2013), dentre os genes diferencialmente expressos em 0-6 h e 18-24 h; e genes envolvidos em outros processos relacionados à embriogênese de *A. mellifera* (Dearden 2006; Dearden *et al.* 2006b; Wilson & Dearden 2008, 2009; Wilson *et al.* 2010a; Wilson *et al.* 2010b; Wilson *et al.* 2011), dentre os genes diferencialmente expressos em 0-6 h e 18-24 h.

A relevância funcional dos genes diferencialmente expressos, exclusivos e com perfis de expressão antagônicos entre embriões haploides, diploides e ovócitos maduros, foi baseada em uma análise usando o banco de dados de Gene Ontology (GO), sem definição do nível de especificidade do GO, pelo software DAVID 6.7 (Dennis *et al.* 2003; Huang *et al.* 2009) usando os parâmetros *default*.

Uma busca para os genes selecionados foi feita na literatura na tentativa de encontrar genes ou miRNAs que foram marcados por hibridação *in situ*. Esta busca foi feita no banco de dados Fly-FISH (<http://fly-fish.ccbr.utoronto.ca/>) e BDGP *in situ* homepage (<http://insitu.fruitfly.org/>), bancos de dados e de imagens de genes usados em hibridações *in situ* de embriões de *Drosophila melanogaster*, a fim de enriquecer embasar nossas inferências.

3.8. Há a participação de moléculas reguladoras, como os miRNAs, específicas para cada tipo de embrião? (Questão 3)

A construção da rede de regulação de genes por miRNA no início da embriogênese de *A. mellifera* nos permite comparar se a diferença existente entre os dois tipos de embriões é devida a regulação por miRNAs. Para gerar redes de regulação foi feita predição de alvos em dois passos, como feito por Dong *et al.* (2010) e Zhang *et al.* (2012) para geração de redes de regulação miRNA:MRNA.

3.8.1. Predição de alvos para os miRNAs

Para o conjunto de miRNAs identificados como expressos no início da embriogênese (ovócito, 0-2 h, 0-6 h e 18-24 h) de embriões haploides e diploides foi feita a predição de alvos, buscando por estes dentro do conjunto de genes expressos no mesmo período de desenvolvimento. A predição foi feita separadamente nos dois tipos de embriões, haploides e diploides, seguindo os passos descritos abaixo:

3.8.1.1. Correlação de Pearson

Neste passo considerando a função básica do miRNA: miRNA regula negativamente o mRNA-alvo (Bushati *et al.* 2008a; Cifuentes *et al.* 2010; Giraldez 2010; Guo *et al.* 2010; Somel *et al.* 2010; Bethune *et al.* 2012), qualquer mRNA com perfil de expressão antagônico ao de um miRNA é considerado um gene-alvo em potencial daquele miRNA. Neste sentido, foi feito o cálculo do coeficiente de correlação entre os valores de expressão dos miRNAs e dos mRNAs expressos na embriogênese de zangão, onde uma das matrizes utilizadas corresponde aos valores de expressão de miRNAs e a segunda aos valores de expressão dos genes, nos pontos de desenvolvimento embrionário de zangão (2 h, 6 h e 24 h), além do ovócito maduro. Assim, foi possível selecionar os pares miRNA:mRNA menos correlacionados. Foram considerados com perfil de expressão antagônico aqueles pares que apresentaram coeficiente de correlação com valores menores que -0,8.

O cálculo do coeficiente de correlação de Pearson foi feito com auxílio de *script* em Python.

3.8.1.2. Identificação de sítios de pareamento miRNA:mRNA

Utilizando os pares miRNA:mRNA com coeficientes de correlação menores que -0,8, foi feita uma predição de genes-alvos usando a região 3'UTR dos possíveis alvos. Para esta análise foi usado o algoritmo miRanda (Enright *et al.* 2003), que procura por *match* de complementaridade entre miRNAs e 3'UTRs usando algoritmo de programação dinâmica (Fase 1) e o cálculo termodinâmico (Fase 2). Consideramos -15 o mínimo de energia livre aceito para um par miRNA:gene-alvo.

3.8.2. Construção das redes de regulação (miRNA:mRNA)

Os pares miRNA:mRNA de perfis de expressão antagônicos e apresentaram energia livre de pareamento de -15 na 3'UTR do gene, foram selecionados e utilizados na construção das redes de regulação miRNA: mRNA de embriões diploides e de embriões haploides de *A. mellifera* de até 24 h de desenvolvimento embrionário. Portanto, foram geradas duas redes de regulação, uma para cada tipo de embrião. O software Cytoscape versão 2.8.0 (<http://cytoscape.org/>) foi utilizado para a construção das redes. Consideramos para a construção das redes de regulação apenas os genes que tem ortólogos em *Drosophila*, obtidos como descrito acima.

A sobreposição entre as redes de regulação do início da embriogênese de embriões diploides e haploides de *A. mellifera* foi feita utilizando o software Cytoscape versão 3.0 (<http://cytoscape.org/>). Desta forma, buscou-se identificar semelhanças e diferenças entre os dois tipos de embriões, desancando-se moléculas exclusivas de cada tipo de embrião. Desta forma, foram geradas três redes de regulação: Uma rede exclusiva de embriões haploides, outra exclusiva de embriões de diploides e outra com moléculas que atuam na regulação do início da embriogênese de *A. mellifera*, independente da ploidia.

Alguns genes e miRNA evidenciados nas redes e resultantes da busca na literatura foram marcados (Tabela 2) utilizando o protocolo descrito acima para hibridação *in situ*, afim de enriquecer as inferências sobre possível função. Lembrando que foram feitas buscas por trabalhos semelhantes com *A. mellifera* e informações disponibilizadas no banco de dados Fly-FISH (hibridação *in situ* em embriões de *D. melanogaster*).

3.9. Qual a origem – materna ou zigótica - das moléculas reguladoras do início da embriogênese de *A. mellifera*? O genoma zigótico é ativado em até 24 h de desenvolvimento de *Apis mellifera*? Esta ativação é diferente entre embriões haploides e diploides?

3.9.1. Genes maternos e genes zigóticos

As redes de interação gênica foram usadas para identificar a origem dos genes e miRNAs que atuam nos passos iniciais da embriogênese. Para isso, foram classificados em duas classes os miRNA e mRNA maternos: classe I, genes e miRNAs expressos exclusivamente em ovócitos maduros; e classe II, genes e miRNAs expressos em ovócitos maduros mas que tem sua expressão diminuída em mais de 5 RPKM em 0-2 h e/ou 0-6 h, até zerar em 18-24 h.

Para localizar os genes zigóticos consideramos três classes: classe I, genes e miRNAs não expressos em ovócitos maduros e expressos em alguma das fases da embriogênese analisadas; classe II, genes e miRNAs expressos em ovócitos maduros, mas que aumentam a sua expressão em mais que 5 RPKM nas fases 0-2 h e ou 0-6 h, continuando a se expressar, mesmo que baixos níveis, em 18-24 h; classe III; genes e miRNAs que se expressam em ovócitos maduros, são degradados em 0-2 h e/ou 0-6 h, e voltam a se expressar em 18-24 h. Considerando que genes que se expressam durante a clivagem (em abelhas de 0 a 7 h), precisam ser rapidamente processados, incluímos nas classes I e II de genes zigóticos expressos durante 0-2 h e 0-6 h apenas aqueles que não possuem íntrons, fato sugerido por Rothe *et al.* (1992), Mcknight and Miller (1976), Shermoen and Ofarrell (1991) e Biedler *et al.* (2012). Os genes e miRNAs que por ventura não se encaixaram em nenhuma das classes chamamos “não definidos”.

A classificação dos processos biológicos dos genes classificados como maternos e zigóticos, de cada classe em cada tipo de embrião, foi baseada em uma análise usando o banco de dados de Gene Ontology (GO), sem definição do nível de especificidade do GO, pelo *software* DAVID 6.7 (Dennis et al. 2003; Huang et al. 2009) usando os parâmetros *default*. Lembrando que para esta busca nós utilizamos os genes com ortólogos em *Drosophila*.

A partir das redes de regulação miRNA:mRNA geradas para responder a questão 3 (Rede Exclusiva de Embriões Haploides, Rede Exclusiva de Embriões Diploides e Rede Compartilhada) foi feita uma busca pelos genes classificados como maternos e zigóticos que seriam regulados por miRNAs. Assim, seria possível definir se existem miRNA maternos regulados por miRNAs zigóticos e vice-versa.

3.9.2. Expressão e localização de pri-miRNAs

A classificação de miRNAs maternos e zigóticos adotada é baseada na expressão dos miRNAs maduros. Desta forma, não seria possível saber se eles são produzidos pelo zigoto ou apenas processado por ele, ou até mesmo apenas herdado da mãe. Como o protocolo de hibridação *in situ* usado para caracterizar a expressão de miRNAs é baseada na marcação de pri-miRNAs dentro de núcleos, a presença deste transcrito primário precursor de miRNA (Lucas & Raikhel 2013) dentro do núcleos de embriões de 0-2 h e 0-6 h poderia indicar que o embrião estaria transcrevendo pri-miR. O pri-miRNA é o transcrito primário de miRNA que está presente somente no núcleo (Bartel 2007; Lucas & Raikhel 2013) e portanto se algum pri-miRNA estiver presente no início da embriogênese é um outro sinal de que a transcrição zigótica estaria acontecendo.

Além disso, nós utilizamos na reação da polimerase em cadeia (PCR), oligonucleotídeos que amplificariam o pri-miRNA (Tabela 3), usando como *template* o cDNA total obtido a partir do RNA total de ovócitos maduros, 0-2 h e 0-6 h de embriões haploides e diploides de *A. mellifera*.

A coleta e extração do RNA de embriões foram feitas como descrita nos itens 3.1 e 3.2.

A reação de transcriptase reversa, para a obtenção do cDNA foi feita como descrito anteriormente (item 3.6.3.2) e PCR foi feita segundo as descrições abaixo:

A amplificação de pri-miRNA a partir do cDNA: 10 µL de Master Mix (Promega), 7 µL de água ultrapura autoclavada, 1 µL de cada iniciador específico (10 pmol/µL) e 1 µL de cDNA, sem diluição. A temperatura de 95 °C por 30 segundos foi usada para separação das fitas de cDNA, 60°C para o pareamento específico de cada iniciador por 45 segundos e 72 °C por 30 segundos. Os produtos da amplificação por PCR foram analisados em géis de agarose 2,0% (Amersham-Pharmacia Biotech), em tampão TBE 1x (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0) e contendo 0,5 µg de brometo de etídio por mL de gel. O tamanho dos fragmentos amplificados (Tabela 3) 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.

Tabela 3: Nome, sequência dos *primers* e tamanho dos fragmentos gerados na amplificação por PCR de pri-miRNAs. U6 foi usado como controle endógeno. O esquema ao lado destaca como foram desenhados os primers para amplificação de pri-microRNAs.

Nome	Oligos nucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	Tamanho do fragmento
pri-miR-375	F 5' ATCGATTGAATTATCAGTTTGG 3' R 5' CATCCATTTCAGTTTGATAACTC 3'	99nt
pri-miR-34	F 5' GGAGGGAATGCTTGACGAAA 3' R 5' CCCTACGATCGTCATAATTG 3'	140nt
pri-miR-263b	F 5' GTGGAGGAAAACGAGGAGAA 3' R 5' TCGGTATCCAACAAGTGTG 3'	130nt
U6	F 5' CGATACAGAGAAGATTAGCATGG 3' R 5' GTGGAACGCTTCACGATTTT 3'	65nt

Além disso, foi definido o perfil de expressão dos componentes da biogênese de miRNA no início da embriogênese. A presença da maquinaria de biogênese de miRNA em embriões de 2 h ou 6 h poderia indicar se o embrião é capaz de processar miRNAs precursores. Para isso, utilizou-se as moléculas ortólogas envolvidas na biogênese de miRNA em insetos (Lucas & Raikhel 2013).

3.9.3. Conservação de reguladores da transição materno-zigótica

Como já dito anteriormente *smaug* e *Zelda* são moléculas envolvidos na regulação da transição materno zigótica em *D. melanogaster* (ten Bosch *et al.* 2006; Tadros *et al.* 2007a; Hsiao-Lan *et al.* 2008; Benoit *et al.* 2009). Smaug atua na degradação de mRNAs maternos e age na ativação de genes zigóticos durante a essa transição (Bushati *et al.* 2008b).

3.9.3.1. *Smaug*

Para avaliar se *smaug* tem função conservada em *A. mellifera* determinamos o perfil de expressão deste gene nos dois tipos de embrião. Além disso, foi feita uma busca por ortólogos de genes regulados por Smaug em *Drosophila* descritos por Siddiqui *et al.* (2012). Os autores definiram dois conjuntos de genes regulados por *smaug*: 1. Conjunto de genes que tem sua expressão diminuída de 3 para 5 h de desenvolvimento; 2. Conjunto de genes, já descritos como zigóticos que aumentam sua expressão de 3 para 5 h (Anexo 4). Os autores acima citados definiram estes conjuntos comparando resultados de *microarray* de células polares germinativas de embriões de *Drosophila* de 3 h, 5 h e 7 h, selvagens e mutantes para *smaug*. Para localização de ortólogos desses dois conjuntos de genes dentro dos nossos dados, consideramos genes relativos ao conjunto 1, aqueles que diminuem a expressão de 0-6 h até 18-24 h, nos dois dos tipos de embriões, por mais de 5 RPKM. Conjunto 2, aqueles genes que aumentam sua expressão de 0-6 h para 18-24 h, nos dois tipos de embrião, por mais de 5 RPKM. Normalizamos os tempos de desenvolvimento 0-6 h e 18-24 h em *A. mellifera* como correspondentes aos embriões de 3 h e 5 h de *Drosophila*, que seria o período de formação da blastoderme em ambos (Nelson 1915; Campos-Ortega & Hastenstein 1997).

Para avaliar se os genes de cada conjunto (conjunto 1 e conjunto 2), supostamente regulados por *smaug* em *A. mellifera*, também podem estar sendo regulados por miRNAs e se estes genes foram anteriormente classificados como maternos ou zigóticos, nós buscamos nas redes definidas para responder na questão 3 por estes genes, destacando a origem (materno ou zigótico) de cada gene e miRNA regulador.

3.9.3.2. *Zelda*

Zelda é um fator de transcrição que atua na ativação do genoma zigótico em *Drosophila* ligando-se a motivos conservados chamados TAGteam, na região do promotor de genes zigóticos (ten Bosch *et al.* 2006; Hsiao-Lan *et al.* 2008). Em *A. aegypti* também foram encontrados cis-elementos aparentemente homólogos à sequência TAGteam de *Drosophila*, em genes expressos também no início da embriogênese desse mosquito (Biedler *et al.* 2012). Por isso, foi feita uma busca pelo ortólogo de *Zelda* (*Vfl* - vielfaltig) em *A. mellifera*, traçando seu perfil de expressão em ovócitos, embriões haploides e diploides de até 24 h de desenvolvimento. Além disso, para validar e caracterizar a expressão desse ortólogo em embriões de *A. mellifera*, foi feito o ensaio de hibridação *in situ*, seguindo o protocolo descrito acima.

Uma vez que *zelda* está presente em embriões de abelhas, foi feita uma busca por motivos semelhantes às sequências descritas em *Drosophila* e *Aedes*, dentre os genes classificados como zigóticos (classes I, II e III), em embriões haploides e diploides de *A. mellifera* de até 24 h de desenvolvimento, separadamente.

Estes genes então foram submetidos a uma busca por motivos conservados, utilizando o software SCOPE (<http://genie.dartmouth.edu/SCOPE/>) (Carlson *et al.* 2007), que agrupa três algoritmos para essa busca e retorna as sequências consenso do motivo mais bem pontuado de acordo com o valor de significância e de cobertura, em

porcentagem. Nós fizemos a busca nos 1000bp *upstream* ao códon de iniciação de transcrição, utilizando a sequência de DNA dos genes correspondentes, anotadas de acordo com a versão 4.5 do genoma de *A. mellifera*. As sequências dos promotores foram obtidas utilizando *scripts* em Perl.

Os motivos considerados foram aqueles que tiveram significância e cobertura maiores que 80%, para cada conjunto de genes. Os motivos que obtiveram estes valores foram selecionados para a comparação com os motivos TAGteam utilizados por Biedler *et al.* (2012) para comparação entre motivos de *Drosophila* e de *Aedes*. Desta forma, foi feito um alinhamento por matriz de peso de posição (PWM), dos motivos de *A. mellifera*, gerados no SCOPE e as sequências dos motivos TAGteam (ten Bosch *et al.* 2006; De Renzis *et al.* 2007) e as matrizes de peso de posição utilizadas por Biedler *et al.* (2012), usando STAMP (<http://www.benoslab.pitt.edu/stamp/>). Este programa retorna o alinhamento entre os motivos com o valor de significância *e* (*e-value*). Quanto mais perto de 0 (zero) estiver o *e-value*, maior a probabilidade daquele motivo ser homólogo ao motivo TAGteam, ao qual *zelda* se liga (ten Bosch *et al.* 2006; Hsiao-Lan *et al.* 2008) em *Drosophila*. Desta forma, os genes que apresentarem em seu promotor o motivo que melhor se alinha com o um motivo TAGteam seriam considerados candidatos à regulação por *zelda* em *A. mellifera*.

Conhecendo a origem dos transcritos identificados no início da embriogênese de abelhas, podemos começar a responder parte da questão 5, pois assim saberíamos quando ocorre a ativação do genoma zigótico e se este processo ocorre diferentemente nos dois tipos de embriões, haploides ou diploides.

Os gráficos presentes neste trabalho foram feitos no Prism 5 (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>) ou Excel (Microsoft Office 2013) e editados no Corel Draw v6.0 (<http://www.corel.com/corel/>).

4. RESULTADOS

4.1. Descrição das bibliotecas

4.1.1. Identificação dos mRNA

O mapeamento das *reads*, tanto das bibliotecas de pequenos RNAs quanto mRNAs, foram feitas utilizando o programa BWA. Este programa gera um arquivo de saída no formato SAM. A partir desse arquivo foi feita a contagem das *reads*. Foram consideradas as *reads* unicamente mapeadas.

Podemos observar que o mapeamento das sete bibliotecas de mRNAs (RNA > 200 pb) apresentam basicamente genes codificadores anotados para *A. mellifera* (Tabela 4). Na preparação das bibliotecas os RNAs são recuperados pela cauda poliA (TruSeq™ RNA Sample Preparation Guide. Illumina Genome Analyzer, Life Sciences). Procedimento que garante que estas bibliotecas estejam enriquecidas com apenas *reads* correspondentes aos mRNAs.

A contagem do número de *reads* por gene foi feita por *scripts* customizados em *Python*. O valor encontrado foi normalizado pelo cálculo de RPKM. Na Figura 3 podemos observar número total de genes e os exclusivos expressos de cada fase do desenvolvimento embrionário de *A. mellifera* (embriões haploides e diploides), independente da expressão de cada gene (RPKM). Os perfis do número de genes são praticamente iguais em cada tipo de embrião, sendo que na biblioteca de 18-24 h a quantidade de genes expressos em embriões haploides (14186) é maior que em embriões diploides (13591) de mesma idade de desenvolvimento. (Anexo 1).

A diminuição observada no número de genes expressos em embriões haploides e diploides com 2 h e 6 h de desenvolvimento pode ser devida a degradação dos mensageiros de origem materna (Bushati *et al.* 2008b; Tadros & Lipshitz 2009a), que pode estar ocorrendo em número maior que a transcrição de genes zigóticos, já que não

sabemos quando este processo realmente se inicia em abelhas. Em *Drosophila*, o genoma zigótico está ativo no 13º ciclo de clivagem, quando os núcleos já estão migrando para a periferia na formação da blastoderme (Alberts 2010). Entre 18 e 24 h a blastoderme está em formação (Nelson 1915). Se este neste período o genoma zigótico já estiver ativo e os genes maternos já estejam quase totalmente degradados (Tadros & Lipshitz 2009), podemos justificar o aumento do número de genes expressos nesta fases nos dois tipos de embriões, como mostrado na Figura 3.

Tabela 4: Número de *reads* totais mapeadas (porcentagem) em cada tipo de transcrito do banco de dados da Tabela 1 em cada fase do desenvolvimento analisada, pelo total de *reads* unicamente mapeadas de cada biblioteca de mRNAs correspondente.

	miRNA	Genes	Noncode	rRNA	tRNA	Patógenos
Ovócitos maduros	0,000607	99,6684559	0,25122899	0,0154047	6,26E-05	0,064240811
0-1 h_diploide	4,733E-06	0,996136437	0,00248871	0,00015736	9,8598E-08	0,001212657
0-2 h_diploide	0,0005418	99,9317795	0,04916574	0,00215447	1,29E-05	0,016345578
0-6 h_diploide	0,0006639	99,8422625	0,13339142	0,00224294	2,25E-05	0,021416742
18-24 h_diploide	0,0016166	77,3823303	0,38041535	0,00457216	3,38E-05	0,06392016
0-1 h_haploide	8,424E-06	0,997221562	0,00242382	2,5989E-05	1,79E-07	0,000320027
0-2 h_haploide	0,0003817	99,9093272	0,06426309	0,00380876	2,60E-05	0,022193192
0-6 h_haploide	0,0007947	99,8620808	0,12201196	0,001581	3,38E-05	0,013497702
18-24 h_haploide	0,0020662	99,4984596	0,35203027	0,04538166	7,41E-05	0,10198815

Figura 3: Número de genes expressos em cada fase do desenvolvimento embrionário analisada baseado na contagem de genes a partir das bibliotecas de mRNA. A base de dados utilizada prevê ao redor de 15000 genes para *Apis mellifera* (Genoma 4.5).

4.1.2. Identificação de pequenos RNAs

A Figura 4 mostra o perfil de transcritos, de acordo com a porcentagem de *reads*, de cada biblioteca de pequenos RNAs, de embriões diploide e haploides e ovócitos maduros, mapeadas no banco de dados da Tabela 1. O anexo 1 traz o número de *reads* mapeados em cada tipo de transcrito. Podemos observar que a porcentagem de *reads* mapeadas em genes codificadores (Figura 4) é maior todas as bibliotecas. RNAs não codificadores (noncode) foram os segundo tipo de RNA que tiveram mais *reads* mapeadas em todas as bibliotecas. A presença de muitas *reads* mapeadas em genes de patógenos na biblioteca de ovócitos maduros também chama muita atenção. A quantidade de miRNAs é relativamente baixa em relação aos outros transcritos, nas fases analisadas.

No preparo das bibliotecas de pequenos RNAs existe um passo onde são separados os mRNA dos pequenos RNAs, por exclusão dos mRNA pela cauda poli A. Então os adaptadores se ligam especificamente em RNAs que possuem uma 3'OH livre, que são na sua maioria os pequenos RNAs (TruSeq™ Small RNA Sample Preparation Guide. Illumina Genome Analyzer, Life Sciences). Mas se durante a preparação ocorreu a degradação de RNAm, eles ficariam com a 3'OH livre, permitindo então que fragmentos de mRNAs sejam sequenciados junto com pequenos RNA. Este fato explicaria o alto número de *reads* mapeando em genes anotados (Figura 4).

Na biblioteca de ovócitos maduros o número de patógenos é maior que nas outras bibliotecas, o que pode ser um vestígio de transmissão vertical dos genes de patógenos, que estariam presentes nas rainhas e estes por sua vez foram transmitidos aos ovários e ovos, juntamente com outras substancias que como mRNA e proteínas (Cruz-Landim 2009). Este fato precisa ser investigado, uma vez que a quantidade de *reads* mapeadas em patógenos variam entre as fases analisadas.

Podemos notar que apesar do número de *reads* ser maior nas fases de 0-2 h e 0-6 h de ambos os tipos de embrião, o número de miRNAs expressos é menor do que em ovócitos maduros (Figura 5), sugerindo que os miRNAs destas fases podem ter múltiplos alvos, já que o número de genes também diminui nessas fases (Figura 3). Não podemos afirmar que a degradação de mRNA nestas fases são devidas a ação de miRNAs, mas que os miRNAs presentes são extremamente importantes nestas fases.

De qualquer forma, o número de miRNAs aumenta junto com o número de células, já que este aumento está de acordo com o avanço do desenvolvimento (Figura 5). Isto porque o aumento consecutivo de transcrições e transcrições “de novo” de genes que, regulados por miRNAs também aumentam no decorrer da embriogênese. Além disso, na transição materno-zigótica há evidências de que miRNAs estejam envolvidos na via de degradação zigótica, como ocorre, por exemplo, em *D. melanogaster*. Nesta espécie, a família *miR-309*, composta por genes sintetizados na transcrição zigótica, participam da desestabilização de vários mRNA maternos (Benoit *et al.* 2009).

Há uma variedade de RNAs não codificadores, incluindo piRNA e longNoncode, entre outros transcritos, que são classificados como *noncode* no banco de dados (Tabela 1). Em todas as bibliotecas os *noncode* tiveram muitas *reads* mapeadas (Figura 5). Como estas bibliotecas são enriquecidas pra RNAs não codificadores é esperado que muitas *reads* estejam mapeadas nestes tipos de transcritos. Além disso, muitos noncodes, como piRNA, são podem estar envolvidos na degradação de RNAs maternos no início da embriogênese de *Drosophila* (Rouget *et al.* 2010).

Para o cálculo do RPKM dos miRNAs expressos nas bibliotecas, as *reads* de 19 a 24 pb foram separadas e mapeadas em um banco de dados contendo sequências *hairpin* de miRNAs descritos para *A. mellifera*. Assim, foram determinados os miRNAs expressos em cada fase analisada, bem como, se este miRNA é 5p (fita 5') ou 3p (fita 3').

Conhecer qual o miRNA está agindo naquela fase, se é 5p ou 3p (alguns trabalham chamam de miRNA maduro e miRNA*) é importante, uma vez que seus alvos podem ser diferentes ou ainda pode ocorrer a disputa por um mesmo alvo. Vários trabalhos foram desenvolvidos, incluindo a predição de alvos usando as duas fitas do miRNA, mostrando que os braços podem ter expressão e utilização diferentes dentro das células (Cristino *et al.* 2011; Courteau *et al.* 2012; Rubio *et al.* 2012).

Figura 4: Número de *reads* mapeadas (porcentagem) em cada tipo de transcrito do banco de dados da Tabela 1 em todas as bibliotecas de pequenos RNAs de cada fase do desenvolvimento analisadas e em cada tipo de embrião. Obs: o número de *reads* mapeadas em miRNAs, pelo total na biblioteca de ovócitos maduros é de 0,0019569722611 (0,195697%), por isso não é possível visualizar no gráfico a barra correspondente a este transcrito em ovócitos maduros.

Para a segunda abordagem de mapeamento das bibliotecas de pequenos RNAs, estas foram enriquecidas de forma que apenas *reads* de 19-24 nt foram utilizadas para identificação de miRNAs expressos em cada biblioteca. Os miRNAs identificados foram normalizados pelo cálculo do RPKM.

A quantidade de *reads* mapeadas em miRNAs é relativamente baixa em relação aos outros transcritos (Figura 4; 0,195697%) no entanto, há um sensível aumento à medida que o desenvolvimento progride. Entretanto, quando observamos o gráfico que mostra o número de miRNAs expressos em cada fase analisada independente da expressão (independentemente do número de *reads* mapeadas, dado em RPKM)

observamos que esse número diminui em 0-2 h e 0-6 h e volta a aumentar em 18-24 h em ambos os tipos de embriões (Figura 5). Importante notar que nas primeiras fases do desenvolvimento (0-2 h e 0-6 h) o número de miRNAs expressos em embriões diploides é maior que em haploides, sendo esses números bem próximos na fase de 18-24 h (114 miRNA em diploides e 113 em haploides) (Anexo 1).

Figura 5: Número de miRNAs expressos em cada fase do desenvolvimento embrionário analisada, baseado na contagem de miRNA a partir das bibliotecas de pequenos RNAs. A base de dados utilizada prevê 234 miRNAs (5q e 3p) para *Apis mellifera*.

4.2. Hibridação *in situ*

Três miRNAs e dois mRNA foram analisados por hibridação *in situ*, com sondas construídas com nucleotídeos marcados com Digoxigenina (DIG). O anticorpo para DIG (anti-DIG) é incorporado à sonda *antisense* hibridada ao RNA complementar durante o processo de hibridação *in situ*. Este anticorpo reage com a solução de coloração (Tampão AP) e revela uma cor azulada, indicando onde ocorreu a hibridação da sonda *antisense* do RNA correspondente. Como a sonda *sense* apresenta a mesma sequência que seu RNA *template*, ela não hibridiza. Então, esta reação funcionaria como um controle negativo, no qual não aparece nenhuma coloração (Osborne & Dearden 2005a). Os resultados das hibridizações estão mostrados ao longo dos resultados, de acordo com as questões a serem respondidas.

Os controles *sense* foram feitos em uma fase inicial (até 24 h) e tardia (24 h a 72 h) do desenvolvimento embrionário, dando preferência para fases onde o gene ou miRNA tem alta expressão, fases onde foram feitos ensaios com embriões haploides e em fases aleatórias (embriões coletados sem controle de idade). Os controles estão dispostos de acordo com a apresentação dos resultados. Os cinco genes (dois mRNA e três miRNAs) estão expressos nas fases de 0-2 h a 68-72 h do desenvolvimento embrionário de abelhas, em embriões diploides, principalmente.

O *Ame-eve* (GB49029 - *even skipped*), por ser um gene importante no processo de ativação do genoma zigótico e na embriogênese de *A. mellifera*, presente em vários momentos do desenvolvimento, foi utilizado como um controle positivo durante os ensaios. Para isso foi usado um fragmento clonado no plasmídeo pGEM, presente no banco de clones do Laboratório de Evolução e Desenvolvimento, Departamento de Bioquímica, Universidade de Otago. Este gene foi marcado em todas as fases analisadas com marcações característica de genes *pair-rule* como descrito em *A. mellifera* por Wilson *et al.* (2010a) e Wilson and Dearden (2012) (Figura 8).

Foi possível observar também a marcação de mRNA codificador de *zelda* (*Ame-vfl*/GB52047 - *vielfaltig*) na fase inicial do desenvolvimento, onde a coloração aparece ao redor dos núcleos principalmente (Figura 32). As sondas utilizadas para hibridação de mRNA marcam aqueles que foram recentemente transcritos (Osborne & Dearden 2005a). Por isso, observamos a marcação predominante ao redor dos núcleos (Figura 32).

4.3. Questões 1 e 2

4.3.1. Genes diferencialmente expressos

A Figura 6 resume o número de genes diferencialmente expressos encontrados em cada fase da embriogênese analisada dos embriões haploides e diploides, além do gráfico

gerado por DEGseq quando usamos o método MA-plot representando em pontos vermelhos os genes diferencialmente expressos, em cada ponto do desenvolvimento. No anexo 2 está a Tabela completa com os valores de *fold change* e *p-value* para cada gene diferencialmente expresso encontrados por DEGseq.

Figura 6: Número total de genes (eixo vertical; sem escala) diferencialmente expressos entre embriões haploides e diploides nas fases de 0-1 h, 0-2 h, 0-6 h e 18-24 h. Para cada conjunto de gene avaliado por DEGseq, foi gerado um gráfico Vulcano, que representa em pontos vermelhos os genes diferencialmente expressos. Para cada conjunto de gene em cada fase representamos o número de genes expressos em ovócitos maduros, que possuem expressão antagônica entre os dois tipos de embriões de até 24 h de desenvolvimento (coeficiente de correlação menor que -0,1), números de ortólogos em *Drosophila* e número de processos biológicos relevantes (Tabela 5), dado por análise de Gene Ontology (GO). Além disso, representamos na figura o número de genes ligados à ativação do ovo (0-1 h e 0-2 h), à Transição

Materno-Zigótica (0-6 h e 18-24 h) e em outros processos da embriogênese de *A. mellifera* (0-6 h e 18-24 h).

4.3.2. Genes com perfis de expressão antagônicos

Com o cálculo da correlação de Pearson encontramos 2015 genes com coeficiente de correlação menor que - 0,1 entre os dois tipos de embriões (Anexo2).

Para responder as questões 1 e 2, selecionamos os genes diferencialmente expressos em cada fase e aqueles expressos em ovócitos maduros, que teriam perfis de expressão antagônicos entre os dois tipos de embrião (Anexo 2). Foi feita a busca por genes ortólogos e processos biológicos (Tabela 5) mais relevantes em cada conjunto de gene. Além disso, foi feita uma busca dirigida por localização de genes que estariam envolvidos na ativação do ovo (Grosshans *et al.* 2003; Wolfner 2009; Gilbert 2010; Stetina & Orr-Weaver 2011; Krauchunas *et al.* 2012; Sung *et al.* 2013), dentre os genes diferencialmente expressos em 0-1 h e 0-2 h; uma busca dirigida pelos os genes da transição materno-zigótica (Grosshans *et al.* 2003; Gilbert 2010; Sung *et al.* 2013), entre os genes diferencialmente expressos em 0-6 h e 18-24 h; e, ainda, genes relacionados a outros processos da embriogênese (Dearden 2006; Dearden *et al.* 2006; Wilson & Dearden 2008, 2009; Wilson *et al.* 2010a; Wilson *et al.* 2010b; Wilson *et al.* 2011), em 0-6 h e 18-24 h.

Dentre esses genes determinamos a localização de *Mael* (GB54808/*Mael-maelstrom*), *EDTP* (GB46257) e *yl* (GB40823/*Yolkless*), por hibridações *in situ* nos estágio iniciais da embriogênese de *Drosophila* (Figura 7), retiradas do FlyFish (<http://fly-fish.ccbr.utoronto.ca/>), comparado com perfil de expressão encontrado em nossas bibliotecas. Além desses genes, também foram feitas hibridações *in situ* para *Ame-eve* (GB49029 - *even skipped*) (Figura 8) em embriões diploides de *A. mellifera* em várias idades. Estes genes foram selecionados de acordo com a função já descrita, sua

expressão diferencial em cada fase do desenvolvimento embrionário e perfil de expressão diferencial entre os dois tipos de embriões.

Na tentativa de conhecer funções dos genes diferencialmente expressos entre os dois tipos de embriões nas fases analisadas, foram feitas buscas por processos biológicos, utilizando o *software* DAVID. As Tabelas 5-A, B, C e D mostram os principais processos biológicos para cada conjunto de genes diferencialmente expressos. No anexo 2 é possível observar todos os processos biológicos encontrados.

Figura 7: Localização por hibridação *in situ* dos genes *EDTP* (GB46257), *Mael* (GB54808/*Mael*- maelstrom) e *yl* (GB40823/*Yolkless* em embriões de *Drosophila* nos estágios 1-3 e 4-5 (A, B, D, E, G, H) (<http://fly-fish.ccbr.utoronto.ca/>; <http://insitu.fruitfly.org/>). Expressão (DGE) destes mesmos genes em estágios iniciais da embriogênese em embriões de *Apis mellifera* (C, F e I) e informações adicionais, experimentais e da literatura.

Tabela 5: Principais Processos Biológicos de genes diferencialmente expressos entre os dois tipos de embriões. A: Genes diferencialmente expressos em 0-1 h; B: Genes diferencialmente expressos em 0-2 h; C: Genes diferencialmente expressos em 0-6 h; D: Genes diferencialmente expressos em 18-24 h; Estes processos biológicos são baseados em termos do banco de dados do Gene Ontology e foram selecionados de acordo com a relevância na embriogênese.

A- Processos Biológicos (Genes Diferencialmente expressos em 0-1 h)	# de genes
Tradução	99
Ciclo celular	95
Processo de ciclo celular	89
Fase de ciclo mitótico	85
Ciclo celular mitótico	84
Fase M	83
Organização do micro túbulo	72
Organização do fuso	64
Organização do fuso mitótico	61
Regionalização	50
Desenvolvimento de blastoderme sincicial	49
Elongação do fuso mitótico	48
Elongação do fuso	48
Transporte mediado por vesícula	41
Organização de membrana	40
Motilidade celular	34
Morfogênese de epitélio	32
Invaginação da membrana	32
Segmentação	30
Segmentação da blastoderme	29
Dobramento de proteína	29
Morfogênese embrionária	29
Final do desenvolvimento embrionário	28
Proteólise envolvido em processo celular catabólico	27
Motilidade celular	27
Localização celular	27
Regulação de transcrição pela RNAPolII	26
Especificação do eixo	26
Adesão biológica	24
Migração celular	23
Fase M do ciclo mitótico	23
Mitose	22
Especificação de eixo antero-posterior	22
Divisão nuclear	22
Morte celular programada	22
Fissão de organelas	22
Morte celular	22
Morte	22
Regulação de ciclo celular	22
Organização de cromatina	22
Determinação do eixo antero-posterior em embriões	21
Especificação de padrão embrionário	21
Especificação de eixo embrionário	21
Resposta a estresse celular	21
Morfogênese de epitélio embrionário	20
Regulação pós transcricional de expressão gênica	20
Regulação de biossíntese de macromoléculas	20
Formação do padrão antero-posterior	19
Enzima ligada a proteína receptor de via de sinalização	18
Estabelecimento e manutenção de polaridade celular	17
Formação de padrão dorso-ventral	17
Processo catabólico de carboidrato	16
Regulação da transcrição	16
Regulação de nucleobase, nucleosídeo, nucleotídeo.	16
Regulação de componente metabólico nitrogenado	16
Fechamento dorsal	15
Transdução de sinal mediado por GTPase	15
Segregação cromossômica	15
Especificação do eixo do ovócito	15

Construção do ovócito	15
Resposta a danos no DNA	14
Receptor transmembrana de via de sinalização de tirosina quinase	14
Iniciação da tradução	13
Especificação do eixo antero-posterior do ovócito	13
Determinação maternal do eixo antero-posterior no embrião	13
Biogênese de complexo ribonucleoProteína	13
Regulação de apoptose	13
Empacotamento do DNA	12
Processo catalítico de carboidrato celular	11
Montagem e desmontagem da cromatina	11
Biogênese de ribossomo	11
Regulação da tradução	11
Especificação do eixo dorso-ventral	10
Via de sinalização de Torso	9
Organização de nucleossomo	9
Processo catabólico de mossacarídeos	9
Regulação negativa de apoptose	9
Regulação de morte celular programada	9
Desenvolvimento do sistema imune	9
Regulação do tamanho do fuso	8
Manutenção da localização proteica na célula	8
Montagem de cromatina	8
Silenciamento gênico por RNA	8
Montagem do complexo proteína-DNA	8
Localização de mRNA no polo	8
Silenciamento gênico pós transcricional por RNA	8
Regulação da transcrição por RNA polII	8
Processo catalítico de mRNA	7
Processo catabólico de RNA	7
Montagem do fuso	7
Regulação dos níveis de hormônio	7
Processo metabólico de hormônios	7
Migração de célula germinativa	7
Organização do núcleo	7
Regulação negativa de processo celular catabólico	6
Processo catabólico dependente de modificação de proteína	6
Regulação de processo catalítico	6
Polimerização proteica	6
Determinação da região terminal	6
Processo catabólico de mRNA nuclear	6
Determinação zigótica do eixo antero-posterior	6
Resposta celular a espécies reativas de oxigênio	5
Ciclo mitótico da blastoderme sincicial	5
Mitose sem citocinese	5
Elongação traducional	5
Regulação da transição de metáfase para anáfase mitótica	5
Anti-apoptose	5
Transição G2/M do ciclo celular mitótico	4
Regulação da tradução	4
Separação dos cromossomos	4
Fixação do cromossomo ao fuso	3
Processo metabólico dopamina	3

B - Processos Biológicos (Genes diferencialmente expressos em 0-2 h)	# de genes
Organização de citoesqueleto	20
Processamento de microtúbulos	19
Ciclo celular	18
Processo de ciclo celular	17
Fase de ciclo celular	16
Organização de microtúbulos do citoesqueleto	15
Fase M	15
Ciclo celular mitótico	14

Tradução	14
Organização de fuso mitótico	11
Organização de fuso	11
Organização de subunidade de complexo de macromolécula celular	10
Dobramento de proteína	9
Montagem de complexo de macromoléculas celulares	9
Geração de metabólicos e energia	9
Organização de centrôssomo	9
Regulação pós transcricional de expressão gênica	7
Organização de nucleossomo	6
Empacotamento de DNA	6
Regulação da tradução	6
Regulação da organização de organela	6
Regulação do processo metabólico proteico	6
Montagem de nucleossomo	5
Montagem de cromatina	5
Montagem de complexo proteína-DNA	5
Montagem e desmontagem de cromatina	5
Elongação de fuso mitótico	5
Elongação de fuso	5
Regulação de processo de ciclo celular	5
Celularização	5
Respiração celular	5
Localização de RNA polar	4
Regulação da organização do citoesqueleto	4
Inicialização da tradução	4
Desenvolvimento de sistema imune	4
Organização do citoplasma	4
Localização de mRNA intracelular	4
Via de sinalização de Toll	3
Regulação de duplicação do centrôssomo	2
Regulação de centrôssomo	2
Regulação de <i>splicing</i> de RNA	2

C - Processos Biológicos de Genes diferencialmente expressos em 0-6 h	# de genes
Processo reprodutivo em organismo multicelular	16
Organização de citoesqueleto	15
Geração de gameta	15
Reprodução sexual	15
Processo celular reprodutivo	13
Regionalização	12
Fase M	12
Fase de ciclo celular	12
Ovulação	12
Geração de gameta feminino	12
Processo de ciclo celular	12
ciclo celular	12
Organização de cromossomo	11
Organização de microtúbulo	11
Dobramento de proteína	10
Especificação de eixo	9
Organização de fuso	9

Desenvolvimento de célula germinativa	9
Segmentação	9
Especificação de eixo antero-posterior	8
Formação de padrão antero-posterior	8
Organização do fuso mitótico	8
Segmentação da blastoderme	8
Montagem de complexo de macromolécula	8
Regulação Pós-transcricional de expressão gênica	7
Determinação de eixo antero-posterior	7
Subdivisão regional tripartida	7
Especificação do eixo embrionário	7
Montagem de complexo de macromolécula <i>celular</i>	7
Organização de cromatina	7
Resposta a estímulos abióticos	7
Diferenciação de ovócito	6
Montagem de nucleossomo	5
Montagem de cromatina	5
Montagem de complexo DNA-proteína	5
Montagem e desmontagem de cromatina	5
Regulação de processamento de mRNA	5
Regulação de <i>splicing</i> de RNA via spliciossomo	5
Organização de citoesqueleto	5
Empacotamento de DNA	5
Regulação da tradução	5
Especificação de eixo do ovócito	5
Construção do ovócito	5
Desenvolvimento de ovócito	5
Maturação celular	5
Espermatogênese	5
Organização do gameta masculino	5
Localização de RNA no polo	4
Inialização da tradução	4
Regulação de <i>splicing</i> alternativo	4
Montagem de polo palmático	4
Localização de mRNA intracelular	4
Resposta a estímulos de temperatura	4
Especificação de eixo antero-posterior no ovócito	4
Elongação do fuso mitótico	4
Determinação maternal do eixo antero-posterior	4
Dobramento "de novo" de proteína	3
Manutenção de localização de Proteína celular	3
Silenciamento gênico por RNA	3
Segregação das cromátides irmãs na mitose	3
Segregação dos cromossomos	3
Extensão da banda germinativa	2

D - Processos Biológicos de Genes diferencialmente expressos em 18-24 h	# de genes
Ciclo celular	200
Organização de citoesqueleto	190
Geração de gameta	178
Tradução	175

Processo metabólico de fósforo	163
Morfogênese de componente celular	159
Fase do ciclo celular	155
Ciclo celular mitótico	152
Transcrição	151
Ovogênese	151
Organização de gameta feminino	151
Fase M	149
Processamento de RNA	146
Transporte mediado por vesícula	145
Morfogênese celular	140
Organização de microtúbulo de citoesqueleto	134
Transporte intracelular	131
Fosforilação	131
Organização de membrana	128
Regionalização	126
Processo de reprodução celular	126
Organização de projeção de celular	109
Estabelecimento de localização proteica	108
Organização de fuso	105
Transporte de proteínas	105
Processo catabólico de macromolécula <i>celular</i>	103
Invaginação de membranas	103
Endocitose	103
Morfogênese de projeção celular	100
Morfogênese celular envolvido na diferenciação	99
Organização de cromossomo	97
Morfogênese de projeção neuronal	97
Morfogênese celular envolvida na diferenciação neuronal	96
Processo catalítico de proteínas	95
Metabolismo de mRNA	95
Organização de fuso mitótico	94
Localização de macromolecular celular	94
Proteólise	87
Movimento celular	87
Desenvolvimento de disco imaginal	79
Sinalização célula-célula	76
Fosforilação de amino ácidos	75
Desenvolvimento de epitélio	74
Regulação negativa de expressão gênica	74
Processamento de ncRNA	73
Geração de precursor metabólico e energia	73
Transporte de proteína intracelular	72
Metabolismo de DNA	72
Desenvolvimento de célula germinativa	72
Divisão celular	71
Morfogênese de um epitélio	71
Especificação do padrão embrionário	70
Biossíntese de componente nitrogenado	69

Segmentação	69
Axonogênese	67
Final do desenvolvimento embrionário	67
Desenvolvimento embrionário via blastoderme sincicial	66
Morfogênese embrionária	65
Segmentação da blastoderme	63
Organização de cromatina	60
Resposta celular ao estresse	58
Proliferação celular	57
Biossíntese de RNA	57
Regulação pós-transcricional de expressão gênica	56
Transcrição dependente de DNA	56
Regulação de ciclo celular	56
Adesão biológica	55
Desenvolvimento do folículo ovariano	55
Fissão de organela	51
Biogênese de complexo riboproteínas	50
Processamento de ncRNA	49
Fosforilação oxidativa	49
Metabolismo de tRNA	48
Morfogênese do epitélio embrionário	48
<i>Splicing</i> de RNA via spliceossomo	48
Organização de citoesqueleto de actina	48
Processo baseado nos filamentos de actina	48
Mitose	48
Divisão nuclear	48
Elongação de fuso mitótico	46
Secreção	46
Transcrição pela RNAPolII	45
Secreção pela célula	45
Replicação de DNA	43
Dobramento de proteína	43
Diferenciação do ovócito	43
Biogênese de ribossomo	42
Localização de proteína em organela	42
Fechamento dorsal	42
Segregação de cromossomos	42
Energia derivada	41
Desenvolvimento do ovócito	41
Maturação celular	41
Formação do padrão dorso-ventral	41
Regulação de organização de organelas	40
Modificação de cromatina	40
Construção do ovócito	40
Resposta celular a estímulos de dano no DNA	39
Geração de sinal envolvido na sinalização célula-célula	39
Respiração celular	39
Especificação do eixo do ovócito	39
Transporte de neurotransmissores	39

Transporte de vesícula sináptica	38
Regulação de transdução de sinal	38
Regulação de comunicação celular	38
Manutenção da polaridade celular	38
Transdução de sinal por GTPase	38
Transporte transmembrana	38
Regulação de splicing de RNA	37
Modificação de proteínas por conjugação ou remoção de proteína pequena	37
Regulação de morte celular programada	35
Regulação de morte celular	35
Transporte nuclear	34
Transporte núcleo-citoplasmático	34
Cadeia de transporte de elétrons	34
Regulação de forma celular	34
Regulação do crescimento	34
Regulação do desenvolvimento de sistema nervoso	33
Regulação de splicing alternativo	32
Iniciação de transcrição pela RNAPolII	32
Reparo do DNA	30
Importação de proteínas	29
Localização de organelas	28
Aminoacilação de tRNA	27
Ativação de amino ácido	27
Transporte de nucleobases, nucleosídeos e ácidos nucleicos	27
Síntese de ATP acoplado ao transporte de elétrons	27
Regulação da tradução	27
Processamento de rRNA	26
Regulação da localização celular	26
Determinação maternal-do eixo antero-posterior do embrião	26
Cascata de proteína quinase	25
Estabelecimento da localização de RNA	25
Empacotamento do DNA	25
Divisão celular assimétrica	24
Manutenção da localização	23
Montagem do córion	23
Via de sinalização Wnt	23
Regulação de cascata de proteína quinase	22
Formação da câmara ovocítica derivada do germinário	22
Desenvolvimento de cutícula	22
Modificação de RNA	21
Regulação da proliferação celular	21
Transporte de prótons	21
Organização citoplasmática	21
Ubiquitinação de Proteína	20
Biossíntese de coenzima	20
Remodelamento de cromatina	20
Divisão de linhagem celular	20
Transporte de vesícula do golgi	19

Organização de nucleossomo	19
Desenvolvimento de sistema imune	19
Desenvolvimento de órgão linfático ou hemopoético	19
Exportação nuclear	18
Transporte de mRNA	18
Organização de vacúolo	18
Regulação da cascata MAPKKK	18
Regulação de estrutura e atividade quinase	18
Silenciamento gênico por RNA	18
Regulação da cascata JNK	17
Regulação de atividade de estresse via de sinalização de proteína quinase	17
Regulação de resposta a estresse	17
Transporte de elétron	17
Organização de junção célula-célula	17
Organização de junção celular	17
Transporte das células nutridoras do ovário para o ovócito	16
Catabolismo de RNA	15
Localização de proteínas na mitocôndria	15
Receptor transmembrana da via de sinalização serina/treonina	15
Ciclo do centrôssomo	15
Silenciamento gênico por transcricional por RNA	15
Metilação de biopolímero	15
Exportação de RNA do núcleo para citoplasma	14
Processamento do 3'-terminal do RNA	14
Acoplamento de membrana	14
Localização assimétrica de proteínas	14
Metabolismo de acetil-CoA	14
Manutenção da polaridade celular apical/basal	13
Organização do citoesqueleto do ovocítico	13
Cascata JNK	13
Condensação do cromossomo	13
Montagem de cromatina	13
Ciclo mitótico embrionário	12
Divisão de linhagem celular somática	12
Regulação de crescimento celular	12
Transporte de vesículas mediado pelo ER e golgi	11
Regulação de fator de transcrição importado pra dentro do núcleo	11
Acoplamento da vesícula sináptica durante a exocitose	11
Regulação do tamanho do tudo traqueal	11
Regulação de localização do mRNA Oskar no polo plasmático	11
Estabilização de proteína	10
Proteína alvo para ER	10
Amplificação de DNA	10
Determinação do sexo	10
Interfase do ciclo mitótico	10
Clivagem de mRNA	9
Transporte citoplasmático	9
Diferenciação de células fotorreceptora	9

Metabolismo de ribonucleosídeo purínico	8
Ciclo mitótico na blastoderme sinsicial	8
Regulação da fase S	8
Modificação de tRNA	8
Polidenilação de mRNA	8
Mitose sem citocinese	8
Construção de vesícula sináptica	8
Coesão das cromátides irmãs	8
Ancoramento do citoesqueleto na membrana plasmática	8
Determinação somática do sexo	8
Deadenilação proteica	7
Síntese de pseudouridinas	7
Biossíntese de vitaminas	7
Fusão de membranas	7
Acetilação de histonas	7
Abertura do duplex de DNA	6
Mudança na geometria do DNA	6
Biossíntese de cofator quinona	6
Regulação da saída da mitose	6
Formação do cisto da linhagem germinativa feminina	6
Regulação de ligação	6
Separação de centríolo	6
Regulação de ligação ao DNA	6
Transcrição pela RNAPolII	5
Mobilização do nucleossomo	5
Extensão da banda germinativa	5
Aminoacetilação do aptil-tRNA	4
Elongação do fita de DNA durante a replicação	4

4.4. Questão 3

4.4.1. Redes de regulação gênica (miRNA:mRNA)

Para responder esta pergunta foram construídas de redes de regulação por miRNA do início do desenvolvimento de *A. mellifera*, segundo coeficiente de correlação ($<-0,8$), perfis de expressão miRNA:mRNA em embriões de 0-24 h e pela presença de sítio de ligação miRNA:mRNA.

Como um de nossos objetivos foi localizar pares de regulação que podem estar atuando diferentemente entre os dois tipos de embriões, nós fizemos a sobreposição das redes totais de embriões haploides e diploides, na tentativa de gerar redes exclusivas de

regulação para cada tipo de embrião de até 24 h de desenvolvimento. Foram, portanto, geradas 3 redes de regulação diferentes: uma para embriões haploides, outra para embriões diploides e uma terceira compartilhada pelos dois tipos (Figuras 9, 10 e 11). Estas redes respondem a questão 3: os miRNAs regulam o início da embriogênese de *A. mellifera* nos dois tipos de embriões.

Para cada uma das 3 redes nós fizemos um busca por genes que estariam ligados à ativação do ovo, transição materno-zigótica e embriogênese de *A. mellifera*. Ainda foi feita a busca por processos biológicos relativos a cada conjunto de gene-alvo de cada rede (Tabela 7, 8 e 9).

As redes geradas estão mostradas nas Figuras 9-A, 10-A 11-A. Na Tabela 6 está descrito o número de genes-alvos, miRNAs e pares de regulação para cada rede gerada, além do número de genes-alvos relacionados à ativação do ovo, transição materno-zigótica e embriogênese de *A. mellifera*. Lembrando que na rede estão plotados apenas os pares de regulação de gene-alvo para os quais foram encontrados ortólogos em *Drosophila*.

Nós selecionamos 5 miRNAs que estão relacionados à regulação da embriogênese de *A. mellifera*, haploide e diploide (*ame-mir-34-5p*, *ame-mir-375-3p*, *ame-mir-263b-5p*, *ame-mir-184-5p*, *ame-mir-9a-3p*). Desta forma, foram geradas sub-redes para os genes-alvos destes miRNAs, em cada tipo de embrião, mostrando genes e processos biológicos (Figuras 9-B, 10-B e 11-B).

Para três destes miRNA foi feita a marcação por hibridação *in situ* (*ame-mir-34-5p*, *ame-mir-375-3p*, *ame-mir-263b-5p*; Figuras 12, 13 e 14) e para os outros dois *ame-mir-184-5p* e *ame-mir-9a-3p* (Figura 15) utilizamos marcações feitas por Zondag *et al.* (2012). Com base nos resultados, nós fizemos predições de suas funções de acordo com marcações, caracterizamos sua função de acordo com marcações. As marcações por

hibridação *in situ* foram feitas em embriões de várias idades, desde de ovócitos maduros a embriões de 72 h de desenvolvimento.

Tabela 6: Resumo do número de genes e miRNAs presentes em cada uma das três redes geradas, além do número de genes relacionados à Ativação do ovo, Transição Materno-zigótica e Embriogênese de *A. mellifera*, além do número de processos biológicos. No anexo 3 é possível encontrar as informações relativas a predição de alvos, para a construção das redes e todos os processos biológicos encontrados para os genes que compõem cada rede.

		Redes de regulação exclusivas miRNA:RNAm Início da Embriogênese de <i>Apis mellifera</i> (0-24h)		
		Embriões Haploides	Compartilhada	Embriões Diploides
Total	Pares de regulação (miRNA:RNAm)	1236	441	1603
	miRNA	11	0	12
	Genes-Alvos	688	28	1008
Função	Pares de regulação (miRNA:RNAm)	68	20	72
	miRNA	35	15	37
	Genes-Alvos	54	16	60
	Pares de regulação (miRNA:RNAm)	11	3	2
	miRNA	10	2	2
	Genes-Alvos	8	3	2
	Pares de regulação (miRNA:RNAm)	18	13	45
	miRNA	15	13	38
	Genes-Alvos	14	9	14
	Termo GO	241	145	369
Processos Biológicos (GO)		140	98	146

Redes de regulação miRNA:mRNA exclusiva de embriões haploides

Figura 9: Redes de regulação miRNA:mRNA exclusivas de embriões haploides. **A:** rede de regulação total; **B:** rede de regulação pelos miRNAs *ame-mir-34-5p*, *ame-mir-375-3p*, *ame-mir-263b-5p*, *ame-mir-184-5p*, *ame-mir-9a-3p*.

Tabela 7: Genes envolvidos nos Processos Biológicos regulados por miRNAs identificados no desenvolvimento dos embriões haploides de *A. mellifera* (até 24 h). Estes processos são baseados em termos do banco de dados do Gene Ontology e foram selecionados de acordo com a relevância ou com função descrita na embriogênese.

Processos Biológicos (Rede Gênica de embriões haploides)	Gene
Organização de citoesqueleto	<i>Abi</i>
Transcrição; Proteína dependente de DNA	<i>amos</i>
Desenvolvimento embrionário via blastoderme sincicial; metabolismo de nucleotídeo púrico; biossíntese de ATP; transporte de cátions	<i>Atpalpha</i>
Transição G1/S na mitose; transcrição; DNA-dependente; Iniciação de transcrição dos promotores RNAPol II e RNAPol III; proteína DNA-dependente; regulação da transcrição do promotor de RNAPol I e RNAPol III; transcrição de snRNA, tRNA; Biossíntese de RNA; ativação do ovo	<i>Cdk8</i>
Processamento de rRNA e RNA; biossíntese de ribonucleoproteína; processamento de ncRNA; biogênese de ribossomo	<i>CG11837</i>
Metabolismo de metionina	<i>CG12173</i>
Metabolismo de fosfato	<i>CG14411</i>
Transporte intracelular; localização de proteínas	<i>CG1599</i>
Transporte intracelular; localização de proteínas	<i>CG1968</i>
Regulação negativa de função molecular	<i>CG6179</i>
Diferenciação celular	<i>CG6398</i>
RNA <i>splicing</i> ; via de spliceossomo; <i>splicing</i> de mRNA nuclear; processamento de mRNA; metabolismo de mRNA	<i>CG6841</i>
Proteólise	<i>CG9062</i>
Homeostase celular	<i>CG9911</i>
Resposta a estímulos abióticos; Processamento de RNA	<i>conv</i>
Regulação negativa de macromoléculas;	<i>CTCF</i>
Desenvolvimento do olho	<i>dac</i>
Meiose I; formação gameta feminino; Segregação mitótica de cromátides irmãs; Fase M do ciclo celular mitótico; anáfase mitótica; organização do citoesqueleto; divisão nuclear; movimento de microtúbulos; organização do fuso; organização de cromatina	<i>east</i>
Remodelamento de cromatina; transcrição; organização de cromossomo	<i>Ino80</i>
Transcrição; geração de gameta feminino; segmentação da blastoderme	<i>jing</i>
Apoptose; geração de gametas; desenvolvimento de células germinativas; celularização; ubiquinação	<i>klhl10</i>
Divisão celular; padrão dorso/ventral; citocinese	<i>lilli</i>
Mitose; especificação do eixo embrionário; regionalização; localização de RNA; organização de citoesqueleto; organização do fuso; formação de gameta; embriogênese de <i>A. mellifera</i>	<i>lkb1</i>
Organização de cromossomo; transcrição; formação da blastoderme sincicial; silenciamento da cromatina; DNA-dependente; transcrição do promotor de RNAPol III	<i>lola</i>
Biossíntese de coenzimas	<i>Mocs2</i>
Apoptose, ubiquinação	<i>morgue</i>
Ciclo celular; fase M mitótica; organização de microtúbulos; segregação de cromossomos; organização do fuso	<i>mts</i>
Metabolismo de monossacarídeos	<i>Pdh</i>
Transporte de cálcio; biossíntese de ATP; metabolismo de nucleotídeo púrico	<i>PMCA</i>
Organização do eixo embrionário; localização de RNA; especificação do eixo antero-posterior no ovócito; organização de citoesqueleto; embriogênese de <i>A. mellifera</i>	<i>POSH</i>
<i>Check-point</i> do ciclo celular mitótico; divisão nuclear; cascata de sinalização intracelular; respostas a danos no DNA; modificação de histonas e cromatina; metilação de histonas; monometilação peptidilisinase; metilação de aminoácidos	<i>pr-set7</i>
Ativação do ovo	<i>Psidin</i>
Ativação da resposta imune	<i>RhoGAP93B</i>
Metabolismo de vitaminas	<i>RluA-1</i>
DNA-dependente; transcrição; regulação de tradução; modificação de cromatina; modificação de histonas; ativação do ovo	<i>Rtf1</i>
Silenciamento de cromatina; transcrição; DNA-dependente; crescimento; regulação de expressão gênica; geração de gameta feminino	<i>Sfmbt</i>
Transporte de íons cálcio e potássio	<i>Shal</i>
Proteína fosforilada	<i>SRPK</i>
Transcrição; DNA-dependente; transcrição do promotor de RNAPol III; montagem de proteínas; regulação positiva de expressão gênica; metabolismo de ácidos nucleicos	<i>TfIIalpha</i>
Transporte de íons cálcio	<i>trp</i>

Redes de regulação miRNA:mRNA exclusivas de embriões diploides

Figura 10: Redes de regulação miRNA:mRNA exclusivas de embriões diploides. A: rede de regulação construída a partir de todos os ortólogos identificados; B: rede de regulação pelos miRNAs *ame-mir-34-5p*, *ame-mir-375-3p*, *ame-mir-263b-5p*, *ame-mir-184-5p*, *ame-mir-9a-3p*.

Tabela 8: Genes envolvidos nos Processos Biológicos regulados por miRNAs identificados no desenvolvimento dos embriões diploides de *A. mellifera* (até 24 h). Estes processos são baseados em termos do banco de dados do Gene Ontology e foram selecionados de acordo com a relevância ou com função descrita na embriogênese

Processos Biológicos (Rede Gênica de Embriões Diploides)	Gene
Regulação do tamanho da célula	<i>Actbeta</i>
Apoptose; transporte de proteínas	<i>Atg5</i>
Geração de gameta feminino; ovogênese; embriogênese de <i>A. mellifera</i>	<i>Axn</i>
Transporte transmembrana	<i>CG10960</i>
Biossíntese de carboidrato	<i>CG13937</i>
Proteólise	<i>CG14516</i>
Biossíntese de amino ácido	<i>CG17486</i>
Metabolismo glicosaminoglicano	<i>CG18278</i>
Spliceossomo, regulação de <i>splicing</i> nuclear; regulação de mRNA	<i>CG2926</i>
Metabolismo de fosfolípidos	<i>CG3812</i>
Transporte de íons	<i>CG6672</i>
Proteína transmembrana da via de sinalização de quinase; embriogênese de <i>A. mellifera</i>	<i>Dab</i>
Regulação de nucleosídeo	<i>DopR</i>
Resposta a estímulos hormonais	<i>E(bx)</i>
Metabolismo de nucleosídeos	<i>Gyc-89Da</i>
Transcrição; DNA-dependente; sinalizador da via de NOTCH	<i>Hey</i>
Organização de citoesqueleto	<i>p130CAS</i>
Fosforilação; embriogênese de <i>A. mellifera</i>	<i>par-1</i>
Embriogênese de <i>A. mellifera</i>	<i>slmb</i>
Regulação de transcrição	<i>Sox102F</i>

Redes de regulação miRNA:mRNA compartilhadas entre os dois tipos embriões

Figura 11: Redes de regulação miRNA:mRNA exclusivas de embriões diploides. A: rede de regulação construída a partir de todos os ortólogos identificados; B: rede de regulação pelos miRNAs *ame-mir-34-5p*, *ame-mir-375-3p*, *ame-mir-263b-5p*, *ame-mir-184-5p*, *ame-mir-9a-3p*.

Tabela 9: Genes envolvidos nos Processos Biológicos regulados por miRNAs identificados no desenvolvimento dos embriões diploides e haploides de *A. mellifera* (até 24 h). Estes processos são baseados em termos do banco de dados do Gene Ontology e foram selecionados de acordo com a relevância ou com função descrita na embriogênese.

Processos Biológicos (Rede Gênica Compartilhada)	Gene
Ciclo celular; formação do córion	<i>E2f</i>
Processo metabólico de carbono	<i>CG1402</i>
Regulação da tradução; motilidade celular; geração de gameta feminino; migração de células do folículo ovariano; regulação negativa da tradução do mRNA Oskar	<i>BicC</i>
Transporte de cátions; transporte de cálcio	<i>CAP</i>
RNA <i>splicing</i> ; via de spliceossomo; <i>splicing</i> de mRNA nuclear; processamento de mRNA; metabolismo de mRNA	<i>CG1646</i>
Dobramento de proteínas	<i>CG2918</i>
Motilidade celular; biossíntese de esteroide	<i>dare</i>
Empacotamento de DNA; organização de cromatina; enovelamento de desenovelamento de cromatina; montagem de nucleossomo; transcrição; sinalização intracelular	<i>E(bx)</i>
Segregação mitótica de cromátides irmãs; Fase M do ciclo celular mitótico; anáfase mitótica; organização do citoesqueleto; divisão nuclear; movimento de microtúbulos; organização do fuso; organização de cromatina	<i>Klp10A</i>
Homeostase celular	<i>Manf</i>
Segregação mitótica de cromátides irmãs; Fase M do ciclo celular mitótico; anáfase mitótica; organização do citoesqueleto; divisão nuclear; movimento de microtúbulos; organização do fuso; organização de cromatina	<i>mts</i>
Biossíntese de carboidratos	<i>pgant2</i>
Segregação mitótica de cromátides irmãs; Fase M do ciclo celular mitótico; anáfase mitótica; organização do citoesqueleto; divisão nuclear; movimento de microtúbulos; organização do fuso; organização de cromatina; resposta a estímulos e estresse	<i>PSR</i>
Regulação de sinal mediado por GTPase	<i>RhoGEF4</i>
Iniciação de transcrição dos promotores RNAPol II e RNAPol III; proteína DNA-dependente; regulação da transcrição do promotor de RNAPol II e RNAPol III; transcrição de snRNA, tRNA; Biossíntese de RNA	<i>Tbp</i>
Ativação do ovo (Krauchunas, 2012; stetina, 2011; wolfner, 2008); transição materno-zigótico (Gilbert, 2008; Sung, et al, 2013; Grosshans, 2003)	<i>wech</i>

4.4.2. *Ame-mir-375-3p*

Os gráficos A e B da Figura 16 indicam que *ame-mir-375-3p* está altamente expresso no início da embriogênese de *A. mellifera*, sendo mais expresso em embriões diploides e em ovócitos maduros. Seus alvos preditos, na rede de embriões de haploides e diploides, indicam que estão ligados a ativação do ovo, transição materno-zigótica e outros processos da embriogênese de *A. mellifera*, e também, que há um aumento na sua expressão à medida que a expressão deste miRNA diminui. A expressão de *ame-mir-375-3p* apresenta uma diferença marcante entre os dois tipos de embrião em 0-2 h de desenvolvimento, em diploides a expressão é alta e em haploides ele não se expressa.

Na Figura 12 podemos observar a localização do *ame-pri-mir-375* nos núcleos das células foliculares, que revestem os ovócitos maduros e são eliminadas logo antes da passagem do ovócito pelo oviduto. O *ame-mir-375-3p* tem um ligeiro aumento na sua expressão em embriões diploides de 0-2 h em relação à biblioteca de ovócitos maduros. Mas, este aumento não ocorre em embriões haploides.

Por hibridação *in situ*, observamos que o *ame-mir-375* está expresso durante todo o desenvolvimento embrionário (Figura 12). A marcação de *ame-mir-375-3p* em embriões diploides e haploides de 0-2 h está presente ao longo do embrião, sendo que é possível observar a presença deste miRNA na região onde se encontram três núcleos, número de núcleos e imagem característica de embriões no início da clivagem (Figuras 12-D, 12-E). Em embriões de 0-6 h também observamos uma marcação mais forte deste miRNA na região dos núcleos em clivagem (Figuras 12-F e 12-G). Nos embriões em blastoderme (18-24 h) este miRNA aparece também ao longo do embrião, assim como em embriões de 32-38 h, 42-48 h e 72 h de desenvolvimento embrionário.

Ame-mir-375

Figura 12: Localização e expressão de *ame-mir-375* em embriões de *A. mellifera*. (A e B) Expressão/localização de *ame-mir-375* em ovócitos maduros. O detalhe mostra o pri-*ame-mir-375* dentro dos núcleos das células foliculares (seta em B). Em C o embrião diploide tem 2 h de desenvolvimento. É possível observar no detalhe três núcleos, onde está concentrado este miRNA (setas em D e E). F e G mostram a porção anterior de um embrião de 0-6 h de desenvolvimento, onde o pri-*ame-mir-375* está expresso nos núcleos em clivagem (setas em F e G). *Ame-mir-375* em embriões em blastoderme (18-24 h) (H e I) foi marcado por todo o corpo do embrião, com detalhe para a porção anterior do embrião. J mostra um embrião em gastrulação (32-38 h) com uma marcação mais forte em células da porção anterior do embrião (seta), provavelmente o estomodeo, estrutura que dará origem ao intestino do adulto (Campos-Ortega & Hastenstein 1997). Em embriões de 42-48 h de desenvolvimento (K), *ame-mir-375* parece estar sendo expressos em células das peças bucais (seta) e da extremidade posterior do embrião, proctodeo (*). (L) Embrião haploides com marcação de *ame-mir-375* por todo o seu corpo. (M e N) Controles negativo da hibridação *in situ*, quando usamos a sonda *sense* que teria a mesma sequência do gene em estudo, portanto não ocorreria a hibridação e consequentemente a marcação. A, C, H, J, K, L, M e N: escala de 200µm, objetiva de 10 X; B, F, G e I: escala de 100µm, objetiva de 20X; D e E: escala de 50 µm, objetiva de 40X. E e G, marcação com DAPI.

4.4.3. Ame-mir-34

A marcação por hibridação *in situ* de *ame-mir-34* (Figura 13) foi compatível com a expressão, dada em RPKM (Figura 16 C e D), no início da embriogênese. Isto porque, o *ame-mir-34-5p* é mais expresso em ovócitos maduros do que nas fases analisadas de embriões. Como ocorre para *ame-mir-375-3p*, o *ame-mir-34-5p* está expresso em embriões diploides de 0-2 h e não se expressa em embriões haploides de mesma idade (Figuras 16-C e 16-D). Como observado nas redes das Figuras 9, 10 e 11, *ame-mir34-5p* não possui alvos preditos para embriões diploides. Mas possui em embriões haploides. Os perfis de expressão dos genes-alvo ligados a ativação do ovo e processos da embriogênese de *A. mellifera* estão apresentados na Figura 16-D.

Na hibridação *in situ* não foi possível observar claramente a marcação do pri-*ame-mir-34* nas células foliculares dos ovócitos maduros, como observado para o pri-*ame-mir-375*, nas Figuras 13-B e 13-C é possível visualizar a reação positiva nas células foliculares. Podemos dizer ainda, que este miRNA parece estar presente no citoplasma, ao redor dos núcleos dessas células (Figura 13-A, B e C). Em embriões de 0-6 h é possível observar a marcação do pri-*ame-mir-34* nos núcleos de embriões em início de clivagem (Figuras 13-E, 13-F e 13-G) e blastoderme (embriões de 18-24 h) (Figura 13-H e 13-I). Em embriões diploides da mesma idade a coloração está disposta por todo o embrião (Figura 13-D). Não podemos afirmar que isso se deve à diferença de expressão deste miRNA entre os dois tipos de embriões, pois este ensaio é qualitativo, não quantitativo. As marcações do *ame-mir-34* por hibridação *in situ* em embriões de 42 h a 72 h de desenvolvimento, evidenciam a expressão deste miRNA em células precursoras do sistema nervoso (ectoderme) (Figura 13-K) e comissuras (Figura 13-L). Na hibridação *in situ* em embriões haploide de 2 h de desenvolvimento, podemos

perceber a coloração mais forte concentrada na região anterior do embrião (Figura 13-M).

Figura 13: (A, B e C) Expressão/localização de *ame-mir-34* em ovócitos maduros. Setas em B e C indicam *pri-ame-mir-34* dentro do núcleo de uma célula folicular. Mas parece que este miRNA também está presente no citoplasma ao redor dos núcleos destas células. Embrião diploide (D) e Embriões haploides (M) com 2 h de desenvolvimento, com marcação de *ame-mir-34* por todo o seu corpo, sendo em embriões diploides a marcação se mostra mais forte. (E, F e G) Embriões com 6 h de desenvolvimento. As setas em F e G indicam a presença de *pri-ame-mir-34* nos núcleos em clivagem. *Ame-mir-34* em embriões em blastoderme (18-24 h) (H e I) foi marcado ao longo do embrião, com detalhe para a presença de *pri-ame-mir-34* nos núcleos em divisão. J (visão dorsal) mostra embrião em gastrulação (32-38 h) com uma marcação mais forte de *ame-mir-34* em uma estrutura na porção anterior do embrião (seta) provavelmente o estomodeo que dará origem ao intestino anterior do inseto adulto (Campos-Ortega & Hastenstein 1997). Em embriões de 42-48 h (K) e de 68-72 h (L – visão ventral) de desenvolvimento, o *ame-mir-34* parece estar sendo expresso em células do sistema nervoso (*). (N) Controle negativo da hibridação *in situ*, quando usamos a sonda *sense* que teria a mesma sequência do gene em estudo, portanto não ocorreria a hibridação e consequentemente a marcação. A, D, H, J, K, L E M: escala de 200µm, objetiva de 10 X. E e M: escala de 100µm, objetiva de 20X. B, C, F, G e I: escala de 50 µm, objetiva de 40X.

4.4.4. *Ame-mir-263b*

Os perfis de expressão, quanto ao número de *reads* (RPKM), do *ame-mir-263b-5p* estão apresentados nas Figuras 16-E e 16-F, para embriões diploides e haploides,

respectivamente, tal como os genes-alvos preditos para as redes de regulação de embriões haploides, diploides e compartilhada. A diferença de expressão deste miRNA entre os tipos de embrião está na fase de 0-6 h, onde ele está expresso em embriões haploides e não está em embriões diploides.

A marcação do *ame-mir-263b* em ovócitos maduros não ficou nítida para afirmarmos que o *pri-ame-mir-263b* está presente nos núcleos das células foliculares (Figuras 14-A, 14-B e 14-C). A expressão deste miRNA em 6 h de desenvolvimento de embriogênese de abelhas é nuclear (Figuras 14-G e 14-H). Nas Figuras 14-G e 14-H, o embrião está em estágio de clivagem (Nelson 1915), onde os núcleos já migraram para o interior do embrião e estão se dividindo rapidamente, sem a divisão citoplasmática. *Ame-mir-263b* parece ser mais expresso nos núcleos presentes no interior do embrião, tanto dos estágios de 0-2 h (Figura 14-D, embrião diploide; Figura 14-N e 14-O embrião haploide), 0-6 h (Figuras 15-G e 15-H) e 18-24 h (Figuras 14-I e 14-J). Em fase de 32 h a 72 h (Figuras 14-K, 14-L e 14-M) o *ame-mir-263b* é expresso em todo embrião, mais concentrado na região anterior.

Figura 14: Localização e expressão de *ame-mir-263b* em embriões de *A. mellifera*. (A, B e C) Expressão/localização de *ame-mir-263b* em ovócitos maduros. A marcação apresenta muito *background*, não sendo possível, portanto, determinar se o *pri-ame-mir-263b* (B e C) está sendo expresso nos núcleos das células foliculares. Embrião diploide (D, E e F) com 2 h de desenvolvimento, com marcação de *ame-mir-263b* ao longo do embrião, com detalhe para uma marcação mais forte na região anterior de três núcleos (seta em E e F). (G e H) Embriões com 6 h de desenvolvimento. Seta em H indica a expressão de *pri-ame-mir-263b* dentro dos núcleos em clivagem. (N e O) Embrião haploide (0-6 h) com marcação de *ame-mir-263b* ao longo do embrião, destacando a região anterior onde se localizam os núcleos em clivagem (seta em O). *Ame-mir-263b* em embriões em blastoderme (18-24 h) (I e J) foi marcado ao longo do embrião, com detalhe par a presença de *pri-ame-mir-263b* dentro dos núcleos, principalmente nos núcleos centrais. K (visão dorsal) mostra embrião em gastrulação (32-38 h) com uma marcação mais forte *ame-mir-263b* em uma estrutura na porção anterior do embrião (seta) provavelmente o estomodeo estrutura que dará origem ao intestino anterior em insetos adultos (Campos-Ortega & Hastenstein 1997). Em embriões de 42-48 h (L) e de 68-72 h (M) de desenvolvimento, o *ame-mir-263b* parece estar sendo expressos em células do aparelho bucal (*). (P e Q) Controle negativo da hibridação *in situ*, quando usamos a sonda *sense* que teria a mesma sequência do gene em estudo, portanto não ocorreria a hibridação e consequentemente a marcação. A, G, I, K, L, M, N, P e Q: escala de 200µm, objetiva de 10 X; B, C, H, J, O. escala de 100µm, objetiva de 20X. E e F: escala de 50 µm, objetiva de 40X.

4.4.5. *Ame-mir-184 e ame-mir-9a*

As expressões de *ame-mir-184-5p* e *ame-mir-9a-5p* estão apresentadas nas Figuras 17-G e 17-H, respectivamente, tanto em embriões diploides, quanto em haploides. Os perfis de expressão dos genes-alvos preditos para estes miRNAs também estão plotados nos mesmos gráficos.

As hibridações *in situ* de *ame-mir-184* e *ame-mir-9a* foram retiradas de (Zondag *et al.* 2012) e estão mostradas nas Figuras 15.

Os miRNAs, portanto, parecem regular importantes processos no início do desenvolvimento de embriões de *A. mellifera* e de forma diferente entre os tipos de embriões analisados. Os genes descritos por (Krauchunas *et al.* 2012) como envolvidos na ativação do ovo, na transição materno-zigótica (Grosshans *et al.* 2003; Gilbert 2010; Sung *et al.* 2013) além de outros processos da embriogênese de *A. mellifera* (Dearden 2006; Dearden *et al.* 2006; Wilson & Dearden 2008, 2009; Wilson *et al.* 2010a; Wilson *et al.* 2010b; Wilson *et al.* 2011) são regulados por miRNAs e de forma diferente entre os dois tipos de embriões. Quando observamos as redes enriquecidas com alvos de apenas cinco miRNAs (*ame-mir-34-5p*, *ame-mir-375-3p*, *ame-mir-263b-5p*, *ame-mir-184-5p* e *ame-mir-9a-3p*) é possível observar que os mesmos miRNAs se comportam de maneira diferente, regulando outros alvos em cada tipo de embrião e ainda podem agir de forma semelhante dependendo do tipo de alvo eles estão regulando.

Figura 15: Hibridação *in situ* de pri-ame-mir-184 e pri-ame-mir-9a feita por Zondag *et al.* (2012). A mostra um pri-ame-mir-184 marcado em embrião de estágio 5, com expressão mais forte na extremidade ventral. B e C: dois estágio de embrião onde o pri-ame-mir-9a está expresso, estágio 6 mostrando a expressão em faixas e estágio 9 com marcação mais forte na região anterior, nas peças bucais do embrião. Os estágios de desenvolvimento utilizados por Zondag *et al.* (2012) estão classificados de acordo com DuPraw (1967). (Figura modificada de Zondag *et al.* 2012)

Figura 16: Perfis de expressão de ame-mir-375-3p (A e B), ame-mir-34-3p (C e D), ame-mir-263b-5p (E e F), ame-mir-184-5p (G) e ame-mir-9a-3p (H) e seus respectivos alvos preditos nas redes de

regulação em embriões haploides e diploides: (*Rtf1*/GB55367, *Psidin*/GB53251, *cdk8*/GB45722) ou processos da embriogênese de *A. mellifera* (*IKb1*/GB53528, *Posh*/GB55569, *Par-1*/GB55294), além dos genes *Sox102F*/GB41464 e *PSR*/GB46775, genes-alvo preditos de *ame-mir-184-5p* e *ame-mir-9a-3p*, respectivamente.

4.5. Questão 4 e 5

4.5.1. Genes maternos e genes zigóticos

Os miRNAs e mRNA expressos em ovócitos maduros e em embriões haploides e diploides de até 24 h de desenvolvimento, foram classificados em maternos (classe I ou classe II) ou zigóticos (classe I, classe II ou classe II) (ver materiais e métodos). Aqueles que não apresentavam perfil relativo a cada classe e ou origem (materno ou zigótica), foram denominados “não-definidos” (Anexo 4).

O número de genes e miRNAs por classe e por tipo de embrião estão resumidos nas Tabelas 10, 11, 12 e 13 e o perfil de expressão dos genes e miRNAs selecionados estão plotados em gráficos (Figuras 17, 18, 19 e 20). A lista total de genes de cada classe está no Anexo 4.

Tabela 10: Número de genes totais por tipo de embrião e por classe. Classe I (genes expressos exclusivamente em ovócitos maduros) e classe II (genes expressos em ovócitos maduros mas que tem sua expressão diminuída em mais de 5 RPKM em 0-2 h e/ou 0-6 h, até zerar em 18-24 h) de genes definidos como maternos, tal como o número de ortólogos de *Drosophila* encontrados entre genes destas classes.

Genes Maternos	# Total de Genes	Ortólogos
Classel
Classell

Figura 17: Perfil de expressão dos genes classificados maternos em embriões haploides e diploides de *A. mellifera* até 24 h de desenvolvimento. Classe I: Genes que estão expressos exclusivamente em ovócitos maduros. Classe II: Genes que são expressos em ovócitos maduros e diminuem sua expressão em 0-2 h e/ou 0-6 h, até zerar em 18-24 h.

Tabela 11: Número de miRNA por classe. Classe I (miRNAs expressos exclusivamente em ovócitos maduros) e classe II (miRNAs expressos em ovócitos maduros mas que tem sua expressão diminuída em mais de 5 RPKM em 0-2 h e/ou 0-6 h, até zerar em 18-24 h) de miRNA definidos como maternos e o número por tipo de embrião.

miRNAs Maternos	# Total de miRNAs
Classe I	<div> Diploide Haploide </div>
Classe II	<div> Diploide Haploide </div>

Figura 18: Perfil de expressão dos genes classificados maternos em embriões haploides e diploides de *A. mellifera* até 24 h de desenvolvimento. Classe I: MiRNAs que estão expressos exclusivamente em ovócitos maduros. Classe II: MiRNAs que são expressos em ovócitos maduros e diminuem sua expressão em 0-2 h e/ou 0-6 h em mais de 5 RPKM, até zerar em 18-24 h.

Tabela 12: Número de genes totais por tipo de embrião e por classe. Classe I (genes não expressos em ovócitos maduros e expressos em alguma das fases da embriogênese analisadas, sendo aqueles genes expressos em 0-2 h e/ou 0-6 h não possuem íntrons), classe II (genes expressos em ovócitos maduros, mas que aumentam a sua expressão em mais que 5 RPKM nas fases 0-2 h e ou 0-6 h, continuando a se expressar, mesmo que baixo, em 18-24 h, e não possuem íntrons) e classe III (genes que se expressam em ovócitos maduros, são degradados em 0-2 h e/ou 0-6 h, e voltam a se expressar em 18-24 h), de genes definidos como zigóticos, tal como o número de ortólogos de *Drosophila* encontrados entre genes destas classes.

Genes Zigóticos	# Total de Genes	Ortólogos
Classel	Diploide Haploide	Diploide Haploide
Classell	Diploide Haploide	Diploide Haploide
Classelll	Diploide Haploide	Diploide Haploide

Figura 19: Perfil de expressão dos genes classificados como zigóticos em embriões haploides e diploides de *A. mellifera* de até 24 h de desenvolvimento. Classe I: Genes que estão expressos exclusivamente em embriões, ou seja não estão expressos em ovócitos maduros, sendo aqueles que se expressam em 0-2 h e/ou 0-6 h não possuem íntron. Classe II: Genes que são expressos em ovócitos maduros e aumentam sua expressão em 0-2 h e/0-6 h de mais de 5 RPKM, não possuem íntron e continuam sendo expressos em 18-24 h. Classe III: Genes que se expressam em ovócitos maduros, não se expressam em 0-2 h e 0-6 h, mas voltam a se expressar em 18-24 h.

Tabela 13: Número de miRNAs totais por tipo de embrião e por classe I (miRNAs não expressos em ovócitos maduros e expresso em alguma das fases da embriogênese analisadas), classe II (miRNAs expressos em ovócitos maduros, mas que aumentam a sua expressão em mais que 5 RPKM nas fases 0-2 h e ou 0-6 h, continuando a se expressar, mesmo que baixo, em 18-24 h) e classe III (miRNAs que se expressam em ovócitos maduros, são degradados em 0-2 h e/ou 0-6 h, e voltam a se expressar em 18-24 h) de miRNAs definidos como zigóticos.

miRNA Zigóticos	# Total de miRNA
Classe I	<div> Diploide <div> <div>10</div> <div>6</div> <div>5</div> </div> Haploide </div>
Classe II	<div> Diploide <div> <div>14</div> <div>23</div> <div>3</div> </div> Haploide </div>
Classe III	<div> Diploide <div> <div>7</div> <div>5</div> <div>31</div> </div> Haploide </div>

Figura 20: Perfil de expressão dos genes classificados como zigóticos em embriões haploides e diploides de *A. mellifera* de até 24 h de desenvolvimento. Classe I: MiRNAs que estão expressos exclusivamente em embriões, ou seja não estão expressos em ovócitos maduros, sendo aqueles que se expressam em 0-2 h e/ou 0-6 h não possuem íntron. Classe II: MiRNAs que são expressos em ovócitos maduros e aumentam sua expressão em 0-2 h e/0-6 h de mais de 5 RPKM, não possuem íntron e continuam sendo expressos em 18-24 h. Classe III: MiRNAs que se expressam em ovócitos maduros, não se expressam em 0-2 h e 0-6 h, mas voltam a se expressar em 18-24 h.

Para cada classe de genes, maternos e zigóticos, haploides e diploides, foi feita a procura por processos biológicos, utilizando o banco de dados de Gene Ontology (GO), pelo *software* DAVID 6.7 (Dennis *et al.* 2003; Huang *et al.* 2009). Os processos biológicos dos genes classificados como maternos e zigóticos, foram selecionados de acordo com a relevância de cada processo com a embriogênese (Tabelas 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21). A lista completa dos processos biológicos por classe de genes e tipo de embrião está no Anexo 4.

Como a classificação dos genes e miRNAs foi baseada na expressão em cada tipo de embrião é possível que exista um mesmo miRNA ou gene que esteja classificado como materno em um tipo de embrião e como zigótico em outro.

Tabela 14: Principais Processos Biológicos atribuídos aos genes classificados como Genes Maternos Classe I Haploides. Estes processos são baseados em termos do banco de dados do Gene Ontology e foram selecionados de acordo com a relevância na embriogênese.

Processos Biológicos (Genes Maternos Classe I Haploides)	Genes
Cutícula à base de quitina	<i>Gld; Itp-r83A</i>
Ciclo de muda	<i>Gld; Itp-r83A</i>
Cutícula à base de proteína	<i>Gld; Itp-r83A</i>
Via de sinalização de Wnt	<i>Wnt2</i>

Tabela 15: Principais Processos Biológicos atribuídos aos genes classificados como Genes Maternos Classe I Diploides. Estes processos são baseados em termos do banco de dados do Gene Ontology e foram selecionados de acordo com a relevância na embriogênese.

Processos Biológicos (Genes Maternos Classe I Diploides)	Genes
Processos do sistema nervoso	<i>mbl; ninaA; Itp-r83A</i>
Percepção sensorial	<i>mbl; ninaA; Itp-r83A</i>
Cognição	<i>Or49b; mbl; ninaA</i>
Percepção visual	<i>mbl; ninaA; Itp-r83A</i>
Percepção ao estímulo da luz	<i>mbl; ninaA; Itp-r83A</i>
Biossíntese do pigmento do olho	<i>car; ninaA</i>
Pigmentação do olho	<i>car; ninaA</i>
Pigmentação durante o desenvolvimento	<i>car; ninaA</i>
Regulação da expressão gênica	<i>HLH4C</i>

Tabela 16: Principais Processos Biológicos atribuídos aos genes classificados como Genes Zigóticos Classe I Haploides. Estes processos são baseados em termos do banco de dados do Gene Ontology e foram selecionados de acordo com a relevância na embriogênese.

Processos Biológicos (Genes Zigóticos_classel_haploides)	Genes (exemplos)
Regulação de transcrição	<i>C15; Ets21C</i>
Transdução de sinal ligado a receptor de superfície	<i>AdoR; Ac76E</i>
Regulação de transcrição, DNA-dependente	<i>CtBP; Ets21C</i>
Processo metabólico de RNA	<i>Hr38; Poxn</i>
Via de sinalização por receptor de proteína G	<i>DopEcR; GRHRII</i>
Sinalização mediada por segundo mensageiro	<i>Ac76E; DopR2</i>
Transporte de íons	<i>Rdl; nAcRbeta-64B</i>
Ativação de atividade de adenilato ciclase	<i>DopR2; Octbeta3R</i>
Regulação positiva da atividade adenilato ciclase	<i>DopR2; Octbeta3R</i>
Sinalização de proteína G, acoplado ao segundo mensageiro cAMP	<i>DopR2; Octbeta3R</i>
Regulação positiva da atividade ciclase	<i>DopR2; Octbeta3R</i>
Regulação de processo Biosintético de cAMP	<i>Ac76E; Octbeta3R</i>

Regulação de biossíntese de nucleotídeo	<i>Ac76E; Octbeta3R</i>
Regulação de processo metabólico de cAMP	<i>Ac76E; Octbeta3R</i>
Regulação de atividade adenilato ciclase	<i>Ac76E; Octbeta3R</i>
Regulação de processo metabólico de ciclase	<i>Ac76E; Octbeta3R</i>
Regulação de processo Biossintética de nucleotídeos cíclicos	<i>Ac76E; DopR2</i>
Regulação de processo metabólico de nucleotídeos cíclicos	<i>Ac76E; DopR3</i>
Regulação de atividade liase	<i>Ac76E; DopR4</i>
Regulação de processo metabólico de nucleotídeo	<i>Ac76E; DopR5</i>
Sinalização mediada por cAMP	<i>Ac76E; DopR6</i>
Sinalização mediada por nucleotídeo cíclico	<i>Ac76E; DopR7</i>
Regulação de adenilato ciclase envolvida na sinalização de proteína-G	<i>Ac76E; DopR8</i>

Tabela 17: Principais Processos Biológicos atribuídos aos genes classificados como Genes Zigóticos Classe I Diploides estão envolvidos. Estes processos são baseados em termos do banco de dados do Gene Ontology e foram selecionados de acordo com a relevância na embriogênese.

Processos Biológicos (Genes Zigóticos_classeI_diploides)	Genes (exemplos)
Regulação de transcrição	<i>Fer1; Fer3</i>
Transdução de sinal ligado a receptor de superfície	<i>AdoR; Ac76E</i>
Regulação de transcrição, DNA-dependente	<i>CtBP; Ets21C</i>
Processo metabólico de RNA	<i>Hr38; Poxn</i>
Via de sinalização por receptor de proteína G	<i>SIFR; GRHR11</i>
Organização de projeção celular	<i>BBS8; Ptp69D</i>
Invaginação da membrana	<i>cyp33; Act5C</i>
Sinalização mediada por segundo mensageiro	<i>Ac76E; DopR2</i>
Transporte de amino	<i>Eaat1; GluClalpha</i>
Regulação positiva de função molecular	<i>Octbeta3R; Dap160</i>
Ativação de atividade de adenilato ciclase	<i>DopR2; Octbeta3R</i>
Regulação positiva da atividade adenilato ciclase	<i>DopR2; Octbeta3R</i>
Sinalização de proteína G, acoplado ao segundo mensageiro cAMP	<i>DopR2; Octbeta3R</i>
Regulação positiva da atividade ciclase	<i>DopR2; Octbeta3R</i>
Regulação de processo Biossintética de cAMP	<i>Ac76E; Octbeta3R</i>
Regulação de biossíntese de nucleotídeo	<i>Ac76E; Octbeta3R</i>
Regulação de processo metabólico de cAMP	<i>Ac76E; Octbeta3R</i>
Regulação de atividade adenilato ciclase	<i>Ac76E; Octbeta3R</i>
Regulação de processo metabólico de ciclase	<i>Ac76E; Octbeta3R</i>
Regulação de processo Biossintético de nucleotídeos cíclicos	<i>Ac76E; DopR2</i>
Regulação de processo metabólico de nucleotídeos cíclicos	<i>Ac76E; DopR3</i>
Regulação de atividade liase	<i>Ac76E; DopR4</i>
Regulação de processo metabólico de nucleotídeo	<i>Ac76E; DopR5</i>
Sinalização mediada por cAMP	<i>Ac76E; DopR6</i>
Sinalização mediada por nucleotídeo cíclico	<i>Ac76E; DopR7</i>
Regulação de adenilato ciclase envolvida na sinalização de proteína-G	<i>Ac76E; DopR8</i>
Atividade adenilato ciclase por sinalização de proteína G	<i>Ac76E; DopR9</i>
Transporte de ácido di-carboxílico	<i>Eaat1; CG1907</i>

Tabela 18: Principais Processos Biológicos atribuídos aos genes classificados como Genes Zigóticos Classe II Haploides estão envolvidos. Estes processos são baseados em termos do banco de dados do Gene Ontology e foram selecionados de acordo com a relevância na embriogênese.

Processos Biológicos (Genes Zigóticos_classeII_haploides)	Genes (exemplos)
Transporte intracelular	<i>Cog3; Tim10</i>
Organização de cromatina	<i>CG7950; His4:CG33905</i>
Organização celular de subunidade de complexo de macro molécula	<i>Iswi; betaTub85D</i>
Montagem de complexo macromolecular	<i>His2B:CG33870; His3:CG33812</i>
Transporte de proteína	<i>Slh; sec6</i>
Organização de cromossomo	<i>Hdac3; His2B:CG33870</i>
Transporte mediado por vesícula	<i>Ip259; brat</i>
Localização proteica	<i>cos; Cog3</i>
Processo metabólico de ncRNA	<i>dbe; wuho</i>
Cascata de sinalização intracelular	<i>Rap2l; Pka-C1</i>
Regulação de ciclo celular	<i>rap; Su(H)</i>
Transporte intracelular de proteína	<i>CG33331; Tim10</i>
Localização celular de proteína	<i>Slh; Tom40</i>
Montagem de nucleossomo	<i>His2B:CG33870; His3:CG33812</i>
Montagem de cromatina	<i>His3:CG33812; His4:CG33905</i>
Organização de nucleossomo	<i>His4:CG33905; Iswi</i>
Montagem de complexo proteína-DNA	<i>His2B:CG33870; His3:CG33812</i>
Transporte mitocondrial	<i>CG33331; CG14043</i>
Montagem e desmontagem de cromatina	<i>His2B:CG33870; His3:CG33812</i>
Empacotamento de DNA	<i>His2B:CG33870; His3:CG33813</i>
Organização mitocondrial	<i>tam; CG33331</i>
Processamento de ncRNA	<i>dbe; wuho</i>
Modificação de cromatina	<i>Hdac3; His2B:CG33870</i>
Processo metabólico de rRNA	<i>brat; dba</i>
Transporte de RNA	<i>nxf2; sbr</i>
Transporte de ácidos nucleicos	<i>Cog3; nxf2</i>
Localização de RNA	<i>sbr; Cog3</i>
Regulação positiva de atividade do fator de transcrição <i>hh</i>	<i>Pka-C1; cos</i>
Regulação positiva de ligação ao DNA	<i>Pka-C1; cos</i>
Regulação positiva de atividade do fator de transcrição	<i>Pka-C1; cos</i>
Regulação positiva de ligação	<i>Pka-C1; cos</i>
Regulação de atividade de fator de transcrição	<i>Pka-C1; cos</i>
Regulação positiva de ciclo celular mitótico	<i>Su(H); vfl</i>
Regulação de ligação	<i>Pka-C1; cos</i>
Regulação de ligação ao DNA	<i>Pka-C1; cos</i>

Tabela 19: Principais Processos Biológicos os quais os genes classificados como Genes Zigóticos Classe II Diploides. Estes processos são baseados em termos do banco de dados do Gene Ontology e foram selecionados de acordo com a relevância na embriogênese.

Processos Biológicos (Genes Zigóticos_classeII_diploides)	Genes (exemplos)
Transporte intracelular	<i>Cog3; Tim10</i>

Organização de cromatina	<i>CG7950; His4:CG33905</i>
Organização celular de subunidade de complexo de macro molécula	<i>Iswi; betaTub85D</i>
Montagem de complexo macromolecular	<i>His2B:CG33870; His3:CG33812</i>
Transporte de proteína	<i>Slh; sec6</i>
Organização de cromossomo	<i>Hdac3; His2B:CG33870</i>
Transporte mediado por vesícula	<i>Ip259; brat</i>
Localização proteica	<i>cos; Cog3</i>
Processo metabólico de ncRNA	<i>dbe; wuho</i>
Cascata de sinalização intracelular	<i>Rap21; Pka-C1</i>
Regulação de ciclo celular	<i>rap; Su(H)</i>
Transporte intracelular de proteína	<i>CG33331; Tim10</i>
Localização celular de proteína	<i>Slh; Tom40</i>
Montagem de nucleossomo	<i>His2B:CG33870; His3:CG33812</i>
Montagem de cromatina	<i>His3:CG33812; His4:CG33905</i>
Organização de nucleossomo	<i>His4:CG33905; Iswi</i>
Montagem de complexo proteína-DNA	<i>His2B:CG33870; His3:CG33812</i>
Importação de proteínas	<i>CG33331; cos</i>
Montagem e desmontagem de cromatina	<i>His2B:CG33870; His3:CG33812</i>
Empacotamento de DNA	<i>His2B:CG33870; His3:CG33813</i>
Organização mitocondrial	<i>tam; CG33331</i>
Processamento de ncRNA	<i>dbe; wuho</i>
Modificação de cromatina	<i>Hdac3; His2B:CG33870</i>
Regulação da fase S do ciclo celular	<i>Su(H); CG10336</i>
Transporte de RNA	<i>nx2; sbr</i>
Transporte de ácidos nucleicos	<i>Cog3; nx2</i>
Regulação positiva de atividade do fator de transcrição hh	<i>Pka-C1; cos</i>
Regulação positiva de ligação ao DNA	<i>Pka-C1; cos</i>
Regulação positiva de atividade do fator de transcrição	<i>Pka-C1; cos</i>
Regulação positiva de ligação	<i>Pka-C1; cos</i>
Regulação de atividade de fator de transcrição	<i>Pka-C1; cos</i>
Regulação positiva de ciclo celular mitótico	<i>Su(H); vfl</i>
Regulação de ligação	<i>Pka-C1; cos</i>
Regulação de ligação ao DNA	<i>Pka-C1; cos</i>

Tabela 20: Principais Processos Biológicos atribuídos aos genes classificados como Genes Zigóticos Classe III Haploides. Estes processos são baseados em termos do banco de dados do Gene Ontology e foram selecionados de acordo com a relevância na embriogênese.

Processos Biológicos (Genes Zigóticos classeIII haploides)	Genes (exemplos)
Regulação da transcrição	<i>Fer2;Six4</i>
Regulação da transcrição DNA-dependente	<i>Dr; acj6; bsh</i>
Regulação de processo metabólico do RNA	<i>br; dsf</i>
Via de sinalização por receptor de proteína G	<i>stops; mtt</i>
Transporte de íons	<i>NAAT1; Ir93a</i>
Organização de projeção celular	<i>G-olpha47A; LanA</i>
Regionalização	<i>NetB; dpp; tll</i>
Percepção de estímulos químicos	<i>Or30a; acj6</i>

Transporte de íons metálicos	<i>CG10440; NAAT1</i>
Sinalização pro receptor de proteína quinase serina/treonina	<i>dpp; shn</i>
Transporte de amino ácido	<i>CG7708; NAAT1</i>
Transporte de amino	<i>CG7708; CG13384</i>
Diferenciação do sexo	<i>br; dpp; em</i>
Desenvolvimento da ectoderme	<i>shn; dpp</i>
Formação do eixo antero posterior	<i>dpp; em</i>
Formação do sincício pela invaginação de membrana	<i>rols; Six4</i>
Formação de sincício	<i>Mp20; rols</i>
Desenvolvimento da corda ventral	<i>Dr; G-alpha47A</i>
Desenvolvimento de características sexuais primárias	<i>br; en; Six4</i>

Tabela 21: Principais Processos Biológicos atribuídos aos genes classificados como Genes Zigóticos Classe III Diploides. Estes processos são baseados em termos do banco de dados do Gene Ontology e foram selecionados de acordo com a relevância na embriogênese.

Processos Biológicos (Genes Zigóticos classeIII diploides)	Genes (exemplos)
Transdução de sinal ligado a receptor de superfície	<i>Hs3st-B; dpp</i>
Via de sinalização por receptor de proteína G	<i>Arr1; D2R</i>
Transporte de íons	<i>Nha1; Nmdar1</i>
Deteção de estímulos	<i>trpl; Arr1</i>
Formação do eixo dorso ventral	<i>Dr; dpp</i>

Tomando como base as redes de regulação miRNA:mRNA preditas na questão 3, foi feita uma busca pelos genes e miRNAs classificados como maternos e zigóticos, em cada tipo de rede (haploide, diploide e compartilhada), na tentativa de definir a origem da regulação em cada tipo de embrião: miRNAs maternos regulam genes zigóticos ou vice-versa?

Desta forma, os genes classificados como maternos expressos em embriões diploides (mRNA materno diploides), foram localizados nas redes de regulação “exclusiva de embriões diploides” e em “compartilhada entre os dois embriões”. Mas, apenas na rede de embriões diploides que foram encontrados mRNA maternos. Portanto, uma sub-rede de regulação de mRNA materno foi gerada (Figura 21). Dentro desta sub-rede nós destacamos os miRNAs reguladores, maternos, zigóticos e não definidos, com cores diferentes para facilitar a visualização da origem de regulação dos genes maternos expressos em embriões diploides de até 24 h de desenvolvimento.

Para os genes classificados como zigóticos (classes I, II e III) expressos em embriões diploides (mRNA zigóticos diploides) e em embriões haploides (mRNA zigóticos haploides) a busca foi feita separadamente. Nas redes de regulação “exclusiva de embriões diploides” e em “compartilhada entre os dois embriões” foram localizados mRNA zigóticos diploides. Nas redes de regulação “exclusiva de embriões haploides” e em “compartilhada entre os dois embriões” foram localizados mRNA zigóticos haploides. Em todas as buscas foram encontrados algum mRNA zigótico. Portanto, quatro sub-rede de regulação de mRNA zigóticos foram geradas (“Rede de regulação de genes zigóticos haploides”, “Rede de regulação de genes zigóticos diploides”, “Rede de regulação de Genes zigóticos haploides gerada a partir da rede compartilhada” e “Rede de regulação de Genes zigóticos diploides gerada a partir da rede compartilhada”) (Figuras 22, 23, 24). Dentro de cada sub-rede nós destacamos os miRNAs reguladores, maternos, zigóticos e não definidos, com cores diferentes para facilitar a visualização da origem de regulação dos genes zigóticos expressos em embriões diploides de até 24 h de desenvolvimento.

Foram encontrados genes maternos apenas na Rede de regulação de embriões diploides (Figura 21). Apenas um desses genes é regulado por um único miRNA materno. No geral, os miRNAs zigóticos regulam mais genes, como todas mostram as sub-redes, (Figuras 22, 23 e 24). Observamos também que existem muitos miRNAs “não determinados” quanto a sua origem (maternos ou zigóticos) regulando genes maternos e zigóticos entre os embriões de *A. mellifera*.

Nós enriquecemos as redes de acordo com a classificação adotada para as nossas análises. Desta forma, acreditamos que a visualização dos resultados da análise da regulação dos genes zigóticos e maternos que atuam no início da embriogênese de *A. mellifera* fica mais fácil. Como dito, a classificação dos miRNAs quanto a sua origem

foi feita de acordo com a expressão do miRNA maduro. Por isso, a expressão dos precursores seria necessária, já que também observamos pri-miRNAs dentro de núcleos em clivagem (Figuras 12, 13 e 14).

Figura 21: Rede de regulação miRNA:mRNA enriquecida com mRNAs maternos diploides. mRNAs definidos como maternos diploides (classe I e classe II) são resultantes da busca na rede de regulação exclusiva de embriões diploides, tal como seus miRNAs reguladores e uma sub-rede. Dentre os miRNAs reguladores foram destacados os classificados como zigóticos diploides, maternos diploides e não definidos (legenda da Figura).

Rede de regulação de genes zigóticos haploides

Figura 22: Rede de regulação miRNA:mRNA enriquecida com mRNAs zigóticos haploides. mRNAs definidos como zigóticos haploides (classe I, classe II e classe III) são resultantes da busca na rede de regulação exclusiva de embriões haploides, tal como seus miRNAs reguladores e uma sub-rede. Dentre os miRNAs reguladores foram destacados os classificados como zigóticos, maternos e não definidos (legenda da Figura).

Rede de regulação de genes zigóticos diploides

Figura 23: Rede de regulação miRNA:mRNA enriquecida com mRNAs zigóticos diploides. mRNAs definidos como zigóticos diploides (classe I, classe II e classe III) são resultantes da busca na rede de regulação exclusiva de embriões diploides, tal como seus miRNAs reguladores e uma sub-rede. Dentre os miRNAs reguladores foram destacados os classificados como zigóticos, maternos e não definidos (legenda da Figura).

Redes geradas a partir da rede compartilhada:

Figura 24: Redes de regulação miRNA:mRNA enriquecida com mRNAs zigóticos diploides e haploides, geradas a partir da rede de regulação compartilhada. mRNAs definidos como zigóticos diploides e haploides (classe I, classe II e classe III) são resultantes da busca na rede de regulação compartilhada, tal como seus miRNAs reguladores e uma sub-rede. Dentre os miRNAs reguladores foram destacados os classificados como zigóticos, maternos e não definidos (legenda da Figura).

4.5.2. Expressão e localização de pri-miRNAs

A hibridação *in situ* com marcação dos miRNAs *ame-mir-34-5p*, *ame-mir-375-3p*, *ame-mir-263b-5p* parece indicar a presença de pri-miRNA, precursores destes, dentro dos núcleos em clivagem (Figuras 12, 13 e 14). Como já dito o protocolo de hibridação *in situ* utilizado marca os pri-miRNAs dentro dos núcleos, mas pode marcar também os miRNAs maduros no citoplasma. Por isso, nós realizamos a reação em cadeia da polimerase (PCR) para verificar se o pri-miRNA estaria presente em fases iniciais da embriogênese (0-2 h e 0-6 h). Como o pri-miRNA apresenta a cauda poliA apenas dentro do núcleo, logo depois da sua transcrição, nós utilizamos como *template* cDNA feito a partir de RNA total, com o protocolo que recupera apenas os RNAs com cauda poliA (ver materiais e métodos). Um ensaio de qPCR em tempo real foi feita, com algumas das amostras para a confirmação da expressão. O resultado indicou que a ligação dos *primers* com o *template* é específica (resultados não mostrados).

Nós determinamos o perfil de expressão dos genes que codificam proteínas da biogênese de miRNA (Lucas & Raikhel 2013). Se as moléculas que processam os precursores de miRNAs estiverem presentes em 0-2 h e 0-6 h, potencialmente o embrião seria capaz de processar pri-miRNAs que estão sendo produzidos. No gráfico (Figura 25) podemos observar que os principais mRNA que codificam as moléculas da biogênese de miRNAs estão expressos em todas as fases analisadas, nos dois tipos de embriões. G49096/*Drosha*, GB50955/*AGO2* e GB46636/*Nbr* são os genes mais expressos nas fases de 0-2 h e 0-6 h, indicando o potencial de processamento de pri-miRNAs nesta fase.

Os resultados das hibridações *in situ* e de PCR estão mostrados na Figura 26. Como podemos observar a presença do pri-miRNA nos núcleos em clivagem (Figuras 26 A-G e J-L) e a presença da banda (pri-miRNAs) (Figura 26-N), nas mesmas fases de

desenvolvimento, onde o embrião está em clivagem (0-2 h e 0-6 h), indica que já nestas fases está ocorrendo transcrição zigótica.

Figura 25: Perfis de expressão dos mRNA dos genes que codificam proteínas envolvidas na biogênese de miRNA. Os valores de expressão são dados em RPKM desde de ovócitos maduros a embriões diploides e haploides de 0-2, 0-6 e 18-24 h de *A. mellifera*.

Figura 26: Expressão de *pri-ame-mir-375* (A e B: 0-2 h; C e D: 0-6 h), *pri-ame-mir-34* (E e F: 0-2 h; G e H: 0-6 h) e *pri-ame-mir-263b* (I e J: 0-2 h; K e L: 0-6 h) por Hibridação *in situ* e expressão por PCR (N). (A, B, C, D, E, F, H, J, K e L) As setas mostram a presença de pri-miRNA dentro dos núcleos em clivagem. (N) As bandas em gel de agarose 2% indicam que pri-miRNAs estão expressos em ovócitos maduros, embriões haploides e diploides de 0-2 h e 0-6 h (em clivagem). Os controles negativos (16 em N), sem cDNA, de *pri-ame-mir-263b* e U6 apareceram bandas inespecíficas, sendo que ensaios de qPCR em tempo real, confirmaram este fato, mostrando picos de amplificação também inespecíficos nos controles negativos (dados não mostrados).

4.5.3. Análise dos genes reguladores da transição materno-zigótica

4.5.3.1. *Smaug*

O mRNA *smaug* (GB48452) está presente em ovócitos maduros e em embriões haploides e diploides de *A. mellifera* até 24 h de desenvolvimento (Figura 27).

Para avaliar se existe conservação quanto a regulação da transição materno-zigótica por *smaug* nós buscamos ortólogos de genes, entre os genes expressos em embriões haploides e diploides até 24 h de desenvolvimento e dois conjuntos de genes (1 e 2) definidos por Siddiqui *et al.* (2012), como sendo regulados por *smaug*.

Usando os critérios acima descritos, encontramos 69 genes ortólogos dos genes do conjunto 1 de Siddiqui *et al.* (2012), ou seja, genes que diminuem sua expressão de 0-6 h até 18-24 h em mais de 5 RPKM, nos dois tipos de embriões. Os ortólogos do conjunto 2 definidos por Siddiqui *et al.* (2012), somaram 65 genes. O “conjunto 2” é formado por genes que aumentam sua expressão de 0-6 h até 18-24 h em mais de 5 RPKM, nos dois tipos de embriões (Figura 28) (Anexo 4).

Os conjuntos de genes definidos como regulados por *smaug*, segundo os critérios acima, foram usados para gerar sub-redes a partir das redes “Rede Exclusiva de Embriões Haploides”, “Rede Exclusiva de Embriões Diploides” e “Rede Compartilhada, Diploide e Haploide” (Figura 29). As redes compartilhadas se diferenciam entre diploides e haploides, pela classificação dos miRNAs e mRNA, pois

existem genes que foram considerados zigóticos em embriões haploides e maternos em diploides ou vice-versa. Não foi encontrado nenhum gene do conjunto 2 na Rede compartilhada. Em todas as redes nós destacamos de cores diferentes os miRNAs e RNAs classificados como zigóticos e os classificados como maternos. Desta forma, é possível observar que alguns genes supostamente regulados por *smaug* não são classificados nem como maternos, nem como zigóticos. Além disso, os miRNAs zigóticos são os principais reguladores em todas as sub-redes geradas, ou seja, dos genes que são regulados por *smaug*. Nenhum mRNA materno entre os genes dos conjuntos 1 e 2 está regulado por miRNAs. Mas miRNAs maternos aparecem como reguladores de alguns destes genes e está presente em todas as redes. Sendo que na rede de haploides, onde foi encontrado apenas um gene do conjunto 2, zigótico, apenas um miRNA de origem materna é o regulador.

Smaug pode ser, desta forma, um elemento regulador da transição materno-zigótica também em abelha, assim como em *Drosophila*.

Figura 27: Perfil de expressão de *smaug* (GB48452/*smg*) em ovócitos maduros e nos dois tipos de embriões com até 24 h de desenvolvimento.

Figura 28: Perfil de expressão de cada conjunto de genes supostamente regulados por *smaug*. Os genes foram agrupados de acordo com os conjuntos definidos no material e métodos. As linhas azuis representam a expressão de genes de embriões diploides, dada em RPKM, ortólogos de *Drosophila*, segundo critérios definidos por Siddiqui *et al.* (2012). As linhas vermelhas representam a expressão de genes de embriões haploides, dada em RPKM, ortólogos aos genes de *Drosophila*, segundo os mesmos critérios.

Redes de regulação (miRNA:mRNA) de genes putativamente regulados por Smaug

Figura 29: Redes putativas de regulação miRNA:mRNA enriquecidas com mRNAs classificados nos conjuntos 1 e 2, de genes provavelmente regulados por *smaug*. Os mRNAs são resultantes da busca na rede de regulação exclusiva de embriões diploides, tal como seus miRNAs reguladores, gerando assim cinco sub-redes. Dentre os miRNAs reguladores foram classificados como zigóticos, maternos e não definidos (legenda da Figura).

4.5.3.2. *Zelda*

Zelda, também conhecido com *vielfaltig (vlf)* em *Drosophila* tem um ortólogos em *A.mellifera*, o GB52047, que está expresso nos dois tipos de embriões até 24 h, sendo sua expressão mais baixa em ovócitos maduros (Figura 30) e compatível com o perfil da proteína *Zelda* de *Drosophila* (Figura 30 B).

Ao observamos as hibridações *in situ* deste gene, percebemos que ele está presente em todo o desenvolvimento embrionário de *A. mellifera* (Figura 32). A marcação deste gene em ovócitos parece se concentrar nas extremidades do ovócito (Figura 32-A). Como aparece na marcação da proteína *Zelda* em *Drosophila* (Figura 31). Nos embriões de 2 h de desenvolvimento a marcação é maior ao redor dos núcleos (Figuras 32-C e 32-D). Durante a clivagem este gene também parece que está sendo expresso, apresentando uma marcação concentrada na região central do embrião durante a formação da blastoderme (Figuras 32-E e 32-F). A partir da idade de 42-38 h, *zelda* (GB52047/*vlf*), parece atuar na formação do sistema nervoso, pois é possível observar marcações mais fortes em estruturas primordiais características deste sistema (Figura 32I-K).

A presença de *zelda* (GB52047/*vlf*) no início da embriogênese de *A. mellifera*, tal como em outros insetos pode ser um indicativo que a sua função na ativação do genoma zigótico também esteja conservada. Desta forma, dentre os genes zigóticos motivos conservado em cada conjunto de gene zigótico (haploide e diploide, classes I, II e III). Para cada conjunto de gene zigótico foi selecionado um motivo consenso conservado, com mais de 80% de cobertura (Anexo 5).

Para testar se algum desses motivos encontrados utilizando o SCOPE (Tabela 22) pode ser homólogo aos motivos TAGteam de *Drosophila* e *Aedes* (ten Bosch *et al.* 2006; De Renzis *et al.* 2007; Biedler *et al.* 2012), nós alinhamos as matrizes de peso de posição dos motivos (PWM - *position weight matrix*) geradas pelo SCOPE em cada um dos motivos consenso, com as PWM

utilizadas por (Biedler *et al.* 2012) correspondentes aos motivos TAGteam (ten Bosch *et al.* 2006; De Renzis *et al.* 2007). Também alinhamos as PWM dos motivos encontrados para as classes de genes zigóticos de *A. mellifera*, com as sequências dos motivos TAGteam (ten Bosch *et al.* 2006; De Renzis *et al.* 2007). As PWM e sequências utilizadas para estas análises estão no Anexo 5.

Os melhores alinhamentos (com os melhores *e-value*) de cada consenso selecionado para cada classe de genes de embriões de *A. mellifera*, com as sequências ou PWM TAGteam, estão mostrados na Tabela 22. Os alinhamentos das PWMs de cada motivo de *A. mellifera* com as sequências dos motivos TAGteam retornaram melhores valores com a sequência TAGteam1 de *Drosophila*. Apenas a PWM do motivo TAGteam de *A. aegypt* (Biedler *et al.* 2012) se alinhou com o motivo consenso de “classeII_diploide”. O alinhamento com melhor *e-value* foi o motivo “classeIII_haploide”, NNTCCN, reverso complementar de DGGAND (dado por SCOPE, Tabela 24 e Figura 33), com o motivo YAGGTAG_PWM_Bosch_25 (PWM) e TAGteam1 (sequência), sendo que o mesmo valor de *e-value* foi encontrado para três dos outros motivos alinhados (Tabela 23).

O motivo NNRCN está presente no promotor de 532 genes zigóticos de classe III de embriões haploides. Estes genes também estão expressos em embriões diploides, sendo 185 classificados como classe III de zigóticos, 68 como maternos de classe I e o restante, como não determinados (Tabela 25). Para avaliar se dentre estes genes existe conservação com genes de *Drosophila* que contém motivo TAGteam em seu promotor e são regulados por *Zelda*, nós buscamos ortólogos de 104 genes de *Drosophila*, descrito por ten Bosch *et al.* (2006) entre os genes 532 genes de *A. mellifera* que apresentam o motivo NNTCCN.

Nós encontramos 5 genes, entre os 532 com o motivo NNTCCN, ortólogos de genes de *Drosophila* que apresentam TAGteam em seu promotor e são regulados por *zelda* (Figura 34). Além disso, observando os Processos Biológicos que os genes zigóticos de classe III haploides e

diploides (Tabelas 20 e 21) estão envolvidos, nós encontramos os processos “diferenciação do sexo”, “formação de sincício (blastoderme)” e “formação do eixo dorso ventral”, que são coincidentes com os processos descritos para *Drosophila* (ten Bosch *et al.* 2006). Por isso, nós consideramos como principais candidatos a genes regulados por *zelda* em embriões de *A. mellifera*, os genes GB42311/*CG13636*, GB48272/*br (broad)*, GB44168/*dpp (decapentaplegic)*, GB46515/*CG10175*, GB52015/*tll (tailless)*, GB47493/*Dr (droopy)*, GB55322/*en (engrailed)* (Figura 35).

Apenas um dos genes candidatos a regulação por *zelda* também é regulado por miRNAs (Figura 35). *Broad* (GB47272/*Br*) foi classificado como materno em embriões diploides e como zigótico em embriões haploides, sendo que na rede de diploides ele é regulado por quatro miRNAs (*ame-mir-6053-5p*, materno, *ame-mir-305-5p* e *ame-mir-275-5p*, zigóticos, e *ame-mir-12-5p*, não determinado) e na rede de haploides por um miRNA zigótico (*ame-mir-3785-5p*).

Figura 30: Perfil de expressão de *zelda* (GB52047/*vlf*) em ovócitos maduros e nos dois tipos de embriões com até 24 h de desenvolvimento de *Apis mellifera*, em A. Em B (retirada de Nien *et al.* 2011), expressão da proteína Zelda em *Drosophila* no mesmo período do desenvolvimento, mostrando além das horas de desenvolvimento o número de ciclos mitóticos (14) que ocorreram até aquele momento do desenvolvimento.

Proteína Zelda (Nein *et al.*, 2011)

Figura 31: Marcação da proteína Zelda em embriões de *Drosophila* no início da clivagem (A), mostrando a localização de zelda nos núcleos e em embriões em blastoderme celular (B) (Nien *et al.* 2011).

Zelda (GB52047/*vft*)

Figura 32: Localização e expressão de *zelda* (GB52047/vlf) em embriões de *A. mellifera*. (A) Expressão de *zelda* em ovócitos maduros com a marcação mais forte na porção anterior do embrião. Em B, C e D o embrião tem 2 h de desenvolvimento. No detalhe é possível observar os núcleos em divisão, onde está concentrado este gene (C e D). (L e M) Embriões haploides com marcação de *zelda* ao longo do corpo do embrião. A seta indica a presença de uma linha antero-posterior ventral (M). (E e F) Embrião com 6 h de desenvolvimento mostrando no detalhe a expressão de *zelda* nos núcleos em divisão celular. *Zelda* em embrião em blastoderme (18-24 h) (G), concentrado na região central do embrião. H mostra um embrião em gastrulação (32-38 h) com *zelda* se expressando por todo o embrião. Em embriões de 42-48 h (I e J) e 68-72 h (H) de desenvolvimento, *zelda* expressos em células primordiais do sistema nervoso. O * indica os precursores do cordão nervoso ventral. (N) controle negativo da hibridação *in situ*, quando usamos a sonda *sense* que teria a mesma sequência do gene em estudo, portanto não ocorreria a hibridação e consequentemente a marcação. A, B, G, H, L E N: escala de 200µm, objetiva de 10 X; E, J e M: escala de 100µm, objetiva de 20X; C, D escala de 50 µm, objetiva de 40X.

Tabela 22: Motivos consenso por SCOPE para cada classe de genes zigóticos em cada tipo de embrião, com o valor de cobertura para cada um deles, dado em porcentagem. Além do melhor alinhamento de cada um dos motivos consenso com as matrizes de peso de posição (PWM) e sequencias TAGteam e seus respectivos *e-value*.

SCOPE		STAMP		
	Motivo	Cobertura	Melhor alinhamento (Matriz TAGteam)	Melhor alinhamento (Sequencia TAGteam)
Haploide	Classe I	93.4%	YAGGTAG_PWM_Bosch_25 (E val: 6.3209e-02)	TAGteam1 (E val: 3.5322e-01)
	Classe II	100%	YAGGTA_PWM_Renzis_40 (E val: 6.5191e-01)	TAGteam1 (E val: 7.2878e-01)
	Classe III	96.7%	YAGGTAG_PWM_Bosch_25 (E val: 6.3209e-02)	TAGteam1 (E val: 6.3209e-02)
Diploide	Classe I	94.8%	YAGGTAG_PWM_Bosch_25 (E val: 6.3209e-02)	TAGteam1 (E val: 1.9399e-01)
	Classe II	97.6%	EZG_VBRGGTA_400 (E val: 4.0286e-01)	TAGteam1 (E val: 6.4873e-01)
	Classe III	89.2%	YAGGTA_PWM_Renzis_40 (E val: 7.7881e-01)	TAGteam1 (E val: 8.3157e-01)

Tabela 23: Nomenclatura, tipo (matriz de peso de posição PWM ou sequência), organismo e fonte dos motivos utilizados no alinhamento com os motivos consensos encontrados em *A. mellifera*.

Motivos		Organismo	Fonte	E value
>EZG_VBRGGTA_400	PWM	<i>Aedes</i>	Biedler, <i>et al</i> 2012	6,32E-02
>YAGGTA_PWM_Renzis_400	PWM	<i>Drosophila</i>	Biedler, <i>et al.</i> 2012	6,32E-02
>YAGGTAG_PWM_Bosch_2500	PWM	<i>Drosophila</i>	Biedler, <i>et al.</i> 2012	6,32E-02
>TAGteam1	Sequência	<i>Drosophila</i>	Bosch, <i>et al.</i> 2006	6,32E-02
>TAGteam2	Sequência	<i>Drosophila</i>	Bosch, <i>et al.</i> 2006	6,57E-02
>TAGteam3	Sequência	<i>Drosophila</i>	Bosch, <i>et al.</i> 2006	1,21E-01

Tabela 24: Top 10 entre os motivos identificados por SCOPE. O primeiro motivo “#1” foi o selecionado como melhor entre estas sequencias, sendo este motivo aquele que obteve melhor alinhamento com as PWM e sequencias TAGteam no STAMP (Tabela 22).

	Consensus Sequence	Count	Sig Value	Coverage	Algorithm
#1	dggand	8145	9.799.805	96.7%	PRISM
#2	gagga	1371	3.038.770	68.9%	PRISM
#3	ctcga	1426	2.447.648	72.0%	PRISM
#4	cgaga	1329	2.175.112	72.0%	PRISM
#5	acgag	1101	1.815.641	71.6%	PRISM
#6	ctcgc	766	1.699.945	54.9%	PRISM
#7	acgcg	992	1.684.403	58.7%	PRISM
#8	gatkcatgnbk	128	1.677.190	8.5%	PRISM
#9	cgaaa	2127	1.620.553	86.7%	PRISM
#10	cggcc	460	1.555.869	36.7%	PRISM

Figura 33: Motivo conservado entre os genes zigóticos de classe III de embriões haploides que melhor se alinhou com as PWM (matriz de peso de posição) e sequencias de motivos TAGteam. A Figura mostra a sequência consenso dada pelo SCOPE (DGGAND) e seu reverso complementar (NNATCCN), que melhor se alinhou aos TAGteam no STAMP.

Tabela 25: Motivo selecionado entre os genes zigóticos de classe III de embriões haploides de *A. mellifera* com melhor alinhamento com motivos TAGteam e o número de genes em cada tipo de embrião que apresentam este motivo no promotor.

Motivo consenso	Haploides	Diploides
NNATCCN	532 Genes	185 Genes Zigóticos Classe III
	zigóticos de Classe	68 Genes maternos classe I
	III	279 Genes com perfil não determinados

Figura 34: Perfil de expressão em ovócitos maduros e em embriões haploides e diploides de *A. mellifera* dos principais candidatos a regulação por zelda (GB52047/vlf), selecionados pela presença do motivo NNTCCN em seu promotor, processo biológico ao qual zelda regula em *Drosophila* e ortólogos descritos por Bosch *et al.* 2006, que coloca estes genes como regulados por zelda, devido a presença de TAGteam no seu promotor. Os genes relacionados a eventos iniciais da embriogênese, uma característica essencial dos genes TAGteam.

Figura 35: Sub-redes de regulação de *Broad* (GB47272/Br), gene candidato a regulação por *zelda* e também por miRNAs em embriões diploides e haploides de *A. mellifera*.

5. DISCUSSÃO

5.1. Diferenças na expressão genica entre embriões haploides e diploides (Questões 1 e 2)

O desenvolvimento embrionário e formação de um organismo completo a partir de uma única célula indiferenciada resultam de uma perfeita rede de interação da expressão gênica e seus produtos (Thomsen *et al.* 2010). Este processo pode ser descrito através de picos de expressão e períodos de silenciamento simultâneo de centenas de genes cuja visualização só se tornou possível com o desenvolvimento de novas tecnologias, como o sequenciamento de última geração, novas ferramentas de bioinformática e protocolos específicos de biologia molecular.

Os primeiros passos do desenvolvimento não inclui a ativação do ovo, ou seja terminação da meiose, em haploide ou diploide, pois já está descrito na literatura que a simples passagem do ovócito maduro pelo trato reprodutivo da fêmea, seja pelas diferenças de pH em cada porção do oviduto, pela composição iônica ou pressão mecânica são capazes de ativar o desenvolvimento e quebrar a dormência do ovócito provocando a finalização da meiose (Sasaki & Obara 2002)(Horner & Wolfner 2008; Stetina & Orr-Weaver 2011; Krauchunas *et al.* 2012). Concluindo, os ovócitos maduros, retirados diretamente dos ovários da rainha, ainda não foram estimulados e aqueles ovos coletados entre 0 e 1 h (2 h) já devem ter passado pelo processo de ativação.

A análise da expressão gênica entre embriões haploides e diploides mostrou diferenças quanto à fase analisada e quanto à correlação dos perfis de expressão dos mRNAs (Figura 6). Sendo a maior diferença observada entre embriões haploides e diploides quando se considera o conjunto de genes expressos entre 18-24 h.

Um total de 2105 genes apresentaram coeficiente de correlação negativo entre embriões haploides e diploides (Anexo 2) sendo, dessa forma, a maioria dos genes apresentam perfis de expressão parecida, ou seja, não antagônicos entre os dois tipos de embriões.

A ativação do ovo em *A. mellifera* pode ocorrer em até 30 min depois da postura e se o ovo não for fecundado ele se desenvolverá em um organismo haploide (Sasaki & Obara 2002). Desta forma, é esperado que genes responsáveis por este processo estejam sendo expressos de forma semelhante até pelo menos a fecundação. A presença de outro genoma, o paterno, pode trazer diferenças quanto a regulação. Em experimentos com células partenogéticas, Cui *et al.* (2013) viram que alguns miRNAs podem suprir a falta de *imprinting* dos genes herdados paternalmente. Aqui nós destacamos diferenças de expressão de genes em embriões de 0-1 h, 0-2 h, 0-6 h e 18-24 h do desenvolvimento, ou seja, ovo já ativado.

Cinquenta e cinco genes ligados à ativação do ovo de *Drosophila* (Horner & Wolfner 2008; Stetina & Orr-Weaver 2011; Krauchunas *et al.* 2012) estão diferencialmente expressos, *A. mellifera*, em 1 h de desenvolvimento embrionário e apenas 5 destes genes estão diferencialmente expressos em embriões de 2 h. Dentre estes destacamos o GB46257/*EDTP* (egg-derived tyrosine phosphatase), identificado por Yamaguchi *et al.* (1999). Este gene também apresentou o menor coeficiente de correlação entre embriões haploides e diploides (-0,919) e em *Drosophila* está distribuído por todo o embrião (Figura 7). Em *A. mellifera* está GB46257/*EDTP* diferencialmente expresso entre os embriões diploides e haploides de 18-24 h. Podemos sugerir que este gene estaria relacionado à fosforilação de proteínas em *A. mellifera*, tal como em *Drosophila* (Krauchunas *et al.* 2012), pois sua expressão em 1 h também é

alta. Mas a sua alta expressão em embriões haploides de 18-24 h sugere uma função específica neste período do desenvolvimento de haploides.

GB40823/*yl* (*yolkless*), gene ligado à ativação do ovo (Krauchunas *et al.* 2012) e a transição materno-zigótica (Gilbert 2010) está diferencialmente expresso entre os dois tipos embriões nas bibliotecas de 0-1 h, 0-6 h e 18-24 h. Ele está localizado por todo o embrião de *Drosophila* nos estágios 1-3 e de 4-5, que corresponde as fases de 0-6 h e 18-24 h de abelhas (Figura 7). Mesmo com diferença de expressão em 3 fases, o perfil de expressão deste gene nos dois tipos de embrião de abelhas não é antagônico (coeficiente de correlação = 0,828). A maior diferença no perfil de expressão deste gene está em 1 h de desenvolvimento, onde a expressão em embriões diploides é maior, sendo que o perfil é similar nas fases seguintes, mas com diferença de expressão significativa (nas fases de 0-6 h e 18-24 h), maior em embriões diploides. Apesar *Yl*/RNAm se expressar durante a ovogênese, sendo a proteína que ele codifica um receptor da vitelogenina (Schonbaum *et al.* 2000), em *A. mellifera* ele parece ser importante no início da embriogênese, onde parece começar a ser degradado em 0-6 h de desenvolvimento de embriões diploides, sendo que em embriões haploides de 18-24 h de desenvolvimento do que em embriões diploides (Figura 7).

GB54808/*Mael* (*maelstrom*) difere sua expressão entre os dois tipos de embriões de 0-6 h e 18-24 h e possui perfil de expressão antagônico. Este gene está ligado a transição materno-zigótica (Gilbert 2010) e a outros processos da embriogênese de *A. mellifera* (Dearden *et al.* 2006). *Mael* faz parte da via de piRNA, juntamente com Vasa e Tudor, mantendo a integridade das células germinativas, masculinas e femininas, de vários organismos (Lim *et al.* 2013) e sendo importante na definição da polaridade do ovócito de *Drosophila* (Sato *et al.* 2011). A Figura 7 mostra que GB54808/*Mael* é muito expresso nos dois tipos de embriões com até 24 h de desenvolvimento, com uma

forte diferença de expressão em 18-24 h, maior em embriões haploides que em diploides. Sabendo-se que a via de piRNA está ligada a transição materno-zigótica atuando na degradação de RNAm maternos (Rouget *et al.* 2010) e que a ativação do genoma zigótico acontece logo antes da formação da blastoderme celular, em *Drosophila* (Pilot 2006; ten Bosch *et al.* 2006; Sung *et al.* 2013), podemos sugerir que GB54808/*Mael* pode estar atuando nesse processo também em *A. mellifera*. Em 18-24 h da embriogênese de *A. mellifera* está formando a blastoderme (Nelson 1915; Cruz-Landim 2009). No entanto, não existem dados sobre a transição materno-zigótica em *A. mellifera*. Desta forma, se este processo acontece de maneira similar e em corresponde ao de *Drosophila*, ou seja, entre 18 e 24 h do desenvolvimento, podemos inferir que GB54808/*Mael* atua de maneira diferente entre embriões haploides e diploides nesta fase do desenvolvimento, sendo esta a fase que em que este gene mais se diferencia entre os dois tipos de embriões (Figura 7).

A diferença significativa na expressão gênica em 6 h do desenvolvimento embrionário e os perfis de expressão antagônicos entre os dois tipos de embriões fazem de GB46257/*EDTP* um grande candidato a ter um papel na ativação do ovo e na transição materno-zigótica, podendo ser chave para desenvolvimento inicial específico de cada tipo organismos (haploides e diploide). Assim como GB40823/*yl* (*yolkless*) e GB54808/*Mael*, que mesmo não tendo perfis de expressão antagônicos, pontualmente eles diferem entre os dois tipos de embriões. Portanto, podemos adicioná-las à lista de genes importantes que podem estar envolvidos nos processos de ativação do ovo e transição materno-zigótica, mesmo que para esse último processo GB40823/*yl* não tenha ainda dados na literatura.

GB49029/*eve* (*even skipped*) é um importante gene no desenvolvimento embrionário de *A. mellifera*. Classificado como *pair-rule gene* ele atua na segmentação

do embrião (Wilson *et al.* 2010a; Wilson & Dearden 2012). Na Figura 9 mostramos o perfil de expressão e hibridação *in situ* deste gene durante o desenvolvimento embrionário de abelhas, sendo que em embriões de 18-24 h é possível observar a marcação das faixas, características deste tipo de gene (Wilson *et al.* 2010a; Wilson & Dearden 2012). Nossos resultados de expressão gênica mostram que ele possui expressão diferencial entre os embriões de 0-6 h e 18-24 h (Anexo 1), sendo que o perfil de expressão mostra este gene mais expresso em embriões haploides em 0-2 h e 0-6 h, e em 18-24 h maior em embriões diploides (Figura 8). Este gene, altamente conservado, em *Drosophila* é classificado como *pair-rule* (Campos-Ortega & Hastenstein 1997) está ligado a transição materno-zigótica (ten Bosch *et al.* 2006; De Renzis *et al.* 2007). É um importante candidato ao envolvimento neste mesmo processo em *A. mellifera*, atuando de forma diferente entre os dois tipos de embriões.

Para todos os genes diferencialmente expressos entre os dois tipos de embriões, em cada fase da embriogênese analisada, nós encontramos importantes processos biológicos (Tabela 3). Entre os genes diferencialmente expressos em 1 h do desenvolvimento, processos ligados à divisão celular, como “organização do fuso mitótico” e “Transição G2/M do ciclo celular mitótico” são muito abundantes, assim como encontrados entre os genes diferencialmente expressos em embriões de 2 h, 0-6 h e 18-24 h de desenvolvimento. O início do desenvolvimento embrionário é caracterizado por intensa atividade mitótica, nos modelos aqui considerados, não ocorre divisão celular (Nelson 1915; DuPraw 1967; Campos-Ortega & Hastenstein 1997). Por isso, é esperado que genes ligados a processos envolvidos na divisão celular estejam presentes em altos níveis até 24 h de desenvolvimento, pois na fase seguinte, na gastrulação há uma redução na velocidade e número de divisões celulares, se caracterizando por movimentos celulares (Nelson 1915; Campos-Ortega & Hartenstein

1997). Interessante pensar que estes genes, por estarem diferencialmente expressos entre embriões haploides e diploides, agem de forma diferente nos dois tipos de embriões no que diz respeito a processos chaves da embriogênese, como a clivagem e blastoderme. Isto pode significar uma diferença temporal ou apenas pontual, mas que é importante para o desenvolvimento diferencial dos sexos, já que haploides da origem a um organismo macho e diploide à fêmea.

Neste sentido, percebemos que alguns genes (10 genes) diferencialmente expressos em 18-24 h estão envolvidos na “determinação do sexo”. Sabendo que genes que são transcritos na primeira onda de transcrição de genes zigóticos em *Drosophila*, estão envolvidos na celularização e determinação do sexo, e que isso acontece logo antes a formação da blastoderme celular (Pilot 2006; ten Bosch *et al.* 2006), estes genes são fortes candidatos para este papel também em *A. mellifera*.

Apesar de em *Drosophila* e *zebrafish* o genoma zigótico seja ativado logo antes da blastoderme celular, como já dito (Pilot 2006; ten Bosch *et al.* 2006), processos ligados a “a regulação da transcrição”, “modificação de cromatina e cromossomos” já são abundantes entre os genes diferencialmente expressos em 0-6 h (Tabela 5). Este fato nos faz pensar que estes genes estão sendo transcritos já durante a clivagem. Estes mRNAs são traduzidos e logo tem que ser degradados (Stitzel & Seydoux 2007; Tadros & Lipshitz 2009b; Cui *et al.* 2013). Desta forma, mesmo sem conhecer a origem da regulação, materno ou zigótica, podemos sugerir que miRNAs ou outros tipos de RNAs reguladores estão envolvidos na regulação da expressão gênica logo no início do desenvolvimento, pois processos de “regulação da transcrição pós-transcricional por RNA”, aparece entre os genes diferencialmente expressos em 0-1 h.

De forma geral, os processos biológicos em que os genes diferencialmente expressos estão envolvidos no início da embriogênese são coerentes com a fase do

desenvolvimento embrionário. Mas não podemos deixar de destacar a presença de processos como “formação de gameta”, “ovôgenese” em genes expressos em embriões de 18-24 h (Tabela 3), coincidentes com os expressos nos ovários, durante a ovogênese. Conjuntos de genes expressos em fases específicas do desenvolvimento, naturalmente silenciados neste processo, voltam a se expressar outras vezes, em situações semelhantes (Arbeitman 2002). Assim, podemos encontrar genes ou conjunto de genes expressos nas células do ovário e que voltam a ser expressos em embriões em blastoderme, ainda que a função não esteja clara. Por exemplo, genes ligados a processos de apoptose também são frequente durante o desenvolvimento, uma vez que os genes envolvidos no ciclo celular também estão envolvidos neste processo, mesmo que a apoptose propriamente dita não aconteça durante esta fase (Alberts 2008). Além disso, “segmentação”, “morfogênese” e “final do desenvolvimento embrionário”, são processos que também apareceram dentre os genes diferencialmente expressos de 0-6 h e 18-24 h, justificando que durante a embriogênese, a expressão gênica é bem dinâmica (Arbeitman 2002).

O fato é que os genes especialmente escolhidos como principais candidatos a ativação do ovo e a transição materno-zigótica, juntamente com os outros genes diferencialmente expressos entre os dois tipos de embriões de *A. mellifera*, nos permite concluir que a regulação da embriogênese dos dois tipos de organismos gerados nesta espécie, parece ser principalmente temporal, pois a maioria dos genes expressos é igual nos dois. Não havendo, portanto, um sistema de desenvolvimento específico para cada tipo de embrião. As diferenças podem estar ligadas à expressão e processamento de genes ligados determinação do sexo, que se dá principalmente por *splicing* diferencial de genes do topo da cascata deste processo (Gempe *et al.* 2009), processo não analisado neste trabalho. No entanto, foram detectados genes que diferem quanto a sua expressão

e ligados a processos conservados. A diferença essencial entre a ativação do ovo e transição materno-zigótica de haploides e diploides, portanto, deve estar na regulação dessas moléculas conservadas.

5.2. Rede de regulação gênica miRNA:mRNA (Questão 3)

Os miRNAs são reguladores importantes em vários processos da embriogênese de vários organismos (Giraldez *et al.* 2006; Bartel 2007; Bushati & Cohen 2007; Bushati *et al.* 2008a; Zondag *et al.* 2012). As redes de regulação exclusivas de cada tipo de embrião e compartilhada entre os mesmos, representa um modelo de regulação por miRNAs construída a partir de dados de expressão gênica (Figuras 9-A, 10-A e 11-A). Elas respondem a questão 3 mostrando que os miRNAs regulam, de forma diferente o início da embriões haploides e diploides de *A. mellifera*. O perfil de regulação diferencial entre os dois tipos de embrião, se mantem quando observamos as sub-redes, formadas por genes-alvos dos miRNAs *ame-mir-34-5p*, *ame-mir-375-3p*, *ame-mir-263b-5p*, *ame-mir-184-5p*, *ame-mir-9a-3p* (Figuras 9-B, 10-B e 11-B).

Ao apresentar este trabalho pretendemos contribuir com o conhecimento dos passos iniciais do desenvolvimento embrionário de *Apis mellifera*, usando para isto as vantagens oferecidas pelo próprio modelo, o processo da determinação do sexo, haplodiploide, que disponibiliza embriões haploides e diploides, que ao desenvolverem darão origem aos machos e às fêmeas respectivamente. Para atingir este objetivo construímos e analisamos 16 bibliotecas de última geração a partir do RNA dos dois tipos de embriões em diferentes fases do desenvolvimento e ovócitos maduros, que funcionaram como tempo zero de desenvolvimento. A reconstrução das redes de regulação a partir dos ortólogos identificados em cada uma sete bibliotecas de mRNAs e

interação com os microRNAs identificados em cada uma das sete bibliotecas mostrou que o desenvolvimento embrionário é conservado nos dois tipos de embriões de abelhas e que a regulação dos passos iniciais do desenvolvimento pode ser feita pelos mesmos miRNAs no entanto sobre genes diferentes. Transcrição (*cdk8*-embriões haploides, *Hey* – embriões diploides) metabolismo de nucleotídeos (*ATPalpha*-embriões haploides, *Gye89Da* – embriões diploides) e formação de gameta (*jing*-embriões haploides, *Axn* – embriões diploides) estão entre os processos biológicos aos quais os genes dos dois tipos de organismos estão ligados. Porém estes genes são regulados pelo mesmo miRNA, *ame-mir-375-3p*.

A rede de regulação exclusiva de embriões diploides tem uma topologia mais complexa que a de embriões haploides (Figuras 9 e 10), provavelmente devido a quantidade maior de genes regulados por miRNAs (Tabela 6; Anexo 3).

O fato curioso é que a rede regulação compartilhada pelos dois tipos de embriões é a menos complexa das três (Figura 11, Tabela 4). Lembrando que a maioria dos genes expressos até 24 h de desenvolvimento de embriogênese são os mesmos nos dois tipos de embriões (questão 1 e 2), podemos concluir que a regulação por miRNAs é mais específica. Esta especificidade se dá pelos diferentes alvos que estes miRNAs regulam nos diferentes tipos de embriões. Observando as sub-redes enriquecidas por alvos dos miRNAs *ame-mir-34-5p*, *ame-mir-375-3p*, *ame-mir-263b-5p*, *ame-mir-184-5p*, *ame-mir-9a-3p* esta especificidade se mantém, deixando as redes diferentes. Genes regulados por *ame-mir-375-3p*, GB42054/*ATPalpha-PG* e GB55576/*jing-PI*, estão ligados a formação da blastoderme sincicial e celular (Tabela 7), processos que aparecem apenas entre os genes-alvos da rede regulação de embriões haploides. Um mesmo miRNA regulando alvos diferentes é comum no desenvolvimento, como visto por Iovino *et al.* (2009). Estes autores viram que o *mir-184* desempenha diferentes papéis no início da

embriogênese de *Drosophila* influenciando na expressão de genes-alvos importantes na formação da blastoderme, nos estágio 1-2 e 3. Esta especificidade também aparece quando geramos as sub-redes enriquecidas com os alvos específicos dos 5 miRNAs em questão (Figuras 9-B, 10-B e 11-B), pois o *ame-mir-34-5p* não regula genes nas redes de embriões diploides ou compartilhada (Figura 11-B). Isto prova que a especificidade de regulação do mRNA por miRNA depende não só do sítio de pareamento com a 3'UTR do alvo (Bartel 2007; Bushati & Cohen 2007), mas também com expressão dos dois (Bushati *et al.* 2008b; Cifuentes *et al.* 2010; Giraldez 2010; Guo *et al.* 2010; Somel *et al.* 2010) (Bethune *et al.* 2012). Sendo os perfis de expressões de miRNA e mRNA antagônicas, podemos dizer que as redes preditas são dinâmicas, pois a mudança de expressão de um elemento pode mudar a estrutura da redes.

Apesar disso, os processos biológicos relevantes encontrados para os genes-alvos que compõe cada rede apontam processos relacionados entres as três redes, com aqueles ligados a ativação do ovo (“transporte de íons” e “divisão celular”) e aqueles ligados ao controle da transcrição (“silenciamento gênico” e “modificação de histonas”). Desta forma, por mais que os genes não sejam os mesmo nas diferentes redes, os processos biológicos estão relacionados, um sinal de que os diferentes tipos de embriões passam pelos mesmos processos de desenvolvimento (Cruz-Landim 2009), mas regulados, muitas vezes, pelos mesmos miRNAs.

Observamos também que muitos genes-alvos das três redes estão envolvidos na “formação de gametas”. Estes genes podem fazer parte da linhagem de células que são formadas durante a migração dos núcleos – antes da blastoderme – mergulham no citoplasma das células polares e esperam a formação das gonadas (mesoderme) para migrarem para lá (Campos-Ortega & Hastenstein 1997).

Ame-mir-375-3p é altamente expresso no início da embriogênese de *A. mellifera*, sendo mais expresso em embriões diploides e em ovócitos maduros (Figura 16A e B). Mas o *ame-mir-375* está expresso durante toda a embriogênese, como é possível observar nas hibridações *in situ* de (Figura 12). Mas, apenas o braço 3p deste miRNA apresenta 38 genes-alvos que formam a rede de embriões diploides, 34 na rede de haploides e 4 genes-alvos na rede compartilhada pelos dois tipos de embriões (Figuras 9, 10 e 11, respectivamente). O *ame-mir-375-5p* provavelmente foi de certa forma degradado e não tem função nesta fase de desenvolvimento de abelhas, pois não foi encontrado no ovócito maduro nem em embriões. O *ame-mir-375-3p* tem um ligeiro aumento na sua expressão em embriões diploides de 0-2 h em relação a biblioteca de ovócitos maduros (Figura 16 A e B).

Como dito, na Figura 12-A e B podemos observar a localização do *pri-ame-mir-375* nos núcleos de células foliculares, que revestem os ovócitos maduros e são eliminadas logo antes da passagem do ovócito pelo oviduto (Cruz-landim, 2009). Estes miRNAs então são transcritos dentro das células foliculares e o *pré-ame-mir-375* são transportados para o citoplasma dessas células e nelas processados em miRNA maduros. Ou ainda os precursores podem ser enviados diretamente aos ovócitos. Se realmente ocorre, este transporte deve acontecer antes da formação do córion do ovócito, durante a fase de vitelogênese, pois o córion é depositado de maneira contínua abaixo da camada de células foliculares, impedindo portanto qualquer transferência de substância entre essas células e o ovócito.

O processamento deste *pré-miRNA* poderia acontecer tanto nas células foliculares, quanto no ovócito e consequentemente no embrião de poucas horas de desenvolvimento, já que os genes da biogênese estão expressos nos ovócitos e embriões haploides e diploides de até 24 h de desenvolvimento (Figura 25).

O depósito de miRNA produzido nas células foliculares (Figura 12 A e B), está uniformemente depositados ao longo do embrião, pois a marcação de *ame-mir-375-3p* em 2 h de embriões diploides e haploide não foi específica em um dos polos do embrião (Figura 12 C e L).

Levantando à hipótese de que está ocorrendo também o depósito do pre-*ame-mir-375* no ovócito, o seu processamento possivelmente ocorre até 2 h de desenvolvimento na região anterior, onde podemos observar a marcação dos três núcleos visíveis, caracterizando as primeiras divisões do zigoto (Figura 12 C, D e E). A questão é: Será que este miRNA está sendo expresso já nas primeiras horas do desenvolvimento?

A presença deste miRNA nas primeiras horas do desenvolvimento também é justificada pela presença de genes-alvos ligados a ativação do ovo, como GB45722/*cdk8* (Horner & Wolfner 2008) nos embriões haploides, GB50305/*CG6672* na rede de embriões diploides, que está ligado ao transporte de íons (Tabela 8). Além das marcações de núcleos em 2 h, podemos observar estas marcações em embriões de 6 h de desenvolvimento (Figuras 12-F e G), quando a clivagem já foi iniciada e os núcleos já migraram para o centro do embrião. Nesta fase os núcleos estão em constante divisão mitótica, sem divisão de membrana (Nelson 1915), por isso não podemos afirmar que o que foi marcado foi o *pri-ame-mir-375* ou o *ame-mir-375-3p* ou os dois. Genes que regulam a transcrição, como GB44649/*Sfmbt* (embriões haploides), GB51105/*Hey* (embriões diploides) e GB49172/*E(bx)* (ambos embriões) são alvos do *ame-mir-375-3p*, portanto a localização deste miRNA ao redor núcleos também pode significar a co-localização com seu alvo. Este tipo de marcação também foi observada para *ame-mir-34* e *ame-mir-263b* (Figuras 13-E, F, G e 14-D, E, F, G, H, respectivamente).

Apesar de processos biológicos para formação da blastoderme aparecerem apenas entre os genes-alvos de *ame-mir-375-3p* da rede de regulação de embriões haploides (Tabela 7), este processo acontece em todos os embriões. Considerando isso e que este miRNA é pouco expressos em 18-24 h de desenvolvimento (Figura 16 A e B), podemos dizer que o *pri-ame-mir-375* está sendo expresso nesta fase, pois é possível observar a marcação destes dentro dos núcleos da blastoderme (Figura 12 H e I). Ou ainda, que os genes necessários para este processo estejam regulados por outro miRNA, não identificado em nossas bibliotecas.

A Figura 12-J mostra a coloração do *ame-mir-375* no período de 32-38 h de desenvolvimento embrionário. Nesta hora do desenvolvimento o embrião está terminando a gastrulação (Nelson 1915; Campos-Ortega & Hastenstein 1997). Uma estrutura aparece com uma coloração mais forte (seta Figura 12-J), indicando onde há maior concentração do *ame-mir-375*. Esta estrutura, identificadas pela posição e morfologia, corresponde ao estomodeo (Campos-Ortega & Hastenstein 1997), localizada ventralmente, perto do polo anterior do embrião, onde vai se desenvolver o intestino anterior. A marcação do *ame-mir-375* não está específica em apenas uma estrutura do embrião com mais de 42 h de desenvolvimento (Figura 13-K), onde a marcação é mais forte na região anterior e está presente na região de formação de peças bucais (seta Figura 12-K) e na região posterior (marcado* em Figura 12-K). GB42756/*Dab*, GB47277/*Axn* são alvos preditos desse miRNA e estão envolvidos em processos da embriogênese de *A. mellifera*, atuando na via de sinalização Wg (wingless), sendo responsável pelo estabelecimento da segmentação no final do desenvolvimento embrionário dessa abelha (Dearden *et al.* 2006b). Desta forma, podemos sugerir que o *ame-mir-375* regula indiretamente a segmentação via de sinalização Wg, sendo responsável pela regulação de genes localizados nas

extremidades do embrião, já que ele se mostra mais expresso nestas regiões (Figura 12-K).

Em *Aedes aegypti* o *mir-375* está envolvido na regulação de genes do sistema imune característico de insetos que se alimentam de sangue (Hussain *et al.* 2013). Em abelhas o *mir-375* foi identificado por Chen *et al.* (2010) em *A. mellifera*, quando analisou uma biblioteca de pequenos RNAs, de um *pool* de várias fases do desenvolvimento desta abelha (embrião, larva, pupa e adultos). No miRBase este miRNA já foi anotado para 103 espécies. Mas sua função é melhor conhecida em mamíferos, com atuação na regulação da proliferação celular *in vitro* e na sua *down-regulação* durante o câncer pancreático (Zhou *et al.* 2012). Este trabalho é o primeiro trabalho que tenta encontrar uma função para este miRNA no desenvolvimento de abelhas, além de caracterizar sua expressão com a localização durante todo o desenvolvimento embrionário.

Já as marcações por hibridação *in situ* do *ame-mir-34* (Figuras 13) foi compatível com a sua expressão, dada em RPKM, no início da embriogênese (Figura 13-C e D), pois tanto o braço 3p quanto o 5p deste miRNA estão expressos no início da embriogênese, mas apenas o *ame-mir-34-5p* apresenta genes-alvos preditos.

Em *D. melanogaster* e *Danio rerio* o *mir-34* é maternalmente herdado (Soni *et al.* 2013) e nossos dados parecem mostrar que em *A. mellifera* isso também acontece, uma vez que ele é altamente expresso em ovócito maduro (Figura 16-C e D). Na hibridação *in situ* não foi possível observar com clareza a marcação do *pri-ame-mir-34* nas células foliculares dos ovócitos maduros (Figura 13), como observado para o *pri-ame-mir-375* (Figura 12-A e B) e para o *dml-mir-34* (Soni *et al.* 2013). Mas observamos que em uma célula folicular o *pri-ame-mir-34*, parece estar presente (Figura 13 A, B e C). No protocolo usando para a hibridação *in situ* (Osborne & Dearden 2005a; Zondag

et al. 2012), o embrião é dissecado para retirada do córion e membrana vitelínica (item 3.6.4). Como os ovócitos foram coletados dentro do ovário da rainha eles ainda estavam recobertos pelas células foliculares, mas quando foram dissecados esta camada de células, ou pelo menos parte dela, foi retirada junto com o córion. Este pode ter sido um motivo pelo qual não conseguimos uma marcação perfeita do pri-*ame-mir-34* no núcleo dessas células. Mas não podemos descartar a hipótese de que o *ame-mir-34* pode estar sendo produzido por estas células em *A. mellifera*.

Soni *et al.* (2013) usando ferramentas bioinformática localizou dentre um conjunto de transcritos zigóticos, do início da embriogênese de *Drosophila*, alvos para o *mir-34*, caracterizando experimentalmente a origem materna deste miRNA. Nossos resultados mostram que o *ame-mir-34* materno age no início da embriogênese, pois observamos sua alta expressão também em embriões de até 24 h de desenvolvimento, além da presença dele em ovócitos maduros (Figura 16-C e D). Como já dito, a maquinaria de biogênese de miRNA está presente nos ovócitos maduros e em embriões de até 24 h de desenvolvimento (Figura 25), portanto, tanto o *ame-mir-34-3p* ou 5p, quanto seu precursor (pré-*ame-mir-34*) podem ter origem materna.

O *ame-mir-34* possui genes-alvos apenas entre os embriões haploides (Figuras 9, 10 e 11). Mas como dissemos, estas redes são dinâmicas, pois consideramos o perfil de expressão, além do sítio de pareamento para determinar as redes. No entanto, este miRNA está expresso em embriões diploides (Figura 16-C) tanto que as a maioria das hibridações *in situ* foram feitas em embriões diploides. De qualquer forma, ao observar os perfis de expressão dos alvos deste miRNA (Figura 16-D) e o envolvimento destes genes na ativação do ovo (GB53251/*psidin*) (Krauchunas *et al.* 2012) e na regulação da transição (GB55367/*Rtfl* –Tabela 7), além da marcação do pri-*ame-mir-34* nos núcleos

de embriões em clivagem e blastoderme (Figura 13-E a 13-I), podemos sugerir que esteja ocorrendo alguma transcrição já em 6 h de desenvolvimento.

A hibridação *in situ* em embriões haploide de 2 h de desenvolvimento mostra uma coloração mais forte na região anterior do embrião (Figura 13-M). Em embriões diploides da mesma idade a coloração é mais acentuada, por todo o embrião. Não podemos afirmar que isso se deve a diferença de expressão deste miRNA entre os dois tipos de embriões, pois este ensaio é qualitativo, não quantitativo. Mas a expressão, por RPKM, deste miRNA mostra que essa diferença existe (Figuras 16 C e D).

O miR-34 é um miRNA conservados entre moscas, *C. elegans*, humanos e camundongos (Sempere *et al.* 2003; Courteau *et al.* 2012; Liu *et al.* 2012c). Além disso, Wang *et al.* (2009) o identificaram como um regulador de doenças neurodegenerativas com alvos que agem durante sinapses, assim como em *Drosophila* onde o *miR-34* se envolve na regulação da neurodegeneração e idade (Liu *et al.* 2012b). As marcações do *ame-mir-34* por hibridação *in situ* em embriões de 24 h a 72 h de desenvolvimento, evidenciam a expressão deste miRNA em células precursoras do sistema nervoso, como na ectoderme, que dá origem ao sistema nervoso, córtex dorsal e comissuras (Figuras 13-K e L), sugerindo que este miRNA pode estar envolvido na regulação da formação do sistema nervoso em *A. mellifera*, assim como encontrado em camundongos, onde o *miR-34a* regula a diferenciação neuronal (Agostini *et al.* 2011).

A marcação do *ame-mir-263b* em ovócitos maduros não ficou nítida para a afirmarmos que o *pri-ame-mir-263b* nos núcleos das células foliculares (Figura 14-A, B e C). De qualquer forma, a marcação dele durante os estágios de desenvolvimento está compatível com sua expressão, detectada por RNAseq (Figura 16-E e F) inclusive em ovócito maduro, indicando uma possível origem materna.

A expressão deste miRNA em 6 h de desenvolvimento de embriogênese de abelhas (haploide e diploide), aponta o núcleo em nossas reações (Figura 16 D-H). Nas Figuras 16 G e H, o embrião está em estágio de clivagem onde os núcleos já migraram para o interior do embrião e estão se dividindo rapidamente, sem a divisão citoplasmática (Nelson 1915). Não se sabe se nesta fase existe algum tipo de transcrição ocorrendo em abelhas. Em outros insetos, por exemplo, em *Drosophila*, sabe-se que as primeiras transcrições zigóticas ocorrem em duas ondas, sendo a primeira no 8º ciclo mitótico (Nien *et al.* 2011; Sung *et al.* 2013), com uma pequena pausa nas divisões para que isso ocorra (Pilot 2006; Sung *et al.* 2013), já os ciclos de divisões da clivagem são rápidos para que esteja ocorrendo algum tipo de transcrição. Mas há evidência que transcrições nesta fase podem acontecer e que os genes transcritos apresentem poucos ou nenhum íntrons, justamente por causa dessas divisões rápidas (Mcknight & Miller 1976; Shermoen & Ofarrell 1991; Rothe *et al.* 1992; Biedler *et al.* 2012).

Ame-mir-263b parece estar presentes dentro dos núcleos de embriões de 0-2 h, 0-6 h e 24 h de desenvolvimento e em fases mais avançadas da embriogênese de *A. mellifera* (Figura 14). *Mir-263a/b* são miRNAs conservados entre vários animais e são componentes de órgão sensoriais periféricos (Hilgers *et al.* 2010), sendo que em *Drosophila* atua na apoptose e regulação de células mecanorreceptoras. Em *B. mori*, foi identificado junto com outros miRNAs em vários tecidos e durante a metamorfose (Cao *et al.* 2008). Nosso trabalho mostra que *ame-mir-263b* é um importante regulador, de forma diferente em machos e fêmeas (Figuras 9 e 10), de importante genes da embriogênese de *A. mellifera*, *par-1*/GB55293, descrito por Dearden *et al.* (2006a), além de genes ligados a ativação do ovo (*lili*/GB55387) (Krauchunas *et al.* 2012). Além disso, o *pri-ame-mir-263b* dentro dos núcleos em clivagem parece evidenciar a expressão zigótica neste período (Figuras 14 D-H).

Pri-ame-mir-184 e *pri-ame-mir-9a* foram marcados por hibridação *in situ* por Zondag *et al.* (2012) (Figuras 15), em embriões nos estágios 5, 6 e 9, respectivamente. Nos estágios 5 e 6 o embrião está em blastoderme, sendo que o estágio 5, que corresponde a embriões de 24 h (DuPraw 1967) e o *ame-mir-184* está marcado. Na Figura 16-G podemos observar que o braço 5p deste miRNA está expresso e na rede de regulação de embriões haploide regula *lola*/GB53462 um gene que está relacionado a formação da blastoderme (Tabela 7). *Sox102F*/GB41464, ligado a regulação da transcrição, é outro alvo de *ame-mir-184-5p*, mas em embriões diploides. *Mir-184* está presente em muitos processos da embriogênese de *Drosophila* (Iovino *et al.* 2009) e é um miRNA importante em *A. mellifera* também e específico para cada tipo de embrião, pois este miRNA não compartilha alvos entre haploides e diploides até 24 h de desenvolvimento (Figura 11). Já o *mir-9a* foi detectado (RNAseq) e marcado (hibridação *in situ*) por Zondag *et al.* (2012) nos estágio 6 e 9, destacando no estágio 6 as aparentes faixas de expressão (Figura 15-B) e no estágio 9 os peças bucais na região anterior ventral do embrião (Figura 15-C). Nós não temos a expressão no estágio correspondente ao 6, que seria de 30 h de desenvolvimento (DuPraw 1967). Mas a expressão de *ame-mir-9a-3p* em embriões haploides e diploides é alta e possui perfil parecido (Figura 16-H), sendo que o braço 5p deste miRNA não regula genes em embriões de até 24 h de desenvolvimento. Este fato mostra coerência com os dados de Zondag *et al.* (2012), onde este miRNA é um dos mais expressos em bibliotecas de pequenos RNAs de embriões de *A. mellifera* de 24-30 h. *PSR*/GB46775 é um gene ligado a processos da divisão celular (Tabela 9), o qual este miRNA regula em ambos os tipos de embriões, coerente com a fase do desenvolvimento onde divisões celulares são constantes até 24 h da embriogênese de *A. mellifera* (Nelson 1915; Cruz-Landim 2009). Além desse alvo, a *ame-mir-9a-3p* regula genes envolvidos na apoptose

(*Atg5*/GB49139) em embriões diploides, processo que este miRNA regula durante o desenvolvimento de asas de *Drosophila* (Bejarano *et al.* 2010).

Os cinco miRNAs enriquecem as redes com seus alvos preditos apontam, no geral, uma regulação conservada entre os processos biológicos, mas de maneira específica em cada tipo de embrião pela diferença nos genes-alvos. Isto só reforça a ideia de que os processos de ativação do ovo e de transição materno-zigótica se diferenciam entre embriões haploides e diploides pela regulação. Além disso, as hibridações *in situ* de *ame-mir-375*, *ame-mir-34* e *ame-mir-263b*, parecem evidenciar transcrições zigóticas já durante a clivagem.

5.3. Transição materno-zigótica (Questões 4 e 5)

A classificação de genes segundo a origem foi feita baseada na expressão encontrada em cada embrião. Este tipo de classificação foi usado por De Renzis *et al.* (2007); Benoit *et al.* (2009); Siddiqui *et al.* (2012) e seria uma forma de conhecer os genes e miRNAs maternos e zigóticos, definindo melhor que tipo de regulação está acontecendo e se o genoma zigótico está ativo em até 24 h do desenvolvimento de *A. mellifera*. Neste organismo é a primeira vez que se faz um estudo parecido. Além disso, esta seria uma forma de analisar a conservação do processo de transição materno-zigótica e comparar com nossos modelos, *Drosophila*, onde estão envolvidos proteínas e mRNA maternos e miRNAs zigóticos (Figura 1) (Benoit *et al.* 2009). E se moléculas como Zelda e smaug estão atuantes na regulação deste processo também em *A. mellifera*.

Tanto miRNA e genes maternos estão em maior número na classe I, ou seja, expressos apenas em ovócitos maduros. Os processos biológicos aos quais os genes dessa classe de maternos estão ligados são, em sua maioria, processos pós-embrionários. Como já dissemos estes genes por estarem expressos apenas em ovócito

podem ter sido transportados para os ovócitos com outras funções ainda não descritas. De qualquer forma, regulação da expressão gênica (*HLH4C/GB49291*) e via de sinalização de Wnt (*Wnt2/GB47005*) são processos conservados e são coerentes a sua presença em ovócito (Zheng *et al.* 2006). Os genes maternos de classe II apresentaram ortólogos apenas entre os genes expressos em embriões diploides (Tabela 10), mas não foi encontrado processos biológicos relacionados a estes genes.

A classe II, genes classificados como zigóticos, apresenta um menor número de genes (Tabela 12). Mas, por outro lado, entre o total de genes expressos em todas as bibliotecas, a maioria foi classificada como zigótico. Este fato reflete nos processos biológicos encontrados para cada tipo de classe e cada tipo de embrião, pois os processos biológicos que estes genes estão envolvidos, em sua maioria, com a fase de desenvolvimento embrionário analisada. Como por exemplo, transcrição e ciclo celular, processos que genes da classe I estão envolvidos. Classe II de genes zigóticos envolvidos na modificação de cromatina e nucleossomos, ligação de proteínas ao DNA, regulação da transcrição e ciclo celular. E genes de classe III estão ligados a processos de regionalização, formação de sincício, formação do eixo dorso-ventral e determinação sexo, além de regulação da transcrição, são processos de acordo com a expressão dos genes dessas classe, que são expressos em ovócitos, mas desaparecem durante a fase de clivagem (0-2 h e 0-6 h) e voltam a ser expressos em 18-24 h, quando a blastoderme está sendo formada (Nelson 1915).

Estes processos biológicos correlacionam com nossa classificação e portanto, dá robustez a ela. Desta forma, a origem da regulação pode ser melhor sugerida quando enriquecemos as redes de regulação geradas para resposta da questão 3 com genes maternos e zigóticos, destacando qual a origem dos miRNAs que regulam os genes maternos e os zigóticos (Figuras 21, 22, 23 e 24).

Na rede enriquecida com genes maternos observamos que estes genes são regulados principalmente por miRNA classificados como zigóticos, tendo sido encontrado apenas um materno (Figura 21). Em *Drosophila*, o cluster *mir-309* regula a transcrição de genes zigóticos (Benoit *et al.* 2009), degradando os mRNA maternos, durante a transição materno-zigótica. Ainda não foi descrito ortólogos deste cluster em *A. mellifera*, mas os miRNAs que regulam os genes maternos, em embriões zigóticos podem estar fazendo o papel de *mir-309* na degradação dos genes maternos. Como por exemplo, *ame-mir-305* e *ame-mir-275*, que estão expressos no mesmo grupo genômico (Grupo 4.22 – genoma 4.0; dados retirados do miRbase 19) e regulam um mesmo gene (*broad* – *br/GB48272* – Figura 21).

O fato curioso é que *br/GB48272* é classificado como gene zigótico de classe III em embriões haploides, sendo um gene candidato a ser regulado por Zelda (Figura 34) como em *Drosophila* (ten Bosch *et al.* 2006). *br/GB48272* apresenta em sua região promotora um motivo (Figura 33) com alta probabilidade de ser do grupo TAGteam em *A. mellifera*, ao qual o fator de transcrição Zelda se liga e atua na sua transcrição, em *Drosophila* (ten Bosch *et al.* 2006). Este gene está ligado a determinação do sexo (ten Bosch *et al.* 2006) e com os nossos dados sugerimos que ele seja degradado antes de 0-2 h do desenvolvimento, coerente com expressão de genes de determinação do sexo (Campos-Ortega & Hastenstein 1997) pelos miRNAs *ame-mir-305-5p* e *ame-mir-275-5p*, em embriões diploides, mas é transcrito pela maquinaria zigótica apenas em embriões haploides em 18-24 h, regulados por Zelda, por ligação ao motivo NNRCCN e auxiliados pelo *ame-mir-3786-5p* (Figura 35). Possivelmente *br/GB48272* tem um papel importante na determinação do sexo também em abelhas (Figura 36).

Figura 36: Ação de miRNAs zigóticos no controle de *Broad/GB48272* materno em embriões diploides e de *zelda/GB52047* no mesmo gene classificado com zigótico em embriões haploides. *Broad/GB48272* é um gene ligado a determinação do sexo e sua regulação provavelmente é diferente entre os dois tipos de embriões de *A. mellifera* de até 24 h de desenvolvimento.

A expressão do cluster *mir-309* em *Drosophila* é influenciada por *Smaug* (Figura 1) (Benoit *et al.* 2009). Nós identificamos genes ortólogos de *Drosophila*, regulados de duas maneiras por *smaug*, entre as nossas bibliotecas e foram definidos dois conjuntos de genes de acordo com Siddiqui *et al.* (2012) (Figura 28; Anexo 4). Os genes dos dois conjuntos foram localizados nas redes construídas na tentativa de responder a questão 3 e sub-redes enriquecidas esses genes (Figura 29). Podemos observar que *ame-mir-6039-5p* (conjunto 1) e *ame-mir-3747a-3p* (conjunto 2) regulam genes regulados por *smaug* dentre os genes localizados na rede de diploides, (Figura 29). Este fato reforça a ideia que os miRNA zigóticos estão envolvidos na transição materno-zigótica, atuando na degradação dos maternos. *Ame-mir-6039-5p* e *ame-mir-3747a-3p* são dois importantes reguladores que são candidatos a atuação nesse processo (Figura 37).

Dezessete genes zigóticos expressos em embriões haploides são regulados por miRNAs (Figura 22), sendo a maioria dos reguladores (11 miRNAs) classificados como zigóticos. Isto porque os miRNAs maternos podem estar sendo degradados já em 0-2 h e 0-6 h (Figura 18), diminuindo o repertório de reguladores no início da embriogênese de haploides. O gene *fs(1)N-PA/GB42892* é um gene zigótico nos embriões haploides que também está entre os genes do conjunto 1 regulados por *smaug* (Figura 28) e está

mesmo miRNA na rede haploide (Figura 22) pode ser zigótico e na rede diploide (Figura 23) pode ser materno, ou não definido, como o *ame-mir-932-5p*.

A diversidade de genes-alvos que um miRNA pode ter depende de onde e quando ele está sendo expresso, pois sabe-se que os miRNAs podem ter sítios de regulação em vários genes e até mesmo num mesmo gene (Bartel 2009). Um exemplo clássico desse tipo de ação é o *mir-430* em *zebrafish*, ele age de forma diferente nas células somáticas e germinativas (Mishima *et al.* 2006). O fato é a co-expressão dos dois, alvo e miRNA, em determinado período da vida do organismo ou tecido, no qual o gene-alvo seja essencial, juntamente com a presença do sítio de ligação entre os dois (Bartel 2009), torna a nossa predição mais robusta. A diminuição de expressão do mRNA pelo miRNA, considerando um perfil antagônico entre os pares de regulação, seria outro fato que torna o par de regulação predito robusto, uma vez que a diminuição do mRNA alvo pelo miRNA ocorre logo após a diminuição da sua tradução (Giraldez *et al.* 2006; Mishima *et al.* 2006; Bethune *et al.* 2012). Aqui nós sugerimos modelos de regulação e sua respectiva origem de regulação no início da embriogênese de *A. mellifera* (Figura 21, 22, 23 e 24), mostrando as diferenças e semelhanças existentes entre embriões haploides e diploides de até 24 h de desenvolvimento, e portanto respondendo a questão 4.

Mesmo que estas diferenças se destaquem quanto a origem de regulação, os processos biológicos aos quais estes genes estão envolvidos, tanto haploides quanto diploides, são em sua maioria os mesmos, sugerindo que a função das regulações diferenciais existem para manter um desenvolvimento robusto para a formação de organismos adultos que se diferenciam na ploidia e, no caso, no sexo. Além disso, a regulação é conservada não só quanto os mesmos miRNAs, mas também nos ortólogos

de *Drosophila* com as mesmas funções e reguladores desses genes como Smaug e Zelda.

A reconstrução das redes de regulação indicaram que genes codificadores de fatores de transcrição como *lola* e *TfIIalpha*, e proteínas de ligação ao DNA, *amos*, também estão presentes em fase iniciais do desenvolvimento, possuem ortólogos em *Drosophila*, sugerindo que desempenham a mesma função em *A. mellifera*. A presença de proteínas e fatores de transcrição nos núcleos ou em sua periferia é característico desse tipo de molécula (Nien *et al.* 2011). *zelda*, um fator de transcrição em *Drosophila*, mostrou ter este tipo de localização também em *A. mellifera* (Figura 32), sugerindo que a sua função em abelhas também deve estar relacionada a transcrição.

Zelda (vielfaltig -*vlf*) em *Drosophila* é um transcrito materno que é degradado no início da embriogênese, durante a celularização ele é produzido por maquinaria zigótica (Liang *et al.* 2008). Neste inseto, foi detectada a proteína Zelda entre a 1-2 h de desenvolvimento embrionário, quando o genoma zigótico está sendo ativado, entre o 9º e 13º ciclo de clivagem (Figura 30) mostrando ainda que ela é um proteína nuclear (Figura 31) (Nien *et al.* 2011). Híbridões *in situ* em embriões de *A. mellifera* (Figura 32) mostram que mRNA *zelda*/GB52047 está presente nos primeiros núcleos de clivagem (0-2 h e 0-6 h) assim como a proteína Zelda em embriões de *Drosophila* na mesma fase (Figura 30) sugerindo que *zelda*/GB52047 pode estar sendo traduzido no embrião. Em embriões haploides de 0-2 h (Figura 32-L) em embriões diploides de 0-6 h (resultados não mostrados), foi possível observar a marcação de uma linha vertical que vai da porção anterior à posterior. Este tipo de marcação pode ser um modo de deposição deste transcrito no embrião pelas células maternas, no ovário. Em *Drosophila* este gene foi detectado em células germinativas dos ovários (Liang *et al.* 2008). Mas, em *A. mellifera* não se sabe onde está sendo transcrito este gene nos ovários.

zelda/GB52047 está expresso nos estágios mais avançados de desenvolvimento embrionário (Figura 32), mostrando uma marcação mais forte nas estruturas formadoras do sistema nervoso central, tais como as comissuras (marcado* em Figuras 32-J e K) e região cefálica do embrião de 68-72 h (Figura 32-k). A função de Zelda na formação do sistema nervoso central e no traqueal foram demonstrados por Pearson *et al.* (2012), onde os genes regulados por Zelda e envolvidos nessas funções apresentam em seu promotor o TAGteam, como presente nos genes expressos logo antes da blastoderme celular em *Drosophila* (ten Bosch *et al.* 2006).

O fator de transcrição Zelda ativa os genes zigóticos durante a transição materno-zigótico, ligando a uma classe motivos TAGteam (ten Bosch *et al.* 2006; Liang *et al.* 2008) ativando genes ligados principalmente à celularização, determinação do sexo e formação do eixo dorso-ventral (ten Bosch *et al.* 2006; Liang *et al.* 2008). Aqui nós encontramos um motivo conservado entre os genes zigóticos de classe III, expressos em embriões haploides (Figura 33). Este motivo foi escolhido pois ele apresentou o melhor *e-value* quando alinhado com PWM (matrizes de peso de posição) de outros motivos TAGteam (Tabela 22) em relação ao outros motivos encontrados para outras classes de genes (Tabela 22). Dentre os genes que apresentam o motivo NNTCCN, candidato à TAGteam, encontramos 5 genes (GB42311/*CG13636*, GB48272/*br*, GB44168/*dpp*, GB46515/*CG10175*, GB52015/*tll*, GB47493/*Dr*, GB55322/*en*) ortólogos de *Drosophila*, que também são regulados por Zelda (ten Bosch *et al.* 2006), candidatos a regulados por Zelda também em *A. mellifera* (Figura 34), não descartando que os outros genes que apresentam este motivo podem estar sendo regulados por Zelda também.

Com a descoberta deste motivo candidato a TAGteam, começamos a responder a questão 5. Se análise fosse baseada apenas na presença de TAGteam em genes

zigóticos, diríamos que o genoma zigótico estaria ativo em 18-24 h. Mas encontramos genes expressos durante 0-2 h e 0-6 h, ou seja, durante a clivagem. Estes genes foram classificados como zigóticos de classe II e eles não possuem íntron, pois se existe transcrição durante a clivagem seu processamento teria que ser rápido (Mcknight & Miller 1976; Shermoen & Ofarrell 1991; Rothe *et al.* 1992; Biedler *et al.* 2012). Shen-Orr *et al.* (2010) mostraram que a maioria dos genes zigóticos expressos no início da embriogênese, em vários organismos, tem a 3'UTR maior. Portanto, sugere-se que sua regulação seja pós-transcricional. Os miRNAs agem ligando-se principalmente na 3'UTR dos genes-alvos (Bartel 2007; Lucas & Raikhel 2013). Desta forma, as nossas análises estão coerentes com os modelos propostos para o início da embriogênese de *A. mellifera*. Mas quando buscamos a origem dessa regulação nos baseamos na expressão de miRNA maduros, dados pelas análises de RNAseq.

Muito cedo no desenvolvimento percebe-se um aumento no número e diversidade de moléculas reguladoras e codificadoras no embriões. Existem genes e miRNAs (classificados como genes e miRNAs zigóticos de classe II) que aumentam sua expressão em 0-2 h e/ou 0-6 h. Isto nos permite afirmar que a ativação do genoma ou a síntese *de novo* pelo embrião não fecundado podem ocorrer muito mais cedo do que se poderia supor. Além disto, há evidências da síntese de miRNAs antes do momento previsto para transição materno-zigótica. A presença de mensageiros codificadores da maquinaria de síntese (G49096/*Drosha*, GB40545/*Pasha*, GB44595/*Dicer-1*, GB48208/*AGO-1*, GB50955/*AGO2* e GB46636/*Nbr*; Figura 25) e a detecção, por hibridação *in situ* dos pri – miRNAs (pri-ame-mir-375, pri-ame-mir-263b e pri-ame-mir-34) nos núcleos de clivagem de embriões de 0-2 h e 0-6 h horas de desenvolvimento (Figura 26), comprovam estes fato.

As hibridações *in situ* feitas para os miRNAs *ame-mir-263b*, *ame-mir-34* e *ame-mir-375* pri-miRNAs para estes miRNAs dentro dos núcleos em clivagem de embriões de *A. mellifera* (Figuras 12, 13 e 14), sugerindo que o genoma zigótico está ativo já durante clivagem, produzindo miRNAs. O protocolo para a hibridação *in situ* usado para miRNA marca principalmente pri-miRNAs, pois a sonda construída traz a sequência do precursor, apesar de nossos resultados também mostrarem que houve marcação do maduro (Figura 12, 13 e 14). Além disso, tanto em embriões haploides como em diploides expressam os genes que codificam a maquinaria da biogênese de miRNAs (Lucas & Raikhel 2013) estão presentes durante as fases de clivagem (Figura 25), sendo que todas estes genes aumentam sua expressão durante as fases de 0-2 h e 0-6 h, sugerindo que o embrião é capaz de processar os precursores do miRNA, caso eles estivessem sendo produzidos.

Para reforçar esta ideia, realizamos uma PCR para avaliar se este pri-miRNA está realmente sendo expresso nas fases de clivagem. Como já dito, o pri-miRNA é o transcrito primário do miRNA que logo após ser transcrito é processado pela Drosha (Figura 2) (Lucas & Raikhel 2013), ainda dentro do núcleo, portanto ele possui cauda poliA. Por isso, nós usamos o protocolo de produção de cDNA que recupera RNA pela cauda poliA (ver materiais e métodos), e este cDNA foi utilizado como *template* do PCR de pri-miRNAs. O resultado indicou a presença de pri-*ame-mir-263b*, pri-*ame-mir-375* e pri-*ame-mir-34* em embriões de 0-2 h e 0-6 h (Figura 26), confirmando a produção de miRNAs pelo zigoto. É bem provável que os miRNAs produzidos durante a clivagem não sejam miRtrons (Ruby *et al.* 2007), miRNAs que estão localizados dentro de íntrons de genes codificadores, pois assim eles dependeriam da transcrição e processamento do gene hospedeiro para ser processado. Como dito, genes expressos nesta fase precisam ter rápido processamento pois, os núcleos estão em constante e

rápidas divisões (Mcknight & Miller 1976; Shermoen & Ofarrell 1991; Rothe *et al.* 1992; Biedler *et al.* 2012). Os miRNAs *ame-mir-263b*, *ame-mir-375* e *ame-mir-34* não são miRtrons, as coordenadas de anotação desses não coincidem com íntrons de genes codificadores (miRbase - Kozomara and Griffiths-Jones (2011),

Lembrando que encontramos *pri-ame-mir-375* dentro dos núcleos das células foliculares que recobrem o ovócito, além da expressão de precursores de miRNAs em ovócitos e durante a clivagem, nos permitiu sugerir um modelo de origem de regulação por miRNA: os miRNAs maternos são produzidos pelas células foliculares, são processados e mandados para os ovócitos em desenvolvimento (pré-miRNA ou miRNAs maduros). Depois da postura do ovo, durante a clivagem os pré-miRNAs herdados seriam processados já nos embriões, pois existe maquinaria para realizar a função e os miRNAs maduros são responsáveis pelas regulações dos próprios RNAm maternos. Enquanto isso o genoma zigótico começa a ser ativado, produzindo miRNAs e genes de rápido processamento, portanto sem íntrons. Os miRNAs zigóticos são responsáveis principalmente pela degradação do mRNA maternos e os genes zigóticos de alguma forma auxilia na transcrição zigótica que aumenta constantemente até pelo menos 24 h de desenvolvimento (Figura 38).

Este modelo proposto é para os dois tipos de embriões, pois parece que a principal diferença entre haploides e diploides está na diferença temporal de genes-alvos de miRNAs. Isto, portanto, modifica as redes de regulação, como mostrado, não o modo de ação ou produção dos reguladores.

Figura 38: Modelo proposto de produção de miRNAs no início da embriogênese de *A. mellifera*. Destaque para a ativação do genoma zigótico durante a clivagem (0-7h), mostrando a produção de três miRNAs (*ame-mir-375*, *ame-mir-34* e *ame-mir-263b*), visualizados nas hibridações *in situ* e análise expressão de seus respectivos precursores (pri-miRNAs) (Os dados referentes aos genes zigóticos de classe II (sem íntrons) classificados de acordo com seu perfil de expressão, não evidenciados no esquema, foram essenciais na elaboração desse modelo).

6. CONCLUSÕES

Contribuição deste trabalho para responder as questões propostas na apresentação de nossos objetivos:

1. Ativação do ovo:

- Processo conservado com *Drosophila*;
- A maioria dos genes ligados à ativação do ovo (Krauchunas *et al.* 2012) se expressam em 0-1 h;
- As maiores diferenças destes processos entre ovos fecundados e não fecundados ocorre em até 1 h do desenvolvimento. Dentre os genes diferencialmente expressos nesta hora, 55 são ligados à ativação do ovo;
- *EDTP/GB46257*, *yl/GB40823* e *mael/GB54808* atuam diferencialmente na ativação do ovo nos dois tipos de embriões;
- As diferenças do processo entre os dois tipos de embriões está na regulação dos genes envolvidos neste processo.

2. Transição materno-zigótica:

- Começa com o início da ativação do genoma zigótico durante a clivagem (0-7 h)
- O genoma produz miRNAs e genes pequenos (não possuem íntrons);
- Genes produzidos durante a clivagem (genes zigóticos de classe II) estão ligados em sua maioria à organização da cromatina, pois os núcleos estão em constante divisão e precisam se reorganizar rapidamente para a replicação e transcrição;
- Os genes que por ventura estão regulados por *Zelda*, em *A. mellifera*, apresentam o motivo NNTCCN (candidatos a TAGteam) e se expressam a partir de 18-24 h;

- Smaug parece estar envolvido na transição materno-zigótica também em *A. mellifera*, ativando genes e miRNAs que abastecem essa transição de genes zigóticos;
 - Os genes zigóticos expressos e embriões diploides regulados por miRNAs estão em maior número que aqueles regulados por miRNAs em embriões haploides, sendo que é possível inferir sobre origem dos miRNAs da expressão dos maduros;
 - A expressão e hibridação *in situ* de 3 miRNAs precursores indicam que a origem dos miRNA podem ser maternas, produzidos pelas células foliculares nos ovários, e zigótica pela produção dos mesmos já durante a clivagem.
3. Diferenças entre embriões haploides e diploides:
- Os genes expressos entre os tipos de embriões se diferenciam em maior número em 0-1 h e 18-24 h, sendo que em 0-1 h de embriões haploides existem mais genes expressos que em diploides. Mas, a maioria dos genes não se diferencia quanto o perfil. Aproximadamente 2100 genes possuem perfis antagônicos;
 - As redes de regulação por miRNAs se mostram diferentes entre os tipos de embriões, sendo aquelas envolvendo genes de embriões diploides mais complexas que as de embriões haploides;
 - Os miRNAs reguladores são em sua maioria os mesmos para os dois tipos de embriões, o que varia são os genes-alvos;
 - Os processos biológicos em que os genes regulados por miRNAs em embriões haploides e diploides estão ligados são basicamente os mesmos, sugerindo que mesmo os genes sendo diferentes, as expressões e regulações diferenciais, tentam estabelecer uma sincronia entre os desenvolvimentos embrionários de haploides e diploides em abelhas;

- As diferenças de regulação entre os dois tipos de embriões são, portanto, dinâmicas. Dependendo do período que se esteja estudando ou analisando, as expressões genicas podem mudar e a rede predita pode ter outra topologia, mas indicam que os elementos reguladores se mantem;
- A análise da regulação diferencial de *Br/GB47272* classificou esse gene como materno em diploides e zigóticos em haploides, indicando que esta regulação pode ser específica para a determinação do sexo, já que este gene é descrito com essa função em *Drosophila*.

Nós trabalhamos principalmente com genes conservados com *Drosophila* e encontramos semelhanças e também diferenças nos processos analisados. Assumimos que o início da embriogênese seja conservado e que os processos também. Uma análise que busca genes exclusivos de *A. mellifera* pode trazer uma resposta específica para o desenvolvimento de organismos diferentes quanto à ploidia. De qualquer forma, as questões levantadas aqui foram respondidas, pelo menos em parte, trazendo esclarecimentos e mais perguntas. Perguntas essas que envolvem principalmente o momento exato da ativação do ovo haploide e se as diferenças na regulação refletem em diferenças morfológicas e na ativação do genoma zigótico, que não havia sido descrita para outros organismos, principalmente pela produção de miRNAs.

Este é o primeiro trabalho sobre transição de ovócito para embrião, incluindo a ativação do ovo e o início da embriogênese, utilizando a análise da expressão gênica de embriões naturalmente haploides, já que muitos trabalhos em *Drosophila* e mamíferos sobre a ativação do ovo os experimentos foram feitos com embriões mutantes não fecundados e ativados, portanto, artificialmente (Krauchunas *et al.* 2012; Cui *et al.* 2013).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrams E. & Mullins M. (2009) Early zebrafish development: it's in the maternal genes. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 396-799.
- Agostini M., Tucci P., Killick R., Candi E., Sayan B.S., Rivetti di Val Cervo P., Nicotera P., McKeon F., Knight R.A., Mak T.W. & Melino G. (2011) Neuronal differentiation by TAp73 is mediated by microRNA-34a regulation of synaptic protein targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 21093-8.
- Alberts B. (2010) Cell Biology: The Endless Frontier. *Molecular Biology of the Cell* **21**, 3785-.
- Alberts B., Wilson J.H. & Hunt T. (2008) *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York.
- Aravin A.A., Lagos-Quintana M., Yalcin A., Zavolan M., Marks D., Snyder B., Gaasterland T., Meyer J. & Tuschl T. (2003) The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* **5**, 337-50.
- Arbeitman M.N. (2002) Gene Expression During the Life Cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science* **297**.
- Barchuk A.R., Cristino A.S., Kucharski R., Costa L.F., Simoes Z.L.P. & Maleszka R. (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *Bmc Developmental Biology* **7**.
- Bartel D.P. (2007) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function (Reprinted from Cell, vol 116, pg 281-297, 2004). *Cell* **131**, 11-29.
- Bartel D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-33.
- Behura S.K. (2007) Insect microRNAs: Structure, function and evolution. *Insect Biochem Mol Biol* **37**, 3-9.
- Bejarano F., Smibert P. & Lai E.C. (2010) miR-9a prevents apoptosis during wing development by repressing *Drosophila* LIM-only. *Dev Biol* **338**, 63-73.
- Benoit B., He C., Zhang F., Votruba S., Tadros W., Westwood J., Smibert C., Lipshitz H. & Theurkauf W. (2009) An essential role for the RNA-binding protein Smaug during the *Drosophila* maternal-to-zygotic transition. *Development (Cambridge, England)* **136**, 923-55.
- Bethune J., Artus-Revel C.G. & Filipowicz W. (2012) Kinetic analysis reveals successive steps leading to miRNA-mediated silencing in mammalian cells. *EMBO Rep*.
- Biedler J.K., Hu W., Tae H. & Tu Z. (2012) Identification of early zygotic genes in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* and discovery of a motif involved in early zygotic genome activation. *PLoS One* **7**, e33933.
- Brennecke J., Hipfner D.R., Stark A., Russell R.B. & Cohen S.M. (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* **113**, 25-36.
- Bushati N. & Cohen S.M. (2007) microRNA Functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **23**.
- Bushati N., Stark A., Brennecke J. & Cohen S. (2008a) Temporal reciprocity of miRNAs and their targets during the maternal-to-zygotic transition in *Drosophila*. *Curr Biol* **18**, 501-7.
- Bushati N., Stark A., Brennecke J. & Cohen S. (2008b) Temporal reciprocity of miRNAs and their targets during the maternal-to-zygotic transition in *Drosophila*. *Curr Biol* **18**, 501-7.
- Campos-Ortega J.A. & Hastenstein V. (1997) *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Springer, Colônia, Alemanha.
- Cao J., Tong C., Wu X., Lv J., Yang Z. & Jin Y. (2008) Identification of conserved microRNAs in *Bombyx mori* (silkworm) and regulation of fibroin L chain production by microRNAs in heterologous system. *Insect Biochem Mol Biol* **38**, 1066-71.
- Carlson J.M., Chakravarty A., DeZiel C.E. & Gross R.H. (2007) SCOPE: a web server for practical de novo motif discovery. *Nucleic Acids Res* **35**, W259-64.
- 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 Molecular Biology* **19**.
- Cifuentes D., Xue H., Taylor D., Patnode H., Mishima Y., Cheloufi S., Ma E., Mane S., Hannon G., Lawson N., Wolfe S. & Giraldez A. (2010) A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science (New York, N.Y.)* **328**, 1694-702.
- Courteau L.A., Storey K.B. & Morin P., Jr. (2012) Differential expression of microRNA species in a freeze tolerant insect, *Eurosta solidaginis*. *Cryobiology* **65**, 210-4.
- Cristino A.S., Nunes F.M., Lobo C.H., Bitondi M.M., Simoes Z.L., da Fontoura Costa L., Lattorff H.M., Moritz R.F., Evans J.D. & Hartfelder K. (2006) Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality. *Insect Molecular Biology* **15**, 703-14.

- Cristino A.S., Tanaka E.D., Rubio M., Piulachs M.D. & Belles X. (2011) Deep sequencing of organ- and stage-specific microRNAs in the evolutionarily basal insect *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *PLoS One* **6**, e19350.
- Cruz-Landim C.d. (2009) *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. Editora UNESP, São Paulo - SP.
- Cui X.S., Shen X.H., Sun S.C., Cho S.W., Heo Y.T., Kang Y.K., Wakayama T. & Kim N.H. (2013) Identifying MicroRNA and mRNA expression profiles in embryonic stem cells derived from parthenogenetic, androgenetic and fertilized blastocysts. *J Genet Genomics* **40**, 189-200.
- De Renzis S., Elemento O., Tavazoie S. & Wieschaus E.F. (2007) Unmasking activation of the zygotic genome using chromosomal deletions in the *Drosophila* embryo. *PLoS Biol* **5**, e117.
- Dearden P., Duncan E. & Wilson M. (2009a) Fixation and storage of honeybee (*Apis mellifera*) tissues. *Cold Spring Harbor Protocols* **2009**.
- Dearden P.K. (2006) Germ cell development in the Honeybee (*Apis mellifera*); vasa and nanos expression. *Bmc Developmental Biology* **6**, 6.
- Dearden P.K., Duncan E.J. & Wilson M.J. (2009b) Whole-Mount In Situ Hybridization of Honeybee (*Apis mellifera*) Tissues. *Cold Spring Harbor Protocols* **2009**.
- Dearden P.K., Wilson M.J., Sablan L., Osborne P.W., Havler M., McNaughton E., Kimura K., Milshina N.V., Hasselmann M., Gempe T., Schioett M., Brown S.J., Elisk C.G., Holland P.W., Kadowaki T. & Beye M. (2006a) Patterns of conservation and change in honey bee developmental genes. *Genome Res* **16**, 1376-84.
- Dearden P.K., Wilson M.J., Sablan L., Osborne P.W., Havler M., McNaughton E., Kimura K., Milshina N.V., Hasselmann M., Gempe T., Schioett M., Brown S.J., Elisk C.G., Holland P.W., Kadowaki T. & Beye M. (2006b) Patterns of conservation and change in honey bee developmental genes. *Genome Res* **16**, 1376-84.
- Dennis G., Sherman B.T., Hosack D.A., Yang J., Gao W., Lane H.C. & Lempicki R.A. (2003) DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol* **4**.
- Dong H., Luo L., Hong S., Siu H., Xiao Y., Jin L., Chen R. & Xiong M. (2010) Integrated analysis of mutations, miRNA and mRNA expression in glioblastoma. *BMC Syst Biol* **4**, 163.
- DuPraw E.J. (1967) The Honeybee embryo. In: *Methods in Developmental Biology* (ed. by Wessells FHWaNK), pp. 183–217. Thomas Y. Cromwell New York.
- Enright A.J., John B., Gaul U., Tuschl T., Sander C. & Marks D.S. (2003) MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* **5**, R1.
- Evans J.D. & Wheeler D.E. (1999) Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5575-80.
- Gempe T., Hasselmann M., Schiott M., Hause G., Otte M. & Beye M. (2009) Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. *PLoS Biol* **7**, e1000222.
- Gilbert S.F. (2010) *Developmental biology*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Giraldez A. (2010) microRNAs, the cell's Nepenthe: clearing the past during the maternal-to-zygotic transition and cellular reprogramming. *Curr Opin Genet Dev* **20**, 369-444.
- Giraldez A.J., Mishima Y., Rihel J., Grocock R.J., Van Dongen S., Inoue K., Enright A.J. & Schier A.F. (2006) Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* **312**, 75-9.
- Grosshans J., Muller H.A. & Wieschaus E. (2003) Control of cleavage cycles in *Drosophila* embryos by *fruhstart*. *Dev Cell* **5**, 285-94.
- Guo H., Ingolia N.T., Weissman J.S. & Bartel D.P. (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835-40.
- Hilgers V., Bushati N. & Cohen S.M. (2010) *Drosophila* microRNAs 263a/b confer robustness during development by protecting nascent sense organs from apoptosis. *PLoS Biol* **8**, e1000396.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **443**, 931-49.
- Horner V. & Wolfner M. (2008) Transitioning from egg to embryo: triggers and mechanisms of egg activation. *Dev Dyn* **237**, 527-71.
- Horner V.L., Czank A., Jang J.K., Singh N., Williams B.C., Puro J., Kubli E., Hanes S.D., McKim K.S., Wolfner M.F. & Goldberg M.L. (2006) The *Drosophila* calcipressin *sarah* is required for several aspects of egg activation. *Curr Biol* **16**, 1441-6.
- Hsiao-Lan L., Chung-Yi N., Hsiao-Yun L., Mark M.M., Nikolai K. & Christine R. (2008) The zinc-finger protein *Zelda* is a key activator of the early zygotic genome in *Drosophila*. *Nature* **456**.
- Huang D.W., Sherman B.T. & Lempicki R.A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* **4**, 44-57.

- Hussain M., Walker T., O'Neill S.L. & Asgari S. (2013) Blood meal induced microRNA regulates development and immune associated genes in the Dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **43**, 146-52.
- Iovino N., Pane A. & Gaul U. (2009) miR-184 has multiple roles in *Drosophila* female germline development. *Dev Cell* **17**, 123-33.
- Jagadeeswaran G., Zheng Y., Sumathipala N., Jiang H., Arrese E., Soulages J., Zhang W. & Sunkar R. (2010) Deep sequencing of small RNA libraries reveals dynamic regulation of conserved and novel microRNAs and microRNA-stars during silkworm development. *BMC Genomics* **11**, 52.
- Kozomara A. & Griffiths-Jones S. (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* **39**, D152-7.
- Krauchunas A.R., Horner V.L. & Wolfner M.F. (2012) Protein phosphorylation changes reveal new candidates in the regulation of egg activation and early embryogenesis in *D. melanogaster*. *Dev Biol* **370**, 125-34.
- Leah V. & Terry L.O.-W. (2007) The *Drosophila* PNG Kinase Complex Regulates the Translation of Cyclin B. *Dev Cell* **12**.
- Leaman D., Chen P.Y., Fak J., Yalcin A., Pearce M., Unnerstall U., Marks D.S., Sander C., Tuschl T. & Gaul U. (2007) Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in *Drosophila* development (Reprinted from *Cell*, vol 121, pg 1097-1108, 2005). *Cell* **131**, 89-101.
- Li H. & Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754-60.
- Li J., Fang Y., Zhang L. & Begna D. (2011) Honeybee (*Apis mellifera ligustica*) drone embryo proteomes. *J Insect Physiol* **57**, 372-84.
- Liang H.L., Nien C.Y., Liu H.Y., Metzstein M.M., Kirov N. & Rushlow C. (2008) The zinc-finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in *Drosophila*. *Nature* **456**, 400-3.
- Lim S.L., Tsend-Ayush E., Kortschak R.D., Jacob R., Ricciardelli C., Oehler M.K. & Grutzner F. (2013) Conservation and Expression of piRNA Pathway Genes in Male and Female Adult Gonad of Amniotes. *Biol Reprod*.
- 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 Molecular Biology* **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**, 519-23.
- Liu W.M., Pang R.T., Chiu P.C., Wong B.P., Lao K., Lee K.F. & Yeung W.S. (2012c) Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 490-4.
- Lucas K. & Raikhel A.S. (2013) Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions. *Insect Biochem Mol Biol* **43**, 24-38.
- Martin M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMB net journal* **17**, 10-2.
- Mcknight S.L. & Miller O.L. (1976) Ultrastructural Patterns of Rna-Synthesis during Early Embryogenesis of *Drosophila-Melanogaster*. *Cell* **8**, 305-19.
- Mishima Y., Giraldez A.J., Takeda Y., Fujiwara T., Sakamoto H., Schier A.F. & Inoue K. (2006) Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr Biol* **16**, 2135-42.
- Mittwoch U. (1978) Parthenogenesis. *J Med Genet* **15**, 165-81.
- Mortazavi A., Williams B., McCue K., Schaeffer L. & Wold B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* **5**, 621-9.
- Nakahara K., Kim K., Sciulli C., Dowd S.R., Minden J.S. & Carthew R.W. (2005) Targets of microRNA regulation in the *Drosophila* oocyte proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12023-8.
- Nelson J.A. (1915) *Embryology of the Honey bee*.
- Nien C.Y., Liang H.L., Butcher S., Sun Y., Fu S., Gocha T., Kirov N., Manak J.R. & Rushlow C. (2011) Temporal coordination of gene networks by Zelda in the early *Drosophila* embryo. *PLoS Genet* **7**, e1002339.
- Orkin S. (1990) Molecular-Cloning - a Laboratory Manual, 2nd Edition - Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. *Nature* **343**, 604-5.
- Osborne P. & Dearden P.K. (2005a) Non-radioactive in-situ hybridisation to honeybee embryos and ovaries. *Apidologie* **36**, 113-8.

- Osborne P.W. & Dearden P.K. (2005b) Expression of Pax group III genes in the honeybee (*Apis mellifera*). *Dev Genes Evol* **215**, 499-508.
- Pearson J.C., Watson J.D. & Crews S.T. (2012) *Drosophila melanogaster* Zelda and Single-minded collaborate to regulate an evolutionarily dynamic CNS midline cell enhancer. *Dev Biol* **366**, 420-32.
- Pilot F. (2006) Developmental control of nuclear morphogenesis and anchoring by charleston, identified in a functional genomic screen of *Drosophila* cellularisation. *Development* **133**.
- Rachinsky A., Strambi C., Strambi A. & Hartfelder K. (1990) Caste and Metamorphosis - Hemolymph Titers of Juvenile-Hormone and Ecdysteroids in Last Instar Honeybee Larvae. *General and Comparative Endocrinology* **79**, 31-8.
- Rembold H. (1987) Caste Specific Modulation of Juvenile-Hormone Titers in *Apis-Mellifera*. *Insect Biochemistry* **17**, 1003-6.
- Rothe M., Pehl M., Taubert H. & Jackle H. (1992) Loss of Gene-Function through Rapid Mitotic-Cycles in the *Drosophila* Embryo. *Nature* **359**, 156-9.
- Rouget C., Papin C., Boureux A., Meunier A.C., Franco B., Robine N., Lai E.C., Pelisson A. & Simonelig M. (2010) Maternal mRNA deadenylation and decay by the piRNA pathway in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **467**, 1128-32.
- Rozen S. & Skaletsky H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**, 365-86.
- Rubio M., de Horna A. & Belles X. (2012) MicroRNAs in metamorphic and non-metamorphic transitions in hemimetabolous insect metamorphosis. *BMC Genomics* **13**, 386.
- Ruby J.G., Jan C.H. & Bartel D.P. (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* **448**, 83-6.
- Sasaki K. & Obara Y. (2002) Egg activation and timing of sperm acceptance by an egg in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* **49**, 234-40.
- Sato K., Nishida K.M., Shibuya A., Siomi M.C. & Siomi H. (2011) Maelstrom coordinates microtubule organization during *Drosophila* oogenesis through interaction with components of the MTOC. *Genes Dev* **25**, 2361-73.
- Schier A.F. & Giraldez A.J. (2006) MicroRNA function and mechanism: insights from zebra fish. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**, 195-203.
- Schonbaum C.P., Perrino J.J. & Mahowald A.P. (2000) Regulation of the vitellogenin receptor during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 511-21.
- Semotok J.L. & Lipshitz H.D. (2007) Regulation and function of maternal mRNA destabilization during early *Drosophila* development. *Differentiation* **75**, 482-506.
- Sempere L., Sokol N., Dubrovsky E., Berger E. & Ambros V. (2003) Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity. *Dev Biol* **259**, 9-27.
- Shen-Orr S.S., Pilpel Y. & Hunter C.P. (2010) Composition and regulation of maternal and zygotic transcriptomes reflects species-specific reproductive mode. *Genome Biol* **11**, R58.
- Shermoen A.W. & Ofarrell P.H. (1991) Progression of the Cell-Cycle through Mitosis Leads to Abortion of Nascent Transcripts. *Cell* **67**, 303-10.
- Siddiqui N.U., Li X., Luo H., Karaiskakis A., Hou H., Kislinger T., Westwood J.T., Morris Q. & Lipshitz H.D. (2012) Genome-wide analysis of the maternal-to-zygotic transition in *Drosophila* primordial germ cells. *Genome Biol* **13**, R11.
- Snodgrass R. (1984) Anatomy of the honey bee.
- Somel M., Guo S., Fu N., Yan Z., Hu H.Y., Xu Y., Yuan Y., Ning Z., Hu Y., Menzel C., Hu H., Lachmann M., Zeng R., Chen W. & Khaitovich P. (2010) MicroRNA, mRNA, and protein expression link development and aging in human and macaque brain. *Genome Res* **20**, 1207-18.
- Soni K., Choudhary A., Patowary A., Singh A.R., Bhatia S., Sivasubbu S., Chandrasekaran S. & Pillai B. (2013) miR-34 is maternally inherited in *Drosophila melanogaster* and *Danio rerio*. *Nucleic Acids Res* **41**, 4470-80.
- Stark A., Brennecke J., Russell R. & Cohen S. (2003) Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol* **1**.
- Stetina J.R.V. & Orr-Weaver T.L. (2011) Developmental Control of Oocyte Maturation and Egg Activation in Metazoan Models. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
- Stitzel M.L. & Seydoux G. (2007) Regulation of the oocyte-to-zygote transition. *Science* **316**, 407-8.
- Sung H.W., Spangenberg S., Vogt N. & Grosshans J. (2013) Number of nuclear divisions in the *Drosophila* blastoderm controlled by onset of zygotic transcription. *Curr Biol* **23**, 133-8.
- Tadros W., Goldman A.L., Babak T., Menzies F., Vardy L., Orr-Weaver T., Hughes T.R., Westwood J.T., Smibert C.A. & Lipshitz H.D. (2007a) SMAUG is a major regulator of maternal mRNA

- destabilization in *Drosophila* and its translation is activated by the PAN GU kinase. *Dev Cell* **12**, 143-55.
- Tadros W. & Lipshitz H.D. (2009a) The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* **136**.
- Tadros W. & Lipshitz H.D. (2009b) The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* **136**, 3033-42.
- Tadros W., Westwood J.T. & Lipshitz H.D. (2007b) The Mother-to-Child Transition. *Dev Cell* **12**.
- Takeo S., Tsuda M., Akahori S., Matsuo T. & Aigaki T. (2006) The calcineurin regulator *sra* plays an essential role in female meiosis in *Drosophila*. *Curr Biol* **16**, 1435-75.
- ten Bosch J.R., Benavides J.A. & Cline T.W. (2006) The TAGteam DNA motif controls the timing of *Drosophila* pre-blastoderm transcription. *Development* **133**, 1967-77.
- Thomsen S., Anders S., Janga S., Huber W. & Alonso C. (2010) Genome-wide analysis of mRNA decay patterns during early *Drosophila* development. *Genome Biol* **11**.
- Tucker K. (1958) Automictic parthenogenesis in the honey bee. *Genetics*.
- Van Oystaeyen A., Oliveira R.C., Holman L., van Zweden J.S., Romero C., Oi C.A., d'Ettorre P., Khalesi M., Billen J., Wackers F., Millar J.G. & Wenseleers T. (2014) Conserved class of queen pheromones stops social insect workers from reproducing. *Science* **343**, 287-90.
- Vieira S. (2008) *Introdução a Bioestatística*. .
- Wang L., Feng Z., Wang X., Wang X. & Zhang X. (2010) DESeq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics* **26**, 136-8.
- Wang X., Liu P., Zhu H., Xu Y., Ma C., Dai X., Huang L., Liu Y., Zhang L. & Qin C. (2009) miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits *bcl2* translation. *Brain Res Bull* **80**, 268-73.
- Wilson M.J., Abbott H. & Dearden P.K. (2011) The evolution of oocyte patterning in insects: multiple cell-signaling pathways are active during honeybee oogenesis and are likely to play a role in axis patterning. *Evol Dev* **13**, 127-37.
- Wilson M.J. & Dearden P.K. (2008) Evolution of the insect Sox genes. *BMC Evol Biol* **8**, 120.
- Wilson M.J. & Dearden P.K. (2009) Tailless patterning functions are conserved in the honeybee even in the absence of Torso signaling. *Dev Biol* **335**, 276-87.
- Wilson M.J. & Dearden P.K. (2012) Pair-rule gene orthologues have unexpected maternal roles in the honeybee (*Apis mellifera*). *PLoS One* **7**, e46490.
- Wilson M.J., Havler M. & Dearden P.K. (2010a) Giant, Kruppel, and caudal act as gap genes with extensive roles in patterning the honeybee embryo. *Dev Biol* **339**, 200-11.
- Wilson M.J., McKelvey B.H., Heide S. & Dearden P.K. (2010b) Notch signaling does not regulate segmentation in the honeybee, *Apis mellifera*. *Dev Genes Evol* **220**.
- Wolfner M.F. (2009) Battle and ballet: molecular interactions between the sexes in *Drosophila*. *J Hered* **100**, 399-410.
- Xu P.Z., Vernooy S.Y., Guo M. & Hay B.A. (2003) The *Drosophila* MicroRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current Biology* **13**, 790-5.
- Yamaguchi S., Homma K. & Natori S. (1999) A novel egg-derived tyrosine phosphatase, EDTP, that participates in the embryogenesis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Eur J Biochem* **259**, 946-53.
- Zhang W., Edwards A., Fan W., Flemington E.K. & Zhang K. (2012) miRNA-mRNA correlation-network modules in human prostate cancer and the differences between primary and metastatic tumor subtypes. *PLoS One* **7**, e40130.
- Zheng P., Vassena R. & Latham K. (2006) Expression and downregulation of WNT signaling pathway genes in rhesus monkey oocytes and embryos. *Mol Reprod Dev* **73**, 667-77.
- Zhou J., Song S., Cen J., Zhu D., Li D. & Zhang Z. (2012) MicroRNA-375 is downregulated in pancreatic cancer and inhibits cell proliferation in vitro. *Oncol Res* **20**, 197-203.
- Zondag L., Dearden P.K. & Wilson M.J. (2012) Deep sequencing and expression of microRNAs from early honeybee (*Apis mellifera*) embryos reveals a role in regulating early embryonic patterning. *BMC Evol Biol* **12**, 211.

ANEXO

TRANSCRIPTOME ANALYSIS IN HAPLOID AND DIPLOID EMBRYO OF HONEYBEE (*APIS MELLIFERA*) REVEAL EARLY ZYGOTIC TRANSCRIPTION DURING CLEAVAGE

Camilla Valente Pires¹; Flávia C P Freitas¹; Alexandre S Cristino²; Peter K Dearden³; Zilá Luz Paulino Simões⁴

Affiliations

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

2 Queensland Brain Institute, Queensland University, Brisbane Australia

3 School of Medical Sciences Genetics Otago - University of Otago - Dunedin - New Zealand;

4 Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

ABSTRACT

In Hymenoptera, embryogenesis assumes a special aspect since the sex determination system is the haplodiploid. Therefore, the knowledge about processes in early embryogenesis, like egg activation, cleavage and maternal-to-zygotic transition is essential for us to understand the development of two organisms, which differ in the ploidy: haploids are males, diploid are females. Maternal mRNA and proteins control egg activation in both males and females embryos. The maternal-to-zygotic transition marks the time when embryogenesis no longer depends on maternal RNAs and relies on zygotically transcribed RNAs. Because of this, we explored the early embryogenesis regulation and highlight the differences and similarities among haploid and diploid embryos in *Apis mellifera*. Here, we present the first investigation of early embryogenesis in honeybees (*A. mellifera*), comparing haploid and diploid embryos. We identified maternal or zygotic mRNAs and miRNAs and searched for conserved processed in *Drosophila*. Based on expression profiles of mRNAs and miRNAs in mature oocytes and haploid and diploid embryos of 2, 6 and 18-24 h of development, we constructed integrative regulatory networks (miRNA:mRNA) showing that the same miRNA could be targeted by different mRNAs in each type of embryo, in the same phase of development. In addition, the same gene could be regulate between the types of embryo differentially. For example, *broad*/GB48272, which is maternal in diploid embryos and it is regulated by four different miRNAs. However, in haploid embryos it is zygotic and regulated by only one miRNA. Analysis of RNAseq and *in situ* hybridization showed the expression pattern of *zelda* in early honeybee embryos. *Zelda* is a key activator of *Drosophila* early zygotic genome and regulates by binding to TAGteam motif. In *A. mellifera*, we found a putative TAGteam motif that has been implicated in early zygotic transcription. Moreover, *in situ* hybridization and PCR assay showed three pri-miRNAs (*ame-mir-375-3p*, *ame-mir-34-5p* and *ame-mir-263b-5p*) expressed during cleavage. The pri-miRNAs transcription is the first evidence of early zygotic transcription during cleavage.

INTRODUCTION

Embryonic development is the result of precisely controlled sequence of events modulated by environmental signals and intracellular mechanisms (Thomsen *et al.* 2010). The early embryogenesis is characterized by maternal elements acting directly on the first processes of embryo formation, which includes egg activation, cleavage, and maternal-to-zygotic transition (MZT) (Tadros & Lipshitz 2009a). In Hymenoptera the embryogenesis assumes special feature because of the sex determination system, the haplodiploidy. In haplodiploid species, fertilized eggs develop into females (diploid) and unfertilized eggs into males (haploid). The regulation of embryonic development in honeybees and how it is affected by the ploidy is still unknown.

Egg activation is a widespread phenomenon in metazoan (Horner & Wolfner 2008). However, it could be so specific that it is also possible to affirm that each species developed its own way to accomplish this task, despite common rules directing embryonic development. Intriguing particularities occur, including mechanical stimulation, which, independently of fertilization, could be the starting point of the egg activation and development in *Drosophila* (Tadros & Lipshitz 2009). In honeybee the fertilization is not required for egg activation either which is triggered by different stimuli as ionic changes along the reproductive tract (Sasaki & Obara 2002). During egg activation, maternal RNA families (Stetina & Orr-Weaver 2011) are recruited for translation (Stitzel & Seydoux 2007) because the molecules required for egg activation are not transcribed in the oocyte (Stetina & Orr-Weaver 2011). The mRNAs encoding proteins remain inactivated since oocyte maturation (Krauchunas *et al.* 2012) and have different fates, acting as maternal molecules during egg activation, as well as in early embryogenesis (Tadros *et al.* 2007b) according to their structural characteristics and half-life (Thomsen *et al.* 2010).

The genome remains quiescent during the first events of development (Thomsen *et al.* 2010; Darbo *et al.* 2013). The maternal mRNAs, deposited into the developing oocyte, are translated to produce at the right time proteins that regulate the expression of zygotic genes (Soni *et al.* 2013), during maternal-to-zygotic transition (MZT) (Darbo *et al.* 2013; Tadros & Lipshitz 2009). MZT is a very dynamic process where degradation of maternal proteins and RNAs occur simultaneously with transcriptional reactivation for the synthesis of new molecules and essential events of embryonic development (Tadros & Lipshitz 2009). Two transcriptional waves, minor and major, characterize the activation of zygotic genome (Grosshans *et al.* 2003; Alberts *et al.* 2008; Sung *et al.* 2013), taking place at mice, frogs, fish, fruit flies, sea urchins, and nematodes (Baroux *et al.* 2008; Tadros & Lipshitz 2009a). In *Drosophila*, the first minor wave starts during the 8th mitotic cycle, in pre-blastoderm embryo, and the major wave at 14th mitotic cycle, in the cellular blastoderm (Grosshans *et al.* 2003; ten Bosch *et al.* 2006; De Renzis *et al.* 2007; Sung *et al.* 2013). In general, the genes expressed during the first wave are involved in sex determination, patterning and cellularization (ten Bosch *et al.* 2006). In addition, transcription factors, like Zelda (*vielfaltig-vlf*), activates zygotic genes during the MZT, binding to *cis*-element conserved motifs TAGteam (ten Bosch *et al.* 2006; Liang *et al.* 2008). In *Drosophila*, *zelda* is described as a maternal transcript that is degraded in early embryogenesis and during cellularization it is produced by zygotic machinery (Liang *et al.* 2008). The number of gene transcripts at this moment seems to be very high as demonstrated so far using genome-wide approach (Benoit *et al.* 2009; Thomsen *et al.* 2010; Biedler *et al.* 2012; Siddiqui *et al.* 2012). In honeybees, it is not known when occur the 8th or 14th mitotic cycles, and there are not described details permitting the identification of MZT. It is known that the cleavage occurs 7 h

after the egg laying (AEL) and the blastoderm is formed around 18-24 h AEL (Nelson 1915; Cruz-Landim 2009).

Then, we sought to study the early embryogenesis regulation in haploid and diploid embryos of *Apis mellifera*. Therefore, here we highlighted the differences or/and similarities between two types of embryos, according to their regulation origin (maternal or zygotic), zygotic genome activation, and if this process is conserved in *A. mellifera* compared to *Drosophila*. Based on the analysis of fourteen RNAseq libraries, we brought forth early embryogenesis integrative networks (miRNA:mRNA) constructed from mature oocyte, haploids and diploids embryos (2 h, 6 h and 18-24 h of development), showing the regulatory origins of miRNAs (maternal or zygotic). In the present study, we determined Zelda localization and expression in *A. mellifera* by in situ hybridization and RNAseq. In addition, we found putative evidence of TAGteam motifs in *A. mellifera*, overrepresented in the upstream sequences of zygotic honeybee genes, what has been implicated in early zygotic transcription. This was previously demonstrated in *Drosophila* where Transcription factor Zelda binds the TAGteam motif, and it was shown to be a key activator of the early zygotic genome (ten Bosch *et al.* 2006; Liang *et al.* 2008; Nien *et al.* 2011). .. Moreover, *in situ* hybridization stained three pri-miRNAs (*ame-mir-375-3p*, *ame-mir-34-5p* and *ame-mir-263b-5p*) into the cleavage nuclei embryos, confirmed by PCR assay. This fact suggests the presence of early zygotic transcription in *A. mellifera* before the blastoderm formation, as in *Drosophila*.

MATERIAL AND METHODS

Honeybee biological sample and RNA-seq library preparation

All samples were obtained from regular honeybee colonies maintained in the apiary of the Department of Genetics of Ribeirão Preto School of Medicine of the University of São Paulo. To sample controlled aged embryos a mated egg-laying queen was caged to a wax comb frame in an area free from eggs and brood and placed back into the hive. After 2 hours, the eggs were collected and pooled as 0-2 h embryo sample. After 6 hours, the cage was removed, the queen was released to the original hive and 0-6 h embryo sample was collected. The remaining eggs were collected 24 h after, as the 18-24 h embryo sample. The haploids eggs were obtained using the same method and same time points. A virgin queen was caged to a comb frame. Mature oocytes were collected directly from queen ovaries. Total RNA was extracted from oocytes and embryos using TRIzol (Life Technologies). The concentration and purity of sample were determined using Nanodrop spectrometer (Thermo Scientific). Four µg of total RNA were used as template for small RNAs and mRNAs libraries preparation according to Illumina single-end protocol (Genome Analyzer II, Life Sciences). Libraries preparation and sequencing were performed at the High-Throughput Sequencing Facility in the University of North Carolina - Chapel Hill, USA (<http://www.unc.edu/htsf/index.html>). A total of fourteen libraries were constructed using age controlled haploid and diploid embryos and mature oocytes (seven mRNAs and seven small RNAs libraries prepared from mature oocyte, diploid embryos with 0-2 h, 0-6 h and 18-24 h, and haploid embryos with 0-2 h, 0-6 h and 18-24 h).

Bioinformatics analysis of sequencing data

Adaptor sequences were filtered out from both mRNA and small RNAs libraries. Mapping step was performed using BWA software (Li & Durbin 2009) and default parameters. Small RNAs libraries were mapped into the honeybee hairpin sequences available on miRBase (version 19, (Kozomara & Griffiths-Jones 2011). Reads 19-24 nt long, according to miRNAs definition - Bartel (2009), were considered in further analysis. According to the position where the reads

mapped into the hairpin, they were classified as 'miRNA-5p' or 'miRNA-3p'. This approach not only identified mature miRNAs already described in miRBase database (version 19) but also identified novel mature miRNAs (supplementary, S1). mRNA libraries were mapped in a database containing honeybee predicted genes (amel4.5; <http://genome.ucsc.edu>), tRNA (GtRNAdb; <http://gtndb.ucsc.edu/>), rRNA (SILVA; <http://www.arb-silva.de/>), pathogens genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), other noncode RNAs (NONCODE; <http://www.noncode.org/NONCODERv3/>) and miRNAs (miRBase 19; <http://www.mirbase.org/>). Using homemade python scripts, we count the frequency of each miRNA and calculate the RPKM (Mortazavi *et al.* 2008).

Early embryonic Regulatory Networks Construction

Regulatory networks were constructed as described by Dong *et al.* (2010) and Zhang *et al.* (2012). Firstly, Pearson correlation was calculated for every possible miRNA:mRNA pair, using the expression profiles provided by the RNAseq. We identified negatively correlated miRNA:mRNA pairs ($R < -0.8$) for both haploids and diploids embryo, separately. We searched for miRNA binding-sites at the 3' untranslated region (3'UTR) of selected genes, using miRanda software (Enright *et al.* 2003). As the 3'UTRs data is incomplete for honeybee genome, we used 1000 bp region downstream the stop codon for each predicted gene. Predicted miRNA:mRNA pairs with minimum free energy < -15 kcal/mol were considered as putative miRNA:targets interactions. The miRNA:mRNA network was visualized using Cytoscape (<http://cytoscape.org>). We constructed two networks, one representing miRNA:mRNA interactions predicted for haploid early embryogenesis and the second one predicted for diploid early embryogenesis. Then, we identified the common miRNA:mRNA interactions, generating a network constructed by the intersection of both haploid and diploid networks (Shared network), a haploid embryo exclusive network and a diploid embryo exclusive network (supplementary, S2). Among these networks, we constructed sub-networks identifying zygotic or maternal genes and miRNAs (Figure 1).

Gene Ontology analysis

It were identified honeybee orthologous for *Drosophila melanogaster* genes by reciprocal BLAST. To explore the functional role played by zygotic and maternal genes, we searched for main biological processes from Gene Ontology Enrichment analysis implemented in DAVID 6.7 (Dennis *et al.* 2003) using default parameters.

Candidates to TAGteam genes

We searched for conserved motifs in zygotic genes using SCOPE (The Suite for Computational Identification of Promoter Elements) which is a parameter-free program designed to identify *cis* sequences in a set of co-regulated genes (<http://genie.dartmouth.edu/scope/>). The search for motifs was performed in the promoter region (1000 bp region upstream to the start codon) of the genes from each zygotic class (the zygotically transcribed genes fall into three distinct classes: I, II and III). We selected the motifs based on the sig value (negative log of the expectation value) and coverage (greater than 80%) for each zygotic gene class. The position weight matrix (PWM) generated for each motif class gene was aligned with tree PWMs used by Biedler *et al.*, 2012 from *Drosophila* and *A. aegypt* (supplementary, S5), and TAGteam motifs sequence (ten Bosch *et al.* 2006): CAGGTAG, CAGGCAG and TAGGTAG, using STAM program (<http://www.benoslab.pitt.edu/stamp/>). The genes with best score to TAGteam motifs (smaller e-value) were considered putative TAGteam gene in *A. mellifera*. To identify whether there are putative targets of zelda in *A. mellifera*, we searched for orthologous among honeybee TAGteam genes and

Drosophila TAGteam genes regulated by Zelda and described by ten Bosch *et al.* (2006).

***In situ* Hybridization**

Oligonucleotide primers were designed to amplify 300-700 bp regions using cDNA from mRNA embryos template. In each amplicon, the precursor miRNA or mRNA was in the center of the sequence. PCR fragments were cloned into the appropriated vector and sequenced. Cloned fragments were used to produce RNA sense and antisense *in situ* hybridization probes. The sequence primer pairs are: *Ame-zelda/GB52047* F 5'GTACTACGATGCCTCACCAG3' and R 5'TGATCATACCGTCCGTGTTTC3', *pri-ame-miR-263b* F 5'TCTCTCCACGACTGCAAGAA3' and R 5'ATTGTTGATCAAAGGATTCTCA3', *pri-ame-miR-34* F 5'TCATCGAATTCACCGTGGAG 3' and R 5'TAATCACCGGGAGAATACTGA 3', *pri-ame-miR-375*, F 5'GTACTTGTTCGCGCGTTCTC 3' and R 5'CGCTGCATATACACCAACTGA 3'. The *in situ* hybridization for mRNA was performed as per Osborne and Dearden (2005a) and for pri-miRNA as per Zondag *et al.* (2012).

Pri-miRNAs Polymerase chain reaction (PCR)

RNA samples were incubated in the presence of three units of RNase-free DNase (Invitrogen) for 15 min at room temperature and for 5 min at 70 °C to inactivate the DNase. First-strand cDNA was synthesized by reverse transcription (RT) using 2.5 µg of total RNA, SuperScript II reverse transcriptase and the oligo (dT)12–18 primer (Invitrogen, Life Technologies). Reactions not including the SuperScript II reverse transcriptase or cDNA template were prepared as negative controls and analyzed in parallel. PCR amplification was carried out using 10 µL of Master Mix 2X (Promega), 7.4 µL of water, 0.8 µL of each gene-specific primer (10 mM) and 1 µL of cDNA. The PCR conditions were 95 °C for 30 s, 60 °C for 45 s and 72 °C for 30 s. The PCR product was analysed using electrophoresis in 2.0 % agarose gel (Amersham-Pharmacia Biotech), in TBE 1x (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.0) with 0.5 µg of ethidium bromide per mL.

RESULTS

Early embryonic regulatory networks

The transcriptome sequencing of small RNA and mRNA from mature oocyte and three embryonic time points (0-2, 0-6, and 18-24 h) from haploid and diploid embryo genes generated a large set of genes and their regulators (Supplementary, S3). Their orthologous were used for reconstruction of early embryonic gene regulatory networks to understand molecular relationships driving early embryonic developmental processes (Supplementary S2). Firstly, we grouped genes and miRNAs according to their maternal or zygotic origin. This classification recovered a set of useful information that permitted us reconstructing sub-networks to establish a regulatory dynamic for these two classes of genes (Figure 1). Secondly, maternal and zygotic genes and miRNAs were grouped into classes according to their expression profiles. The maternal genes and miRNAs were set into two classes; Class I defined by genes and miRNAs expressed only in mature oocytes; Class II defined by genes and miRNAs expressed in mature oocytes that decreased expression in at least 5 RPKMs at 0-2 h and/or 0-6 h, reaching zero as a final value at 18-24 h. The zygotic classes were set as follow: Class I composed by

genes and miRNAs strictly zygotic (it means, with no transcripts in oocytes and noticeable expression in 0-2, 0-6 and 18-24 h-old embryos. Class II was defined by genes and miRNAs with a 5 RPKMs increase in expression from the mature oocyte to 0-2 h and/or 0-6 h and continue to be expressed in 18-24 h embryos. Class III groups genes and miRNAs that are degraded at 0-2 h and/or 0-6 h, and then re-expressed at 18-24 h. In *Drosophila*, it was reported that 70% of transcribed genes during mitotic cycles do not have introns and encode small proteins. It is believed to be selection for an efficient transcription during the fast replication cycles in early embryonic development (Mcknight & Miller 1976; Shermoen & Ofarrell 1991; Rothe *et al.* 1992; Biedler *et al.* 2012). In *Apis mellifera*, the cleavage begins in up to 7 h (Nelson 1915; Cruz-Landim 2009), which justify the embryonic time points chosen for the analysis (0-2 h or 0-6 h) and it was considered just genes without introns in zygotic genes class II and III. For gene classes and expression values see S3.

Gene ontology (GO) analysis revealed diverse biological processes (Supplementary, S4) consistent with early embryonic development and gene classification. The majority class I maternal genes are related to post-embryonic development and maintenance of basic cellular processes. For example, the Regulation of Gene Expression associate with gene HLH4C/GB49291 and Wnt signaling pathway with Wnt2/GB47005 (Supplementary, S4) are highly conserved genes whose functions are involved in several developmental processes. For class II maternal genes it was found orthologous only among those expressed in diploid embryos (Supplementary, S4), but no term or biological processes associated. Few genes are included in class I zygotic genes, however they are consistent and close related to biological processes expected for this development phase. For example, genes related to transcriptional process and cell cycle are included in class I zygotic genes, both processes clearly related to cell division, the most frequent event at the beginning of development till blastoderm formation around 24 hours (Nelson 1915). In *Drosophila*, the MZT occurs just before blastoderm cellularization (Tadros & Lipshitz 2009), marked by a stop in cell division, around the 13th cleavage cycle (ten Bosch *et al.* 2006; Sung *et al.* 2013). The nucleosomes and chromatin modification, DNA binding proteins, transcription regulation and cell cycle are zygotic class II genes-related processes. Class II genes are expressed quickly during cleavage, what is consistent with the rapid development at this phase. For this, it is necessary chromosome modification, DNA binding proteins synthesis and transcription factor to start the specific gene transcription and regulation of this process (Schier 2007). The transcripts for class III zygotic usually involved in regionalization, syncytium formation, dorsal-ventral axis formation and sex determination, processes that occur when the blastoderm is being formed (Nelson 1915). In general, these biological processes correlate with expression phase gene, giving robustness to it.

For zygotic genes it was constructed four regulatory sub-networks: "Diploid zygotic genes regulatory Network" (Figure 1-A), "Diploid regulatory Network zygotic genes generated from shared network" (Figure 1-B), "Haploid regulatory Network zygotic genes" (Figure 1-C) and "Haploid regulatory Network zygotic genes generated from shared network" (Figure 1-D). Maternal genes were detected only in the diploid embryos network. Therefore, only one maternal gene regulatory sub-network was generated (Figure 1-E). In the diploid zygotic genes network (Figure 1-A) eight maternal miRNAs and eight zygotic miRNAs are regulating zygotic genes. However, two maternal miRNAs (ame-mir-6067-5p and ame-mir-3719-5p) are among regulators in the haploid zygotic genes network (Figure 1-C). The greater diversity of miRNAs in the diploid zygotic network is explained by the great quantity of genes. The network diversity is given by the expression of target genes, since the most of regulatory

miRNAs are the same, as ame-mir-31a-5p, ame-mir-190-5p and ame-mir-8-3p (Figure 1-A, C). In addition, miRNAs can be classified as the origin, the same miRNA in diploid network can be maternal (Figure 1-A) and in haploid network can be zygotic (Figure 1-C), as ame-mir-932-5p. Independent of diploid or haploid embryos, zygotic miRNAs regulates more zygotic genes than maternal miRNAs. Considering all networks there are several "undefined" miRNAs regulating maternal and zygotic genes.

TAGteam candidates

To investigate if there is a putative motif involved in early zygotic transcription (ten Bosch *et al.* 2006; De Renzis *et al.* 2007; Biedler *et al.* 2012), we searched for TAGteam motif in the 1000 bp upstream of the start codon of zygotic genes, by Suite for Computational Identification of Promoter Elements (SCOPE). For each zygotic gene class, we select the motif with best coverage and lowest *e-value* (Table 1). In order to compare binding sites from others similar sequences; each honeybee selected motif was aligned with position weight matrices (PWMs) and sequence correspond to motifs TAGteam of *Drosophila* (ten Bosch *et al.* 2006; De Renzis *et al.* 2007) and *A. aegypt* (Biedler *et al.* 2012) used by Biedler *et al.* (2012). STAMP program was used to perform the alignment, having sequence or PWM of select motif as query, and PWM or sequence of TAGteam as subject (Table 1). The motif NNTCCN, present in the promoter of haploid zygotic genes Class III, showed the best alignment with PWM and sequence TAGteam (*e-value*: 6,3209 e⁻²) (Table 2). The motif NNTCCN was selected as putative TAGteam motif of *A. mellifera*.

Zelda might regulate early zygotic transcription in *A. mellifera*

To characterize *zelda* expression in *A. mellifera* embryogenesis, we performed *in situ* hybridization. This procedure showed *A. mellifera* embryos of different ages (Figure 2 A-M) showed that mRNA *zelda*/GB52047 is present at the anterior pole of oocytes (Figure 2-A), in diploid embryos at the first cleavage nuclei (0-2 h and 0- 6 h, Figure 2-B, D-F), in blastoderm cells (18-24 h, Figure 2-G) and at the beginning of gastrulation (32-38 h; Figure 2-H) and during morphogenesis in the ectodermic cells (42-48 h; Figure 2-I). *zelda* mRNA was stained the Central Nervous System cells precursors in embryo (68-72 h; Figure 2 J,K). In 0-2 h haploid embryos, *zelda* mRNA are dispersed and form anterior-posterior line (Figure 2 L-M, arrow). We detected *zelda* mRNA in mature oocyte of *A. mellifera* (Figure 2-A). However, it is not known what cells express this gene in honeybee ovaries. *Zelda*/GB52047 is expressed in late embryonic development (Figure 2, * J-K). We observed concentration of *zelda* mRNA in the central nervous system precursors cells, including commissures and the cephalic region in 68-72 h embryo (Figure 2-K), as in *Drosophila*, which Zelda involved in central nervous systems (Pearson *et al.* 2012). In addition, we found five putative genes (GB42311/*CG13636*, GB48272/*br/broad*, GB44168/*dpp/decapentaplegic*, GB46515/*CG10175*, GB52015/*tl/taillless*, GB47493/*Dr/droopy*, GB55322/*en/engrailed*) that are regulated by Zelda in *A. mellifera* (Figure 3), among the genes which present the putative TAGteam motif.

Pri-miRNAs expression show early zygotic transcription during embryo cleavage

Three pri-miRNAs, corresponding to mature miRNAs regulators of important process in early embryos of *A. mellifera* were used to expression localization (Table 3). The *in situ* hybridizations performed for miRNAs, ame-mir-263b, ame-mir-34 and ame-mir-375 revealed that the respective pri-miRNAs is present in the nuclei or around them in

cleavage embryos of *A. mellifera* (Figure 4 A-M). Therefore, the zygotic genome is active during the first cleavages, producing miRNAs. Curiously, we observed the pri-*ame-mir-375* in the oocyte follicle cells nuclei (Figure 4-A). The protocol used for *in situ* hybridization stains preferentially pri-miRNA, (see material and methods). To reinforce this data, we performed PCR assay to assess if the pri-miRNA is actually expressed during cleavage stages. The pri-miRNA (primary miRNA) is processed by Drosha still inside the nucleus; afterwards, it receives polyA tail. In our case, we use a protocol based on polyA tail to recover RNA molecules (see Materials and methods). The synthesized cDNA was used as template for pri-miRNAs PCR reaction. The result indicated the presence of pri-*ame-mir-263b*, pri-*ame-mir-375* and pri-*ame-mir-34* in embryos with 0-2 h and 0-6 h (Figure 4-N), confirming the miRNA production by zygotic machinery. In addition, during cleavage phase we noted genes encoding for biogenesis machinery and production of miRNAs (Figure 5) giving to the embryos competence for miRNAs process (Lucas & Raikhel 2013).

DISCUSSION

Embryo development and consequently the formation of a new organism from a single undifferentiated cell is the result of a perfectly coordinate expression of thousands of genes (Thomsen *et al.* 2010). The dialog inside each cell and among differentiating cells and tissues of the forming embryo involve simultaneous periods of intense expression of a specific group of genes alternated with periods of deep silence of others. An interactive network of the genome-wide gene expression of an organism became almost concrete and visible in the last few years due the new high throughput protocols and bioinformatics tools.

Here we present, for the first time, gene interactive networks and gene expression localization to understand *Apis mellifera* embryonic development, taking advantage of the sex determination system in this organism and exploring the early diploid and haploid development. To construct gene differential expression profiles we analyzed 14 deep sequenced libraries of diploid and haploid embryos of different ages, at cleavage, syncytial and cellular blastoderm and also mature oocytes taken directly from queen ovaries. The latter represented the maternal contribution for the first steps of embryo development. *Drosophila* orthologous, identified in each mRNA libraries and used for the reconstruction of the regulatory networks, showed a well conserved embryonic development with this insect, for haploid and diploid embryos. However, also showed that during the intense dialog between miRNAs and their targets a very interesting feature, the same miRNAs could be targeted by different miRNAs in each type of embryo, although in the same phase of development. In diploid embryo, *broad*/GB48272 is maternal and regulated by *ame-mir-275-5p*, *ame-mir-305-5p*, *ame-mir-6053-5p* and *ame-mir12-5p*. In haploid embryos, the same gene is zygotic and regulated by *ame-mir-3786-5p* (Figure 1).

In our analysis egg activation was not taken in consideration because it has already been described in the literature that subtle environmental modifications are capable of break the meiosis dormancy (Stetina & Orr-Weaver 2011). There are genes from zygotic Class II, that increase its expression from mature oocyte to 0-2 h and 0-6 h embryos, permitting us to conclude that the egg is synthesizing new molecules, before fertilization. Moreover, it was detected miRNAs with role in maternal-to-zygotic transition. mRNAs involved in miRNA machinery of synthesis, (GB49096/*Drosha*, GB40545/*Pasha*, GB44595/*Dicer-1*, GB48208/*AGO1*, GB50955/*AGO2*, GB46636/*Nbr*) were also detected in every libraries (Figure 5) and miRNA precursors

(pri-miRNAs: *ame-mir-375*, *ame-mir-263b* and *ame-mir-34*) were localized by *in situ* hybridization in the nuclei of 0-2 h and 0-6 h embryos.

The gene classification according to the origin was performed based on the expression found in each embryo library. This type of classification was used by De Renzis *et al.* (2007), Benoit *et al.* (2009) and Siddiqui *et al.* (2012), and it was a strategy used to define the origin of embryo development regulation, if it is maternal or zygotic. Biological processes found for each class (supplementary, S4) are correlated with our classification gene approach, with expected functions in development. For example, genes related with biological processes, nucleosomes and chromatin modification, DNA binding proteins, transcription regulation and cell cycle are processes that zygotic class II genes are involved in (supplementary, S4). These genes are expressed during cleavage, period characterized by a fast DNA replication and specific gene transcription. In other organisms, as in *Aedes aegypti* (Biedler *et al.* 2012) and *Drosophila* (Rothe *et al.* 1992) at 2-4 h and until the 10th mitotic cycle prevails the binary cell division, without grow phase, the expression of intronless genes, corresponding to the class II genes.

Recent studies showed an integrative miRNA:mRNA network generated by antagonist expression data and interaction between miRNA and its 3'UTR target gene (Zhang *et al.* 2012; Dong *et al.* 2010). Here, we show that miRNAs regulate differently from the beginning of the haploid and diploid *A. mellifera* embryos and the putative regulation origin. Those bioinformatic specific approaches gave us the conservation between both, at least at the beginning of development. The co-expression of a miRNA and target gene in the same time and place, plus a predicted binding site for this miRNA in the 3'UTR of this gene (Bartel 2009), turn this regulation more likely to happen. The decrease in mRNA levels caused by a miRNA action, revealed by an antagonistic profile, reinforces the evidence that the miRNA can bind to the putative targets. Therefore, the reduction of the target mRNA by miRNA occurs soon after lowering its translation (Giraldez *et al.* 2006; Mishima *et al.* 2006; Bethune *et al.* 2012)

Different specific genes are present in the same organisms, but in different cells, and different genes regulating by the same regulators, the microRNAs. Haploid and diploid networks have different topology, but share the great majority of the miRNAs (*ame-mir-31a-5p*, *ame-mir-190-5p* and *ame-mir-8-3p*) (Figure 1-A, C). The topology also is based on the difference of miRNA origin expression, since *ame-mir-932-5p* is maternal in diploid network and zygotic in haploid network (Figure 1-A, C). Independently of diploid or haploid embryos, zygotic miRNAs regulate more zygotic genes than maternal miRNAs. Considering all networks there are several "undefined" miRNAs regulating maternal and zygotic genes. The mir-309 cluster, zygotically transcribed in *Drosophila*, regulates the zygotic genes transcription (Benoit *et al.* 2009), degrading maternal mRNA during maternal-to-zygotic transition. There is no described ortholog for this cluster in *A. mellifera*. However, *ame-mir-305* and *ame-mir-275*, classified as zygotic miRNAs, regulate maternal genes in diploid embryos (Figure 1-E) and are localized in the same genomic group (Group 4:22 - 4.0 genome, data from miRbase 19). According to the prediction, they could regulate a maternal gene in diploid network, *broad - br/GB48272* – Figure 1-E), a member of putative TAGteam, playing similar role to the mir-309 in the degradation of maternal genes.

In *A. mellifera* a conserved TAGteam motif was localized in a zygotic class of genes (Tables 1 and 2). Among the genes with TAGteam motif, there are five putative genes regulated by Zelda (GB42311/*CG13636*, GB48272/*br/broad*, GB44168/*dpp/decapentaplegic*, GB46515/*CG10175*, GB52015/*tltailless*, GB47493/*Dr/droopy*, GB55322/*en/engrailed*). These genes are involved in sex

determination, cellularization and dorsal pattern determination (Figure 3). Among the putative TAGteam genes and putative regulation by Zelda, is *broad* (GB48272/Br) (Figures 1-C, E and 3). *Broad*/GB48272 is classified as maternal in diploid embryos and zygotic in haploid embryos. In the diploid network it is regulated by four miRNAs: *ame-mir-6053-5p* (maternal), *ame-mir-305-5p* and *ame-mir-275-5p* (zygotic), and *ame-mir-12-5p* (undefined), in the haploid network by zygotic miRNA, *ame-mir-3785-5p*. The *Broad* is involved in sex determination in *Drosophila* (ten Bosch *et al.* 2006) and it is early expressed. Our data suggest that in diploid embryos *Broad* (GB48272/Br) is degraded before 0-2 h of development by miRNAs *ame-mir-305-5p* and *ame-mir-275-5p*. It is then replaced by zygotic machinery just in haploid embryos in 18-24 h.

The presence of *Zelda*/GB52047 in our libraries and the corresponding binding motif, NNTCCN, suggest that this transcription factor also plays a role in *A. mellifera* development. In addition, *Zelda*/GB52047 seems to be maternally transcribed and deposited into the oocytes, degraded in early embryogenesis and replaced during maternal-to-zygotic transition in honeybee embryogenesis (Figure 2-N). Moreover, the *in situ* hybridization showed that *zelda*'s role seems conserved. The presence of *zelda* mRNA around the nuclei in early embryos (Figure 2) reinforce those finding. In *Drosophila*, *Zelda* is a nuclear protein, detected between 1-2 h of embryonic development (Nien *et al.* 2011). *Zelda* mRNA also stained in blastodermic cells, in precursors of NCS, as ventral nerve cord and brain. Others ectodermal derivatives also marked the stomodeo cells and precursors of the mouth parts. The function of *Zelda* at early embryogenesis, in zygotic gene transcription at blastodermal stage (Liang *et al.* 2008), and during late embryogenesis, in precursor neuronal tissues and tracheal system were described for *Drosophila* by Pearson *et al.* (2012).

Besides the enriched networks we localized by *in situ* hybridization and expression, by PCR assay, of 3 pri-miRNAs: *ame-mir-375-3p*, *ame-mir-263b-5p* and *ame-mir-34-5p* (Figure 4), pointed by *in silico* analysis having different targets in both embryos at 0-24 h of development (Table 3). To know where miRNAs were expressed, gave support to our classifications of origin regulation. In addition, this approach suggests a new fact at the early development in insect: zygotic transcription happens during cleavage. For many years, it has been believed that the zygotic transcription is repressed during cleavage (Schier 2007). However, in a nematode *Ascaris suum* the major zygotic transcription occurs between fertilization of egg and pronuclei fusion, suggesting that new zygotic genes and deposited maternal gene drive early embryogenesis in *A. suum* (Wang *et al.* 2013). Here, we showed that the early miRNAs zygotic transcription in *A. mellifera* is possible, since the embryo is capable of processes the miRNAs precursors (Figure 5). In addition, the increasing of gene expression during this phase (class II zygotic gene) reinforces the zygotic transcription during cleavage of *A. mellifera*.

CONCLUSION

In conclusion, we suggest a miRNA regulation in early embryogenesis: maternal miRNAs are produced in the nuclei of follicular cells, processed and sent to the mature oocytes (pre-miRNA or mature miRNAs). During the cleavage the inherited pre-miRNAs are processed in the embryos giving rise to the mature miRNAs that regulate maternal mRNAs. Meanwhile, the zygotic genome is activated, and miRNAs not located in introns of genes are transcribed. Genes expressed in the cleavage do not have introns. Zygotic miRNAs are mainly responsible for maternal mRNA degradation and zygotic genes somehow helps zygotic transcription, which increases steadily up to 24 hours of embryonic development.

This is the first time that a zygotic transcription of miRNAs is shown during cleavage. In addition, this is the first study that describes gene and miRNAs time-course expression in early honeybee embryos, emphasizing differences and similarities between haploid and diploid embryos.

REFERENCE

- Abrams E. & Mullins M. (2009) Early zebrafish development: it's in the maternal genes. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 396-799.
- Agostini M., Tucci P., Killick R., Candi E., Sayan B.S., Rivetti di Val Cervo P., Nicotera P., McKeon F., Knight R.A., Mak T.W. & Melino G. (2011) Neuronal differentiation by TAp73 is mediated by microRNA-34a regulation of synaptic protein targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 21093-8.
- Alberts B. (2010) Cell Biology: The Endless Frontier. *Molecular Biology of the Cell* **21**, 3785-.
- Alberts B., Wilson J.H. & Hunt T. (2008) *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York.
- Aravin A.A., Lagos-Quintana M., Yalcin A., Zavolan M., Marks D., Snyder B., Gaasterland T., Meyer J. & Tuschl T. (2003) The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* **5**, 337-50.
- Arbeitman M.N. (2002) Gene Expression During the Life Cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science* **297**.
- Barchuk A.R., Cristino A.S., Kucharski R., Costa L.F., Simoes Z.L.P. & Maleszka R. (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *Bmc Developmental Biology* **7**.
- Baroux C., Autran D., Gillmor C.S., Grimanelli D. & Grossniklaus U. (2008) The maternal to zygotic transition in animals and plants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **73**, 89-100.
- Bartel D.P. (2007) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function (Reprinted from Cell, vol 116, pg 281-297, 2004). *Cell* **131**, 11-29.
- Bartel D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-33.
- Behura S.K. (2007) Insect microRNAs: Structure, function and evolution. *Insect Biochem Mol Biol* **37**, 3-9.
- Bejarano F., Smibert P. & Lai E.C. (2010) miR-9a prevents apoptosis during wing development by repressing *Drosophila* LIM-only. *Dev Biol* **338**, 63-73.
- Benoit B., He C., Zhang F., Votruba S., Tadros W., Westwood J., Smibert C., Lipshitz H. & Theurkauf W. (2009) An essential role for the RNA-binding protein Smaug during the *Drosophila* maternal-to-zygotic transition. *Development (Cambridge, England)* **136**, 923-55.
- Bethune J., Artus-Revel C.G. & Filipowicz W. (2012) Kinetic analysis reveals successive steps leading to miRNA-mediated silencing in mammalian cells. *EMBO Rep*.
- Biedler J.K., Hu W., Tae H. & Tu Z. (2012) Identification of early zygotic genes in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* and discovery of a motif involved in early zygotic genome activation. *PLoS One* **7**, e33933.
- Brennecke J., Hipfner D.R., Stark A., Russell R.B. & Cohen S.M. (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* **113**, 25-36.
- Bushati N. & Cohen S.M. (2007) microRNA Functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **23**.
- Bushati N., Stark A., Brennecke J. & Cohen S. (2008a) Temporal reciprocity of miRNAs and their targets during the maternal-to-zygotic transition in *Drosophila*. *Curr Biol* **18**, 501-7.
- Bushati N., Stark A., Brennecke J. & Cohen S. (2008b) Temporal reciprocity of miRNAs and their targets during the maternal-to-zygotic transition in *Drosophila*. *Curr Biol* **18**, 501-7.
- Campos-Ortega J.A. & Hastenstein V. (1997) *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Springer, Colônia, Alemanha.
- Cao J., Tong C., Wu X., Lv J., Yang Z. & Jin Y. (2008) Identification of conserved microRNAs in *Bombyx mori* (silkworm) and regulation of fibroin L chain production by microRNAs in heterologous system. *Insect Biochem Mol Biol* **38**, 1066-71.
- Carlson J.M., Chakravarty A., DeZiel C.E. & Gross R.H. (2007) SCOPE: a web server for practical de novo motif discovery. *Nucleic Acids Res* **35**, W259-64.
- 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 Molecular Biology* **19**.

- Cifuentes D., Xue H., Taylor D., Patnode H., Mishima Y., Cheloufi S., Ma E., Mane S., Hannon G., Lawson N., Wolfe S. & Giraldez A. (2010) A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science (New York, N.Y.)* **328**, 1694-702.
- Courteau L.A., Storey K.B. & Morin P., Jr. (2012) Differential expression of microRNA species in a freeze tolerant insect, *Eurosta solidaginis*. *Cryobiology* **65**, 210-4.
- Cristino A.S., Nunes F.M., Lobo C.H., Bitondi M.M., Simoes Z.L., da Fontoura Costa L., Lattorff H.M., Moritz R.F., Evans J.D. & Hartfelder K. (2006) Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality. *Insect Molecular Biology* **15**, 703-14.
- Cristino A.S., Tanaka E.D., Rubio M., Piulachs M.D. & Belles X. (2011) Deep sequencing of organ- and stage-specific microRNAs in the evolutionarily basal insect *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *PLoS One* **6**, e19350.
- Cruz-Landim C.d. (2009) *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. Editora UNESP, São Paulo - SP.
- Cui X.S., Shen X.H., Sun S.C., Cho S.W., Heo Y.T., Kang Y.K., Wakayama T. & Kim N.H. (2013) Identifying MicroRNA and mRNA expression profiles in embryonic stem cells derived from parthenogenetic, androgenetic and fertilized blastocysts. *J Genet Genomics* **40**, 189-200.
- Darbo E., Herrmann C., Lecuit T., Thieffry D. & van Helden J. (2013) Transcriptional and epigenetic signatures of zygotic genome activation during early *Drosophila* embryogenesis. *BMC Genomics* **14**, 226.
- De Renzis S., Elemento O., Tavazoie S. & Wieschaus E.F. (2007) Unmasking activation of the zygotic genome using chromosomal deletions in the *Drosophila* embryo. *PLoS Biol* **5**, e117.
- Dearden P., Duncan E. & Wilson M. (2009a) Fixation and storage of honeybee (*Apis mellifera*) tissues. *Cold Spring Harbor Protocols* **2009**.
- Dearden P.K. (2006) Germ cell development in the Honeybee (*Apis mellifera*); vasa and nanos expression. *Bmc Developmental Biology* **6**, 6.
- Dearden P.K., Duncan E.J. & Wilson M.J. (2009b) Whole-Mount In Situ Hybridization of Honeybee (*Apis mellifera*) Tissues. *Cold Spring Harbor Protocols* **2009**.
- Dearden P.K., Wilson M.J., Sablan L., Osborne P.W., Havler M., McNaughton E., Kimura K., Milshina N.V., Hasselmann M., Gempe T., Schioett M., Brown S.J., Elsik C.G., Holland P.W., Kadowaki T. & Beye M. (2006a) Patterns of conservation and change in honey bee developmental genes. *Genome Res* **16**, 1376-84.
- Dearden P.K., Wilson M.J., Sablan L., Osborne P.W., Havler M., McNaughton E., Kimura K., Milshina N.V., Hasselmann M., Gempe T., Schioett M., Brown S.J., Elsik C.G., Holland P.W., Kadowaki T. & Beye M. (2006b) Patterns of conservation and change in honey bee developmental genes. *Genome Res* **16**, 1376-84.
- Dennis G., Sherman B.T., Hosack D.A., Yang J., Gao W., Lane H.C. & Lempicki R.A. (2003) DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol* **4**.
- Dong H., Luo L., Hong S., Siu H., Xiao Y., Jin L., Chen R. & Xiong M. (2010) Integrated analysis of mutations, miRNA and mRNA expression in glioblastoma. *BMC Syst Biol* **4**, 163.
- DuPraw E.J. (1967) The Honeybee embryo. In: *Methods in Developmental Biology* (ed. by Wessells FHWaNK), pp. 183-217. Thomas Y. Cromwell New York.
- Enright A.J., John B., Gaul U., Tuschl T., Sander C. & Marks D.S. (2003) MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* **5**, R1.
- Evans J.D. & Wheeler D.E. (1999) Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5575-80.
- Gempe T., Hasselmann M., Schiott M., Hause G., Otte M. & Beye M. (2009) Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. *PLoS Biol* **7**, e1000222.
- Gilbert S.F. (2010) *Developmental biology*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Giraldez A. (2010) microRNAs, the cell's Nepenthe: clearing the past during the maternal-to-zygotic transition and cellular reprogramming. *Curr Opin Genet Dev* **20**, 369-444.
- Giraldez A.J., Mishima Y., Rihel J., Grocock R.J., Van Dongen S., Inoue K., Enright A.J. & Schier A.F. (2006) Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* **312**, 75-9.
- Grosshans J., Muller H.A. & Wieschaus E. (2003) Control of cleavage cycles in *Drosophila* embryos by *fruhstart*. *Dev Cell* **5**, 285-94.
- Guo H., Ingolia N.T., Weissman J.S. & Bartel D.P. (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835-40.
- Hilgers V., Bushati N. & Cohen S.M. (2010) *Drosophila* microRNAs 263a/b confer robustness during development by protecting nascent sense organs from apoptosis. *PLoS Biol* **8**, e1000396.

- Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **443**, 931-49.
- Horner V. & Wolfner M. (2008) Transitioning from egg to embryo: triggers and mechanisms of egg activation. *Dev Dyn* **237**, 527-71.
- Horner V.L., Czank A., Jang J.K., Singh N., Williams B.C., Puro J., Kubli E., Hanes S.D., McKim K.S., Wolfner M.F. & Goldberg M.L. (2006) The *Drosophila* calcipressin sarah is required for several aspects of egg activation. *Curr Biol* **16**, 1441-6.
- Hsiao-Lan L., Chung-Yi N., Hsiao-Yun L., Mark M.M., Nikolai K. & Christine R. (2008) The zinc-finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in *Drosophila*. *Nature* **456**.
- Huang D.W., Sherman B.T. & Lempicki R.A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* **4**, 44-57.
- Hussain M., Walker T., O'Neill S.L. & Asgari S. (2013) Blood meal induced microRNA regulates development and immune associated genes in the Dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **43**, 146-52.
- Iovino N., Pane A. & Gaul U. (2009) miR-184 has multiple roles in *Drosophila* female germline development. *Dev Cell* **17**, 123-33.
- Jagadeeswaran G., Zheng Y., Sumathipala N., Jiang H., Arrese E., Soulages J., Zhang W. & Sunkar R. (2010) Deep sequencing of small RNA libraries reveals dynamic regulation of conserved and novel microRNAs and microRNA-stars during silkworm development. *BMC Genomics* **11**, 52.
- Kozomara A. & Griffiths-Jones S. (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* **39**, D152-7.
- Krauchunas A.R., Horner V.L. & Wolfner M.F. (2012) Protein phosphorylation changes reveal new candidates in the regulation of egg activation and early embryogenesis in *D. melanogaster*. *Dev Biol* **370**, 125-34.
- Leah V. & Terry L.O.-W. (2007) The *Drosophila* PNG Kinase Complex Regulates the Translation of Cyclin B. *Dev Cell* **12**.
- Leaman D., Chen P.Y., Fak J., Yalcin A., Pearce M., Unnerstall U., Marks D.S., Sander C., Tuschl T. & Gaul U. (2007) Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in *Drosophila* development (Reprinted from *Cell*, vol 121, pg 1097-1108, 2005). *Cell* **131**, 89-101.
- Li H. & Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754-60.
- Li J., Fang Y., Zhang L. & Begna D. (2011) Honeybee (*Apis mellifera* ligustica) drone embryo proteomes. *J Insect Physiol* **57**, 372-84.
- Liang H.L., Nien C.Y., Liu H.Y., Metzstein M.M., Kirov N. & Rushlow C. (2008) The zinc-finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in *Drosophila*. *Nature* **456**, 400-3.
- Lim S.L., Tsend-Ayush E., Kortschak R.D., Jacob R., Ricciardelli C., Oehler M.K. & Grutzner F. (2013) Conservation and Expression of piRNA Pathway Genes in Male and Female Adult Gonad of Amniotes. *Biol Reprod*.
- 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 Molecular Biology* **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**, 519-23.
- Liu W.M., Pang R.T., Chiu P.C., Wong B.P., Lao K., Lee K.F. & Yeung W.S. (2012c) Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 490-4.
- Lucas K. & Raikhel A.S. (2013) Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions. *Insect Biochem Mol Biol* **43**, 24-38.
- Martin M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMB net journal* **17**, 10-2.
- Mcknight S.L. & Miller O.L. (1976) Ultrastructural Patterns of Rna-Synthesis during Early Embryogenesis of *Drosophila-Melanogaster*. *Cell* **8**, 305-19.
- Mishima Y., Giraldez A.J., Takeda Y., Fujiwara T., Sakamoto H., Schier A.F. & Inoue K. (2006) Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr Biol* **16**, 2135-42.
- Mittwoch U. (1978) Parthenogenesis. *J Med Genet* **15**, 165-81.
- Mortazavi A., Williams B., McCue K., Schaeffer L. & Wold B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* **5**, 621-9.

- Nakahara K., Kim K., Sciulli C., Dowd S.R., Minden J.S. & Carthew R.W. (2005) Targets of microRNA regulation in the *Drosophila* oocyte proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12023-8.
- Nelson J.A. (1915) *Embryology of the Honey bee*.
- Nien C.Y., Liang H.L., Butcher S., Sun Y., Fu S., Gocha T., Kirov N., Manak J.R. & Rushlow C. (2011) Temporal coordination of gene networks by Zelda in the early *Drosophila* embryo. *PLoS Genet* **7**, e1002339.
- Orkin S. (1990) Molecular-Cloning - a Laboratory Manual, 2nd Edition - Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. *Nature* **343**, 604-5.
- Osborne P. & Dearden P.K. (2005a) Non-radioactive in-situ hybridisation to honeybee embryos and ovaries. *Apidologie* **36**, 113-8.
- Osborne P.W. & Dearden P.K. (2005b) Expression of Pax group III genes in the honeybee (*Apis mellifera*). *Dev Genes Evol* **215**, 499-508.
- Pearson J.C., Watson J.D. & Crews S.T. (2012) *Drosophila melanogaster* Zelda and Single-minded collaborate to regulate an evolutionarily dynamic CNS midline cell enhancer. *Dev Biol* **366**, 420-32.
- Pilot F. (2006) Developmental control of nuclear morphogenesis and anchoring by charleston, identified in a functional genomic screen of *Drosophila* cellularisation. *Development* **133**.
- Rachinsky A., Strambi C., Strambi A. & Hartfelder K. (1990) Caste and Metamorphosis - Hemolymph Titers of Juvenile-Hormone and Ecdysteroids in Last Instar Honeybee Larvae. *General and Comparative Endocrinology* **79**, 31-8.
- Rembold H. (1987) Caste Specific Modulation of Juvenile-Hormone Titers in *Apis-Mellifera*. *Insect Biochemistry* **17**, 1003-6.
- Rothe M., Pehl M., Taubert H. & Jackle H. (1992) Loss of Gene-Function through Rapid Mitotic-Cycles in the *Drosophila* Embryo. *Nature* **359**, 156-9.
- Rouget C., Papin C., Boueux A., Meunier A.C., Franco B., Robine N., Lai E.C., Pelisson A. & Simonelig M. (2010) Maternal mRNA deadenylation and decay by the piRNA pathway in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **467**, 1128-32.
- Rozen S. & Skaletsky H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**, 365-86.
- Rubio M., de Horna A. & Belles X. (2012) MicroRNAs in metamorphic and non-metamorphic transitions in hemimetabolous insect metamorphosis. *BMC Genomics* **13**, 386.
- Ruby J.G., Jan C.H. & Bartel D.P. (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* **448**, 83-6.
- Sasaki K. & Obara Y. (2002) Egg activation and timing of sperm acceptance by an egg in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* **49**, 234-40.
- Sato K., Nishida K.M., Shibuya A., Siomi M.C. & Siomi H. (2011) Maelstrom coordinates microtubule organization during *Drosophila* oogenesis through interaction with components of the MTOC. *Genes Dev* **25**, 2361-73.
- Schier A.F. (2007) The Maternal-Zygotic Transition: Death and Birth of RNAs. *Science* **316**.
- Schier A.F. & Giraldez A.J. (2006) MicroRNA function and mechanism: insights from zebra fish. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**, 195-203.
- Schonbaum C.P., Perrino J.J. & Mahowald A.P. (2000) Regulation of the vitellogenin receptor during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 511-21.
- Semotok J.L. & Lipshitz H.D. (2007) Regulation and function of maternal mRNA destabilization during early *Drosophila* development. *Differentiation* **75**, 482-506.
- Sempere L., Sokol N., Dubrovsky E., Berger E. & Ambros V. (2003) Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity. *Dev Biol* **259**, 9-27.
- Shen-Orr S.S., Pilpel Y. & Hunter C.P. (2010) Composition and regulation of maternal and zygotic transcriptomes reflects species-specific reproductive mode. *Genome Biol* **11**, R58.
- Shermoe A.W. & Ofarrell P.H. (1991) Progression of the Cell-Cycle through Mitosis Leads to Abortion of Nascent Transcripts. *Cell* **67**, 303-10.
- Siddiqui N.U., Li X., Luo H., Karauskakis A., Hou H., Kislinger T., Westwood J.T., Morris Q. & Lipshitz H.D. (2012) Genome-wide analysis of the maternal-to-zygotic transition in *Drosophila* primordial germ cells. *Genome Biol* **13**, R11.
- Snodgrass R. (1984) *Anatomy of the honey bee*.
- Somel M., Guo S., Fu N., Yan Z., Hu H.Y., Xu Y., Yuan Y., Ning Z., Hu Y., Menzel C., Hu H., Lachmann M., Zeng R., Chen W. & Khaitovich P. (2010) MicroRNA, mRNA, and protein expression link development and aging in human and macaque brain. *Genome Res* **20**, 1207-18.

- Soni K., Choudhary A., Patowary A., Singh A.R., Bhatia S., Sivasubbu S., Chandrasekaran S. & Pillai B. (2013) miR-34 is maternally inherited in *Drosophila melanogaster* and *Danio rerio*. *Nucleic Acids Res* **41**, 4470-80.
- Stark A., Brennecke J., Russell R. & Cohen S. (2003) Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol* **1**.
- Stetina J.R.V. & Orr-Weaver T.L. (2011) Developmental Control of Oocyte Maturation and Egg Activation in Metazoan Models. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
- Stitzel M.L. & Seydoux G. (2007) Regulation of the oocyte-to-zygote transition. *Science* **316**, 407-8.
- Sung H.W., Spangenberg S., Vogt N. & Grosshans J. (2013) Number of nuclear divisions in the *Drosophila* blastoderm controlled by onset of zygotic transcription. *Curr Biol* **23**, 133-8.
- Tadros W., Goldman A.L., Babak T., Menzies F., Vardy L., Orr-Weaver T., Hughes T.R., Westwood J.T., Smibert C.A. & Lipshitz H.D. (2007a) SMAUG is a major regulator of maternal mRNA destabilization in *Drosophila* and its translation is activated by the PAN GU kinase. *Dev Cell* **12**, 143-55.
- Tadros W. & Lipshitz H.D. (2009a) The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* **136**, 3033-42.
- Tadros W. & Lipshitz H.D. (2009b) The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* **136**.
- Tadros W., Westwood J.T. & Lipshitz H.D. (2007b) The Mother-to-Child Transition. *Dev Cell* **12**.
- Takeo S., Tsuda M., Akahori S., Matsuo T. & Aigaki T. (2006) The calcineurin regulator *sra* plays an essential role in female meiosis in *Drosophila*. *Curr Biol* **16**, 1435-75.
- ten Bosch J.R., Benavides J.A. & Cline T.W. (2006) The TAGteam DNA motif controls the timing of *Drosophila* pre-blastoderm transcription. *Development* **133**, 1967-77.
- Thomsen S., Anders S., Janga S., Huber W. & Alonso C. (2010) Genome-wide analysis of mRNA decay patterns during early *Drosophila* development. *Genome Biol* **11**.
- Tucker K. (1958) Automictic parthenogenesis in the honey bee. *Genetics*.
- Van Oystaeyen A., Oliveira R.C., Holman L., van Zweden J.S., Romero C., Oi C.A., d'Ettorre P., Khalesi M., Billen J., Wackers F., Millar J.G. & Wenseleers T. (2014) Conserved class of queen pheromones stops social insect workers from reproducing. *Science* **343**, 287-90.
- Vieira S. (2008) *Introdução a Bioestatística*. .
- Wang J., Garrey J. & Davis R.E. (2013) Transcription in Pronuclei and One- to Four-Cell Embryos Drives Early Development in a Nematode. *Curr Biol*.
- Wang L., Feng Z., Wang X., Wang X. & Zhang X. (2010) DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics* **26**, 136-8.
- Wang X., Liu P., Zhu H., Xu Y., Ma C., Dai X., Huang L., Liu Y., Zhang L. & Qin C. (2009) miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits *bcl2* translation. *Brain Res Bull* **80**, 268-73.
- Wilson M.J., Abbott H. & Dearden P.K. (2011) The evolution of oocyte patterning in insects: multiple cell-signaling pathways are active during honeybee oogenesis and are likely to play a role in axis patterning. *Evol Dev* **13**, 127-37.
- Wilson M.J. & Dearden P.K. (2008) Evolution of the insect Sox genes. *BMC Evol Biol* **8**, 120.
- Wilson M.J. & Dearden P.K. (2009) Tailless patterning functions are conserved in the honeybee even in the absence of Torso signaling. *Dev Biol* **335**, 276-87.
- Wilson M.J. & Dearden P.K. (2012) Pair-rule gene orthologues have unexpected maternal roles in the honeybee (*Apis mellifera*). *PLoS One* **7**, e46490.
- Wilson M.J., Havler M. & Dearden P.K. (2010a) Giant, Kruppel, and caudal act as gap genes with extensive roles in patterning the honeybee embryo. *Dev Biol* **339**, 200-11.
- Wilson M.J., McKelvey B.H., Heide S. & Dearden P.K. (2010b) Notch signaling does not regulate segmentation in the honeybee, *Apis mellifera*. *Dev Genes Evol* **220**.
- Wolfner M.F. (2009) Battle and ballet: molecular interactions between the sexes in *Drosophila*. *J Hered* **100**, 399-410.
- Xu P.Z., Vernooy S.Y., Guo M. & Hay B.A. (2003) The *Drosophila* MicroRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current Biology* **13**, 790-5.
- Yamaguchi S., Homma K. & Natori S. (1999) A novel egg-derived tyrosine phosphatase, EDTP, that participates in the embryogenesis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Eur J Biochem* **259**, 946-53.
- Zhang W., Edwards A., Fan W., Flemington E.K. & Zhang K. (2012) miRNA-mRNA correlation-network modules in human prostate cancer and the differences between primary and metastatic tumor subtypes. *PLoS One* **7**, e40130.

- Zheng P., Vassena R. & Latham K. (2006) Expression and downregulation of WNT signaling pathway genes in rhesus monkey oocytes and embryos. *Mol Reprod Dev* **73**, 667-77.
- Zhou J., Song S., Cen J., Zhu D., Li D. & Zhang Z. (2012) MicroRNA-375 is downregulated in pancreatic cancer and inhibits cell proliferation in vitro. *Oncol Res* **20**, 197-203.
- Zondag L., Dearden P.K. & Wilson M.J. (2012) Deep sequencing and expression of microRNAs from early honeybee (*Apis mellifera*) embryos reveals a role in regulating early embryonic patterning. *BMC Evol Biol* **12**, 211.

FIGURES AND TABLES

Figure 1: Early embryonic miRNA regulatory network of *A. mellifera*: A). Exclusive miRNA regulatory network from diploid zygotic genes. C) Exclusive miRNA regulatory network from haploid zygotic genes. B and D). Share regulatory network constructed from diploid and haploid zygotic genes, respectively. The pair of miRNA:mRNA are share between diploid and haploid embryos. E). Exclusive miRNA regulatory network from diploid maternal genes. It was found only diploid maternal genes regulated to miRNAs. We show the zygotic, maternal and undefined miRNAs using different

Table 1: The consensus motifs for each class of zygotic genes in each type of embryo, by SCOPE. The PWM and sequence TAGteam with the best of alignment for each motif by STAMP. The PWM and sequence used are in supplementary. The motif of “haploid_class III” were selected because it has less e-value in the alignment by STAMP than other motifs

		SCOPE	STAMP		
		Motif	Coverage	The best alignent (PWM TAGteam)	The best alignent (TAGteam Sequence)
Haploid	Class I		93.4%	YAGGTAG_PWM_BOSCH_2500 (e-value: 3.5322e-01) (Biedler <i>et al.</i> 2012)	TAGteam1 (Bosch <i>et al.</i> 2006) e-value: 3.522e-01
	Class II		100%	YAGGTA_PWM_Renzis_400 (e-value: 6.5191e-01) (Biedler <i>et al.</i> 2012)	TAGteam1 (Bosch <i>et al.</i> 2006) e-value: 7.2878e-01
	Class III		96.7%	YAGGTAG_PWM_BOSCH_2500 (e-value: 6.3209e-02) (Biedler <i>et al.</i> 2012)	TAGteam1 (Bosch <i>et al.</i> 2006) e-value: 6.3209e-02
Diploid	Class I		94.8%	YAGGTAG_PWM_BOSCH_2500 (e-value: 1.9399e-01)(Biedler <i>et al.</i> 2012)	TAGteam1 (Bosch <i>et al.</i> 2006) e-value: 1.9399e-01
	Class II		97.6%	EZG_VBRGGTA_400 (e-value: 4.0286e-01)(Biedler <i>et al.</i> 2012)	TAGteam1 (Bosch <i>et al.</i> 2006) e-value: 64873e-01
	Class III		89.2%	YAGGTA_PWM_Renzis_400 (e-value: 7.7881e-01)(Biedler <i>et al.</i> 2012)	TAGteam1 (Bosch <i>et al.</i> 2006) e-value: 8.3157e-01

Table 2: (A) Comparison of the *A. mellifera* select motif in (B) with *Drosophila* and *Aedes* TAGteam motifs, PWM or sequence, using STAMP. It showing the same e-value in the most of alignment.

A

Motif		Organism	Fonte	Evalue
>EZG_VBRGGTA_400	PWM	<i>Aedes</i>	Biedler, <i>et al</i> 2012	6,32E-02
>YAGGTA_PWM_Renzis_400	PWM	<i>Drosophila</i>	Biedler, <i>et al</i> 2012	6,32E-02
>YAGGTAG_PWM_Bosch_2500	PWM	<i>Drosophila</i>	Biedler, <i>et al</i> 2012	6,32E-02
>TAGteam1	Sequence	<i>Drosophila</i>	Bosch, <i>et al.</i> 2006	6,32E-02
>TAGteam2	Sequence	<i>Drosophila</i>	Bosch, <i>et al.</i> 2006	6,57E-02
>TAGteam3	Sequence	<i>Drosophila</i>	Bosch, <i>et al.</i> 2006	1,21E-01

Zelda (GB52047/*vfl*)

Figure 2: Location and expression of *zelda* (GB52047/vlf) in embryos of *A. mellifera* by *in situ* hybridization. (A) Zelda expression in mature oocyte with stronger staining in the anterior pole. B, C and D: embryo with 2 h of development. It is possible to observe in detail the dividing nuclei, where it is concentrated this gene (C and D). L and M haploid embryos with *zelda* staining throughout his body. The arrow indicates the presence of a sagittal line through the body of the embryo (M). E and F: embryo with 6 h of development showing in detail the expression of *zelda* in cells division. Zelda in the blastoderm embryo (18-24 h) (G), it concentrated in the central region of the embryo. H: shows an embryo at gastrulation (32-38 h) with *zelda* expressing throughout the embryo. Embryo 42-48 h (I and J) and 68-72 h (H) of development, *zelda* seems to be expressed in primordial cells of the nervous system. The * indicates these cells are concentrated in the ventral embryo. N: Profile expression of *zelda* by RNAseq. A, B , G , M , L, E: 200 µm scale, objective 10X, E, J and M: 100 µm scale, objective 20X, C , D and F range of 50 µm 40X objective.

Figure 3: Expression profile in mature oocytes and in haploid and diploid embryos of *A. mellifera*. These genes are candidates for regulation by zelda (GB52047/vlf), selected based in the presence of a motif in their promoter (NNTCCN) that orthologs (Bosch et al, 2006) are regulated by zelda. This genes, those are TAGteam motif, are involved in the dorsal-ventral axis formation, syncytial blastoderm and sex differentiation in *Drosophila*.

Table 3: miRNAs, biological process regulated by them, and classification according to origin, in each type of embryos in *A. mellifera*. Precursors (pri-miRNAs) correspondent of this miRNAs were characterized by in situ hybridization and PCR assay.

	Diploid		Haploid	
	Biological Process Target	Classification	Biological Process Target	Classification
<i>ame-mir-375-3p</i>	Femele gamete generation; oogensese	Zygotic (Class II)	Transition G1/S in mitosis, DNA- dependent; transcription promoters RNAPol RNAPol II and III; transcription of snRNA,Biosynthesis of RNA	Zygotic (Class III)
<i>ame-mir-34-5p</i>		Maternal (class I)	Locating RNA; specification of anteroposterior axis in oocyte; cytoskeleton organization	Zygotic (Class III)
<i>ame-mir-263b-5p</i>	Fosforilation	Zygotic (Class III)	Mitosis; specification the embryonic axis; regionalization; RNA localization, cytoskeleton organization, organization of spindle; gamete formation	Undefined

Figure 4: Expression of pri-ame-mir-375 (A and B: 0-2 h, C and D: 0-6 h), pri-ame-mir-34 (E and F: 0-2 h, G and H: 0-6 h) and pri-ame-mir-263B (I and J 0-2 h, K and L 0-6 h) by *in situ* hybridization and expression by PCR assay (N). (A, B, C, D, E, F, H, J, K and L) The arrows show the presence of pri-miRNA cleavage within the nuclei. (N) The bands on 2% agarose gel indicated that pri-miRNAs are expressed in mature oocytes, the haploid and diploid embryos of 0-2 h and 0-6 h (in cleavage). We use with positive controls *U6*. Real-time PCR assay was procedure to confirm our amplification (data not shown).

Figure 5: Expression profiles of genes encoding proteins involved in miRNA biogenesis. The expression values are given in RPKM by RNAseq analysis of mature oocytes, diploid and haploid embryos of 0-2 h, 0-6 h and 18-24 h of *A. mellifera*.