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

Expressão de Ultrabithorax e o desenvolvimento casta-específico de apêndices

torácicos de Apis mellifera

ANA DURVALINA BOMTORIN

RIBEIRÃO PRETO -2013-

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

Expressão de Ultrabithorax e o desenvolvimento casta-específico de apêndices

torácicos de Apis mellifera

ANA DURVALINA BOMTORIN

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 L. P. Simões

RIBEIRÃO PRETO -2013-

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação do Serviço de Biblioteca – FMRP-USP

BOMTORIN, ANA DURVALINA

Expressão de *Ultrabithorax* e o desenvolvimento casta-específico de apêndices torácicos de *Apis mellifera.*/Ana Durvalina Bomtorin – Ribeirão Preto, 2013.

Tese de Doutorado, apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Genética. 2013.

Orientadora: Zilá Luz Paulino Simões

115p.:28il.

1. Apis mellifera. 2. Hox. 3. Genes diferencialmente expressos. 4.

Folha de Aprovação

Ana Durvalina Bomtorin

Expressão de *Ultrabithorax* e o desenvolvimento casta-específico de apêndices torácicos de *Apis mellifera*.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para Obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Genética

DATA DA DEFESA: __/__/___

Banca Examinadora

Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	

Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades, Muda-se o ser, muda-se a confiança; Todo o Mundo é composto de mudança, Tomando sempre novas qualidades. (...) Do mal ficam as mágoas na lembrança, E do bem, se algum houve, as saudades. (Luís de Camões)

A meus pais, por todo amor...



Agradecimentos

Deixo aqui registrado os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a elaboração deste trabalho. Agradeço:

- À Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões minha orientadora, pela amizade, carinho e paciência ao longo destes anos e também pela oportunidade de poder fazer parte de seu grupo de trabalho;
- Ao Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk, meu co-orientador, pela amizade, paciência e colaboração científica, da qual eu só aprendi coisas boas;
- ✓ Ao Prof. Dr. Claudio R. Alonso, meu orientador no Exterior, durante o "sanduíche" na Universidade de Sussex, por me receber em seu grupo de trabalho, com o qual tive a oportunidade de aprender muito;
- ✓ À Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi e ao Prof. Dr. Klaus Hartfelder pela amizade e discussões científicas sempre muito produtivas para mim;
- Aos Professores Dr. Lionel Segui Gonçalves, Dr. David de Jong,, Dr. Fábio dos Santos Nascimento, Dr. Eduardo A. B. de Almeida, Dr. Carlos A. Garófalo e em especial, ao Dr. Ademilson Espencer Soares (coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética) que completam o grupo de pesquisa com abelhas em Ribeirão Preto;
- Aos técnicos do laboratório, Vera L. C. Figueiredo, Marcela Ap. F. B. Laure, Luis Roberto Aguiar, Rogério A. Pereira e Pedro R. Prado, que são essenciais para o desenvolvimento de todos os trabalhos;
- Ao Departamento de Biologia Celular e Molecular de Bioagentes Patogênicos pelos microscópios confocal e varredura e aos técnicos, José Augusto Maulin and Maria Dolores Seabra Ferreira;
- À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos e ao Prof. Dr. Jackson Antonio Marcondes de Sousa, do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da UNESP (*campus* de Jaboticabal), pela concessão do Scanner de lâminas de *microarrays*;
- ✓ Aos Dr. Alexandre dos Santos Cristino e Dr. Daniel Pinheiro pela ajuda com as análises de bioinformática;
- A todos os colegas e amigos do Laboratório de Ribeirão Preto pela colaboração diária nos trabalhos e amizade (Dra. Érica Tanaka, Dra. Karina Guidugli, Dra. Michelle Prioli, Dra. Lívia M. R. Moda, Dr. Rodrigo D'allaqua, Dr. Francis M. Franco Nunes, MSc. Flávia Cristina, MSc. Tathyana Mello, MSc. Ana Rita Baptistella, MSc. Liliane M. F. Macedo, MSc. Camilla Valente, Tiago Falcon e Natália Hernandes);
- ✓ My friends and labmates from Brighton, thank you very much for being part of my life Dr Stefan Thomsen, Dr Inacio Pueyo, Dr John Cheesbro, MSc Richard Kaschula, MSc Casandra Villava, MSc João Osório, MSc Pedro Patraquim, MSc Elvira Lafuente, MSc Ipek Özdemir, Msc Ali Mumtaz, MSc Unum Amin;

- ✓ Ao Departamento de Genética e ao Programa de Pós–Graduação em Genética pela oportunidade de aprendizado e especialmente às secretárias, Maria Aparecida Oliveira Silva Elias, Susie Adriana Penha Nalon e Silvia Sant'anna Consiglieri.
- ✓ Ao Departamento de Biologia e aos Programas de Pós–Graduação em Biologia Comparada e Entomologia, em especial às secretárias Renata Andrade Cavallari e Vera Lucia Cicilini de Lucca
- ✓ Às agências de fomento, FAPESP e CAPES, pelo apoio financeiro.

Sumário

<u>RESUMO</u>	<u>.</u>
<u>ABSTRACTI</u>	<u> </u>
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	1
1.1. A DIFERENCIAÇÃO MORFOLÓGICA DE OPERÁRIAS E RAINHAS EM ABELHAS	1
1.2. ULTRABITHORAX E A REGULAÇÃO DAS DIFERENÇAS MORFOFISIOLÓGICAS DE RAINHAS E OPERÁRIAS	2
1.3. Do processamento do mRNA de <u>Ubx</u> em Drosophila	4
1.4. A REGULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DOS APÊNDICES TORÁCICOS POR MIRNAS	6
1.5. FORMULAÇÃO DA HIPÓTESE DE TRABALHO	7
2. OBJETIVOS	9
2.1. OBJETIVOS GERAIS	9
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS1</u>	<u>0</u>
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO - OBTENÇÃO DE PERNAS E ASAS DE ABELHAS ADULTAS1	1
3.1.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA1	1
3.1.2. Fotografia em estereomicrocópio1	2
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO - OBTENÇÃO DE ABELHAS, DISCOS IMAGINAIS E PERNAS1	2
3.3. HIBRIDAÇÃO DE LÂMINAS DE MICROARRAYS PARA ANÁLISE DOS PERFIS TRANSCRICIONAIS1	5
3.3.1. HIBRIDAÇÃO DE LÂMINAS DE <u>MICROARRAYS</u> 1	5
3.3.2. Obtenção dos dados das lâminas e análises estatísticas1	8
3.4. Análises computacionais das regiões 5' e 3' dos genes diferencialmente expressos2	0
3.5. MATERIAL BIOLÓGICO - OBTENÇÃO DE ASAS E PERNAS DE PUPAS DE FÊMEAS2	0
3.6. Extração de RNA e síntese do cDNA2	1
3.7. Análises de expressão gênica de Ubx2	1
3.7.1. ANÁLISES POR RT-PCR SEMI-QUANTITATIVA (RT-SQPCR)2	1
3.7.2. Clonagem e sequenciamento2	3
3.7.3. Análises por RT-PCR quantitativa (RT-qPCR)2	3
3.8. Análises de bioinformática da região 3'UTR de <u>Ubx</u> 2	4

3.9. MATERIAL BIOLÓGICO - OBTENÇÃO DE DISCOS IMAGINAIS DE ASAS DE OPERÁRIAS	26
3.10. ANÁLISES DO SEQÜENCIAMENTO DE RNA CURTOS QUANTO AO CONTEÚDO DE MIRNA	26
4. RESULTADOS	<u>28</u>
4.1. Μοργοιοσία δος σαραστέρες εντέρχος δος αρέχορισες τοράσισος δε οδεράριας ε δαινιμάς	าง
4.1. MIORPOLOGIA DOS CARACIERES EXTERNOS DOS APENDICES TORACICOS DE OPERARIAS E RAINHAS	20
4.2. ASSINATURAS DE EXPRESSÃO GENICA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE PERNAS METATORACICAS D	″⊏ ⊃1
	31
4.3. GENES SIMILARES AO GRUPO TRITHORAX (TRX-G) SAO MAIS EXPRESSOS NO INICIO DA DIFERENCIAÇA	0
	38
4.4. O MIR-9A E SEUS ALVOS ESTÃO DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE OPERÁRIAS E RAINHAS	39
4.5. OS GENES DO <u>CLUSTER</u> 1A PODEM SER REGULADOS POR UBX	41
4.6. A TRANSCRIÇÃO DE <u>UBX</u> NOS APÊNDICES TORÁCICOS <u>A. MELLIFERA</u>	47
4.6.1. UBX SOFRE SPLICING ALTERNATIVO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DOS APÊNDICES TORÁCICOS	DE
FÊMEAS DE ABELHAS	47
4.6.2. Da natureza das isoformas de <u>Ubx</u>	48
4.6.3. A transcrição diferencial de <u>Ubx</u> em pupas está relacionada aos apêndices torácicos	5
MORFOLOGICAMENTE DIFERENTES EM OPERÁRIAS E RAINHAS	51
4.7. O uso da região 3'UTR de <u>Ubx</u> durante o desenvolvimento das asas de operárias	54
4.8. A região repetitiva da região 3'UTR de <u>Ubx</u> tem menos sítios de ligação para os miRNAs	56
4.9. Os miRNAs expressos nas asas de operárias	60
4.9.1. DEZ MIRNAS COM SÍTIOS DE LIGAÇÃO PREDITOS EM <u>UBX</u> SÃO EXPRESSOS NAS ASAS DE OPERÁRIAS	j
	62
5. DISCUSSÃO	<u>64</u>
5.1. A REGULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DIFERENCIAL DO PAR DE PERNAS METATORÁCICAS DE	
OPERÁRIAS E RAINHAS	65
5.1.1. A regulação gênica do desenvolvimento de cerdas sensoriais em pernas	
METATORÁCICAS DE OPERÁRIAS	67
5 1 2 Ω CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE AS CASTAS POR UBX	69
5.2 A EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE LIBY ENTRE AS CASTAS ESTÁ ASSOCIADA A ADÊNDICES TORÁCICOS CON	1
ESTRUTURAS CASTA-ESPECÍFICAS	71
5.2.1. SORRE O CONTROLE DO SOLICING ALTERNATIVO DE LIRVEM A MELLIEEDA	, T
5.2.2. SOBRE O USO DA REGIÃO 3'LITR DE LIRY EM ARELHAS	76
	10

<u>6. CONCLUSÕES</u>
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS82
8. ANEXOS
8.1. ANEXO A: AMBIENTE DE ANÁLISE NA PLATAFORMA R PARA OS RESULTADOS DE ANÁLISE AO LONGO DO
DESENVOLVIMENTO DE OPERÁRIAS E RAINHAS89
8.2. Anexo B: Ambiente de análise na plataforma R para os resultados de análise
COMPARANDO-SE O DESENVOLVIMENTO DE PERNAS METATORÁCICAS DE OPERÁRIAS E RAINHAS92
8.3. Anexo C: <u>Cluster</u> 1A – Lista de genes diferencialmente transcritos durante o
desenvolvimento de pernas metatorácicas de operárias e rainhas. Respectivos ortólogos em
DROSOPHILA (DM-ORT), PRESENÇA DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE UBX NO PROMOTOR E VALORES DE EXPRESSÃO
RELATIVA ENTRE AS FASES INDICADAS
<u>9. APÊNDICE96</u>
9.1. APÊNDICE: ARTIGO PUBLICADO DURANTE O DOUTORADO96

Resumo

Bomtorin, AD. Expressão de <u>Ultrabithorax</u> e o desenvolvimento casta-específico de apêndices torácicos de <u>Apis mellifera</u>. 2013. 115pp. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Brasil.

A diferenciação morfo-fisiológica entre rainhas e operárias de Apis mellifera decorre da alimentação recebida durante o desenvolvimento larval. Dentre as diferenças morfológicas entre as duas castas encontram-se estruturas especializadas para a coleta de pólen e própolis, localizadas nas pernas metatorácicas das operárias, ausentes nas pernas de rainhas. Os padrões de expressão de Ultrabithorax (Ubx) durante o desenvolvimento de operárias e rainhas estão associados aos padrões de cerdas das pernas de fêmeas adultas. Pernas mesotorácicas de operárias apresentam estruturas descritas como importantes na coleta de pólen, ausentes em rainhas. Por outro lado, as asas não possuem estruturas casta-específicas. No presente trabalho, análises globais de transcrição gênica por hibridação de lâminas de microarrays a partir de RNA total de pernas metatorácicas de operárias e rainhas em três estágios do desenvolvimento mostram 1952 genes diferencialmente expressos. Discos de pernas metatorácicas de larvas no início do quinto estágio larval, quando comparados aos de estágios mais tardios no desenvolvimento, têm alto níveis de transcritos de ativadores de Ubx, o qual está 25 vezes mais expresso em estágios subseqüentes do desenvolvimento. Buscas por motivos de ligação de fatores de transcrição nos promotores dos grupos de genes diferencialmente expressos revelam que os motivos para ligação de Ubx, Zeste e Twist estão super-representados em um dos conjuntos analisados. Dentro deste grupo, estão presentes genes cujos ortólogos em Drosophila são controlados por Ubx, como o caso do gene lola. Análises do processamento do mRNA de Ubx em pernas e asas de ambas as castas mostram que são produzidas três isoformas diferentes quanto à presença de dois microéxons (m1 and m2), que contêm 42 nt and 53 nt, respectivamente. A isoforma Ila-like, que contém o m2, entretanto, parece não ser capaz de produzir uma proteína Hox, já que possui um códon de terminação antes do homeodomínio. O perfil de transcrição diferencial de Ubx entre as castas está associado a apêndices que apresentam diferenças morfológicas, sendo Ubx mais transcrito em pernas meso e metatorácicas de operárias que rainhas. Quando analisadas as porcentagens de expressão de cada isoforma nos apêndices, claramente a isoforma IVa-like, sem microéxons, é a mais transcrita em todos os tecidos. Entretanto, nota-se que nas asas anteriores, onde há menos Ubx, a isoforma lla-like é proporcionalmente mais transcrita que

nos outros apêndices. Destaca-se uma tendência à inclusão do microéxon m1 (isoforma Illalike) ao mRNA de *Ubx* transcrito em asas posteriores e pernas de rainhas em comparação a operárias, em detrimento da isoforma IVa-like. Análises do uso da região 3'UTR em pupas de operárias mostram que há um microssatélite transcrito na porção distal da região 3'UTR de *Ubx*. A estrutura secundária predita agrupa separadamente as regiões codificadora e as regiões 3'UTR proximal e distal. Análises de seqüenciamento de última geração revelaram que oito dos 51 microRNAs com sítios-alvo preditos na região 3'UTR de *Ubx* estão mais expressos em asas anteriores, e outros dois em asas posteriores. Assim, nossos resultados mostram que o controle da expressão diferencial de *Ubx* é dada pela ativação desse gene por fatores de transcrição que se ligam ao promotor, controle do *splicing* alternativo, e expressão de microRNAs diferencial em cada casta e apêndice, controlando, assim, a morfogênese diferencial dos apêndices de fêmeas observada em *A. mellifera*.

Palavras-chave: *Apis mellifera*; Hox; Genes diferencialmente expressos; microRNA; Castas; Pernas; Asas; Polifenismo.

Abstract

Bomtorin, AD. <u>Ultrabithorax</u> expression and development of caste-specific thoracic appendages in <u>Apis mellifera.</u> 2013. 115pp. Thesis (Doctorate). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Brazil.

Along with differences in physiological and behavioral characteristics, workers and queens of Apis mellifera also differ in appendage morphology. Some appendage specializations in the hind legs of honeybee workers, which are highly specialized pollinators, deserve special attention. The hind tibia of the worker has an expanded bristle-free region used for carrying pollen and propolis, the corbicula. In queens, this structure is absent. Although these morphological differences have been well characterized, the genetic inputs triggering the development of this alternative morphology have remained unknown. Through microarray analysis, we detected 1,952 genes that are differentially expressed during worker versus queen hind leg development. The gene expression signatures of the two castes have similar patterns of genes controlling development. At the beginning of the last larval instar, Ultrabithorax (Ubx) activators are more strongly expressed than in prepupae and early pupae; at this time Ubx expression is approximately 25 times higher. Within the gene expression signature, we identified a cluster formed by genes in which Ubx, Twist and Zeste binding sites are over-represented. This cluster includes genes for which Drosophila orthologs are known to be bound by Ubx, as in the case of *lola*. We also tested the extent of Ubx mRNA processing during wing and leg development. Unexpectedly, we found Ubx alternative splicing in both workers and queens; there were two microexons (m1 and m2) encoding 42 nt and 53 nt, respectively, arguing against the hypothesis that alternative splicing occurs exclusively within the Diptera. Inclusion of the m2 exon inserts a stop codon upstream from the exon containing the homeodomain, producing a truncated protein. Moreover, these bee microexons conserve the nucleotides known to be important for alternative splicing in Drosophila. During bee wing development, Ubx mRNA isoforms are transcribed in similar amounts in both castes; however, during leg development, queens produce 60% of the Ubx levels transcribed by workers. Analysis of 3'UTR usage during bee development revealed a microsatellite region transcribed within the Ubx 3'UTR. The predicted secondary structure locations separated the coding region into three branches and the proximal and the distal 3'UTR regions. Deep-sequencing analysis revealed that eight out of 51 miRNAs predicted to target the Ubx mRNA are more highly expressed in worker forewings and two are more expressed in the hindwings. Therefore, we conclude

that *Ubx* differential expression is activated by transcription factors that bind to its promoter, by control of alternative splicing, and moreover by microRNAs differentially expressed according to tissue and caste, resulting in differential morphogenesis of the hind leg in honeybee females.

Key-words: *Apis mellifera*; Hox; Differentially expressed genes; microRNA; Castes; Leg; Wing; Polyphenism.

1. Introdução

1.1. A diferenciação morfológica de operárias e rainhas em abelhas

A abelha *Apis mellifera* é considerada um dos mais instigantes modelos para estudos de biologia, pelo alto grau de organização de sua sociedade, pela presença das castas e capacidade cognitiva de seus membros. O seqüenciamento de seu genoma abriu novas possibilidades para o entendimento do desenvolvimento diferencial das rainhas e operárias e da origem das características morfológicas e comportamentais que as distinguem.

O sistema de determinação de sexo destas abelhas é haplodiplóide. Neste, as fêmeas (rainhas e operárias) se originam a partir de ovos fecundados (diplóides) e os machos (zangões) de ovos não fecundados (haplóides) [revisado por (Winston 1987)]. As larvas de *A. mellifera* passam por cinco estágios; até o terceiro estágio elas são alimentadas com geléia real, uma dieta de secreções das glândulas hipofaríngeas das operárias nutridoras, que é rica em aminoácidos e açúcares (Michener 1969; Leimar et al. 2012). Das larvas fêmeas, as que darão origem às rainhas recebem esta alimentação durante todo o período larval e as que se desenvolverão em operárias, a partir do terceiro estágio passam a receber uma mistura de mel, pólen e geléia real (Michener 1969).

Apesar de não estar claro como essa informação trófica é interpretada, sabe-se que a alimentação com geléia real de larvas destinadas a serem rainhas induz, por meio de altos níveis de açúcares, o aumento da síntese de Hormônio Juvenil (HJ) pelos *corpora allata* (um par de glândulas localizadas no complexo retrocerebral) (Nijhout and Wheeler 1982; Wheeler 1986; Rachinsky et al. 1990; Leimar et al. 2012).

Inúmeros são os caracteres específicos de cada casta decorrentes da alimentação diferencial oferecida às larvas. O tamanho do corpo e a morfologia do aparelho reprodutor e dos apêndices estão entre aqueles que conferem, também, diferenças comportamentais

entre as castas. O desenvolvimento diferencial do par de pernas metatorácicas (do terceiro segmento torácico) constitui um excelente alvo para análise de expressão gênica diferencial, pois nestes apêndices se localizam estruturas relativas à coleta de pólen e própolis encontradas exclusivamente em operárias (compare operárias e rainhas, respectivamente Figura 1 A e I). Essas estruturas (corbícula, prensa-pólen, pente-de-pólen e escova-de-pólen) se desenvolvem na tíbia e no basitarso das pernas metatorácicas das operárias. O prensa-pólen, o pente e a escova-de-pólen são estruturas formadas por cerdas, que servem para prensar o pólen na corbícula (estrutura característica dos Apidae), a qual é formada por espaço dentre cerdas longas e curvas, na face externa da tíbia, podendo transportar pólen ou própolis (Snodgrass 1956; Michener 1974).

Enquanto os apêndices ventrais torácicos (pernas) apresentam características casta-específicas relacionadas à divisão de trabalho reprodutiva dessas abelhas, os apêndices dorsais torácicos (asas) não possuem estruturas casta-específicas, sendo de maneira geral uma estrutura indiferenciada entre operárias e rainhas (Michener 1974).

1.2. Ultrabithorax e a regulação das diferenças morfofisiológicas de rainhas e operárias

Os genes Hox codificam uma família de fatores de transcrição capazes de iniciar programas diferenciais de desenvolvimento ao longo do eixo ântero-posterior dos animais bilaterais (McGinnis and Krumlauf 1992; Alonso 2002; Pearson et al. 2005). Ao longo da história dos Bilateria, a variação evolutiva na função dos genes Hox é considerada a maior contribuição para a evolução dos programas genéticos (Duboule 1994). Como exemplo disto destaca-se: os halteres de Diptera; as asas membranosas dos Coleoptera; e as asas posteriores de Lepidoptera, todos controlados pela expressão de *Ultrabithorax* (*Ubx*) (Lewis 1978; Weatherbee et al. 1999; Tomoyasu et al. 2005).

O par de pernas mesotorácico nos insetos, também localizado no terceiro segmento torácico, apresenta diferenças morfológicas e funcionais que podem ser observadas tanto em holometábolos guanto em hemimetábolos, e são dependentes da expressão tardia de Ubx (Mahfooz et al. 2007). A expressão diferencial de Ubx é também responsável pela determinação do tipo e número de cerdas e tricomas nas pernas de Drosophila (Stern 1998; Rozowski and Akam 2002). Em A. mellifera, um trabalho prévio desenvolvido durante o meu mestrado e que culminou em uma publicação e gerou as questões para esta tese (veja Apêndice) mostra que a distribuição da proteína Ubx e sua expressão nas diferentes fases do desenvolvimento são coincidentes com o arranjo de cerdas nas pernas metatorácicas dos adultos de cada casta (Figura 1). Neste mesmo trabalho, foi identificado no estágio de pré-pupas conjuntos de genes codificadores de proteínas cuticulares preferencialmente expressos em cada casta, diferentes membros da família P450 em ambas as castas, e genes relacionados ao desenvolvimento de cerdas sensoriais em operárias. Além disso, esses autores mostraram que pupas em início de pigmentação (logo após apólise) já têm as cerdas das pernas formadas, caracterizando pernas metatorácicas de operárias ou rainhas (Bomtorin et al. 2012). Dedej e colaboradores (1998), transferindo larvas de operárias em diferentes fases do desenvolvimento para células de cria de rainhas, demonstraram que a determinação das características das pernas metatorácicas de operárias e rainhas acontece entre o quarto e o início do quinto estágio larval. No entanto, pouco se sabe sobre os genes envolvidos na determinação e diferenciação das características das pernas metatorácicas de operárias e rainhas.



Figura 1: Morfologia e imunolocalização de Ubx nas pernas metatorácicas de operárias e rainhas prépupas e pupas de olho branco. A: Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando os detalhes dos arranjos das cerdas na face externa da tíbia das pernas metatorácicas de operárias; E: Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando os detalhes dos arranjos das cerdas da face interna do basitarso de operárias; B-D e F-H: Ubx é expresso na tíbia e no basitarso de operárias. Alguns grupos de núcleos não expressam Ubx (cabeça de seta) formando um padrão semelhante ao das cerdas em adulto; I e M: Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando os detalhes dos arranjos das cerdas de rainhas; J-L e N-P: Ubx é expresso somente no basitarso de rainhas pré-pupas e pupas de olho branco. Os grupos de núcleos que não expressam Ubx (cabeça de seta) surgem mais tarde (em pupa de olho branco) que em operárias e também formam um padrão similar ao arranjo das cerdas na perna da rainha adulta; Q: Detalhe dos núcleos que não expressam Ubx. Tar: tarso; Btar: basitarso; Tb: tíbia; SEM: Microscopia Eletrônica de Varredura; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole, para marcação de núcleo; Ubx: Anticorpo Anti-Ultrabithorax; Merge: sobreposição das imagens de microscopia confocal; worker: operária; queen: rainha. Barra de escalas originais dos sistemas de microscopia confocal e de varredura. Modificado de (Bomtorin et al. 2012).

1.3. Do processamento do mRNA de Ubx em Drosophila

Em Drosophila, Ubx produz uma família de seis isoformas por processamento alternativo de dois microéxons (ml e mll – 51 nt e 17 aa cada) localizados na região intrônica de aproximadamente 74 kb e um elemento "b" localizado na região 3' do éxon 5', que é alternativamente transcrito (O'Connor et al. 1988; Kornfeld et al. 1989). O mecanismo de *splicing* pelo qual estas isoformas são produzidas é chamado de *resplicing*. O mecanismo de *splicing* mais comum é chamado *exon skipping*, no qual os éxons que não serão incorporados ao mRNA são retirados junto com os íntrons adjacentes, por outro lado o *resplicing* é caracterizado pela a remoção dos íntrons enquanto os microéxons são incorporados ao mRNA e removidos subsequentemente de maneira tecido-específica (Hatton et al. 1998). Recentemente, dois trabalhos mostraram que as isoformas têm habilidades funcionais diferentes durante a embriogênese (Reed et al. 2010) e o desenvolvimento adulto quanto ao resgate do fenótipo dos halteres de mutantes para *Ubx* (de Navas et al. 2011). Dados de expressão gênica e genômica de *D. melanogaster* e espécies próximas indicam que os microéxons mI e mII têm sido conservados por mais de 60 milhões de anos (Bomze and Lopez 1994). Por outro lado, dados de mosquitos (*Anopheles gambiae, Aedes aegypti e Culex pipiens*) indicam que somente o microéxon mII está presente (Devenport et al. 2000).

Estudos sobre o processamento da região 3' não-traduzida (UTR) de *Ubx* em *Drosophila* revelam a presença de duas formas (curta e longa) que podem ser associadas a cada isoforma da seqüência codificadora (Kornfeld et al. 1989). Essas formas são controladas temporal e espacialmente durante o desenvolvimento embrionário (Thomsen et al. 2010). Embora o aumento da região 3'UTR permita a alocação de novos sítios-alvo de microRNAs (miRNAs), a acessibilidade de alguns sítios-alvo se torna muito menor na forma longa (Patraquim et al. 2011). Ronshaugen e outros (Ronshaugen et al. 2005) mostraram que *Ubx* é diretamente regulado pelos miRNAs iab-4/iab-8 durante o desenvolvimento dos apêndices dorsais torácicos.

Apesar dos variados mecanismos de processamento do mRNA conhecidos em *Drosophila (splicing* alternativo, uso da região 3'UTR e controle de degradação do mRNA), pouco se sabe sobre este processo em outras Ordens de insetos. Além disso, todos os

dados disponíveis sobre *Ubx* em outros organismos não incluem os mI ou mII sugerindo a hipótese de que apenas em Diptera *Ubx* sofre *splicing*.

1.4. A regulação do desenvolvimento dos apêndices torácicos por miRNAs

Os miRNAs formam uma classe de pequenos RNAs não-codificadores, de 21-22 nucleotídeos que modulam a expressão gênica após a transcrição em contextos tais como desenvolvimento e processos morfogenéticos (Ambros 2004; Asgari 2012). Os miRNAs têm função pleiotrópica regulando diversos genes dependendo do momento e da localização durante o desenvolvimento (Asgari 2012). Embora a maioria dos estudos baseie-se na ligação dos miRNAs à região 3'UTR dos transcritos, esses pequenos RNAs podem ligar-se à região codificadora e/ou à região 5'UTR dos mRNAs (Bartel 2009; Rigoutsos 2009).

Os miRNAs têm se tornado importantes objetos de estudo sobre o desenvolvimento de insetos. Embora a descoberta do primeiro miRNA seja relativamente recente (Lee et al. 1993), mais de 6000 miRNAs foram descobertos em animais, plantas e vírus e estão depositados numa base de dados comum (www.mirbase.org) (Kozomara and Griffiths-Jones 2011). Diversos trabalhos têm caracterizado a função dos miRNAs em contextos tais como a metamorfose em *Blattella germanica* (Rubio et al. 2012) e desenvolvimento de asas e halteres de *Drosophila melanogaster* (Ronshaugen et al. 2005; Li et al. 2006). Diferentes perfis de transcrição de miRNAs também têm sido associados à plasticidade fenotípica, como por exemplo na diferenciação sexual em *Acyrthosiphon pisum* (Legeai et al. 2010) e entre gafanhotos, *Locusta migratoria*, solitários e gregários (Wei et al. 2009).

Em abelhas, Zondag e colaboradores (Zondag et al. 2012) demonstraram que os miRNAs participam do processo de padronização dos eixos ântero-posterior e dorso-ventral de embriões em estágios iniciais do desenvolvimento. Dentre eles, o miR-9a é expresso em

padrões similares àqueles já caracterizados em *Drosophila* (Zondag et al. 2012). Durante o desenvolvimento adulto, o miR-9a se destaca como um dos diferencialmente expressos entre as castas de abelhas (Weaver et al. 2007). Além de expresso durante o desenvolvimento embrionário, o miR-9a, em *Drosophila*, é repressor do aparecimento de células precursoras de órgãos sensoriais em asas (Li et al. 2006).

Os miRNAs expressos durante o desenvolvimento de discos imaginais de insetos foram apenas caracterizados em asas de borboletas neotropicais *Heliconius melpomene* (Surridge et al. 2011) e em *pool* de discos imaginais de apêndices de *Drosophila* (Ruby et al. 2007). Diversos miRNAs já tiveram a sua função caracterizada durante o desenvolvimento de asas de *Drosophila*, dos quais destacam-se: let-7 (Caygill and Johnston 2008), bantam (Becam et al. 2011), iab-4 (Ronshaugen et al. 2005), miR-9a (Li et al. 2006) e miR-92a e miR-92b (Schertel et al. 2012). A expressão ectópica do miRNA iab-4 em halteres de *Drosophila* produz adultos com fenótipos com transformações homeóticas via repressão de *Ubx* (Ronshaugen et al. 2005).

Em abelhas, as asas anteriores e posteriores, apêndices dorsais do segundo e terceiro segmentos torácicos, respectivamente, não diferem entre as castas. Por outro lado, pernas, apêndices ventrais do segundo e terceiro segmentos torácicos, possuem estruturas casta-específicas relacionadas à divisão reprodutiva de trabalho. Desta forma, as asas de abelhas seriam um bom modelo para o estudo comparativo da regulação de *Ubx*.

1.5. Formulação da hipótese de trabalho

Os genes Hox têm reconhecida importância no desenvolvimento e evolução de Bilateria, no entanto, alguns aspectos de sua função e regulação são ainda desconhecidos. Os pontos-chave para solução deste problema são as vias moleculares utilizadas que dirigem os processos morfogenéticos durante o desenvolvimento. Contudo, em insetos

outros que não *D. melanogaster*, pouco se conhece sobre a identidade dos reguladores prée pós-transcricionais dos genes Hox, dos genes alvos dos genes Hox e como suas funções são ligadas aos programas morfogenéticos induzidos pelos mesmos. A nossa hipótese, com base em dados já apresentados por Bomtorin e colaboradores (2012), é que a expressão diferencial de *Ubx* está associada aos apêndices torácicos que apresentam características casta-específicas em fêmeas adultas de *A. mellifera*.

Para testar essa hipótese, aqui descrevemos morfologicamente os apêndices torácicos dorsais (asas) e ventrais (pernas) de operárias e rainhas de abelhas. Para entender os genes reguladores de estruturas casta-específicas nas pernas metatorácicas de fêmeas de *A. mellifera* e sua relação com os genes Hox foram feitas hibridações de lâminas de *microarrays* construídas segundo informações de *A. mellifera* Genome Assembly, versão 4.0. A seguir, foi empregada uma ferramenta de busca por motivos de ligação de fatores de ligação super-representados nos promotores dos genes diferencialmente expressos. Ainda, testamos se o *splicing* alternativo de *Ubx* é uma característica exclusiva de Diptera. Para isto, analisamos o perfil transcricional de *Ubx* em pernas e asas, caracterizando tecidos nos quais há estruturas casta-específicas (pernas) e tecidos onde diferenças morfológicas estão ausentes (asas). Por fim, foi feita a caracterização da região 3'UTR transcrita em asas de operárias, a predição dos sítios de ligação de miRNAs e a caracterização da expressão de miRNAs nas asas de operárias, especialmente daqueles que possuem sítios de ligação a região 3'UTR de Ubx preditos.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho visa entender a relação entre o gene homeótico *Ubx* e o desenvolvimento de apêndices torácicos de operárias e rainhas de *A. mellifera*.

2.2. Objetivos específicos

✓ Analisar o perfil de transcrição gênica em pernas metatorácicas de rainhas e operárias nos estágios larval, pré-pupal e pupal, utilizando hibridação de lâminas de *microarrays* de oligonucleotídeos;

 ✓ Analisar a região promotora dos genes diferencialmente expressos, na busca por elementos super-representados em grupos de genes;

✓ Analisar o processamento do mRNA de Ubx, quanto à presença de isoformas nas pernas e asas de pupas de rainhas e operárias;

✓ Analisar o perfil de transcrição de Ubx em pernas e asas de pupas de rainhas e operárias;

 ✓ Analisar a região 3'UTR de Ubx nas asas de pupas de operárias e os sítios preditos de ligação de miRNAs;

✓ Analisar os miRNAs expressos em asas de pré-pupas de operárias.

3. Material e métodos

O presente trabalho buscou investigar a relação entre o desenvolvimento dos apêndices de fêmeas de A. mellifera e a regulação da expressão de Ubx durante o desenvolvimento destes tecidos. Ubx é amplamente conhecido por sua função na especificação do terceiro segmento torácico em diversos grupos de insetos. Em abelhas, já mostramos que Ubx é diferencialmente localizado no par de pernas mesotorácicas de operárias e rainhas (Bomtorin et al. 2012). No presente trabalho, descrevemos morfologicamente os apêndices torácicos dorsais e ventrais de operárias e rainhas. Para identificar os genes envolvidos na diferenciação das pernas metatorácicas de operárias e rainhas, fizemos análises de microarrays utilizando discos imaginais de larvas e pré-pupas e pernas de pupas de olho branco. A seguir, procuramos por possíveis sítios de ligação de Ubx no promotor dos genes diferencialmente expressos. Além disso, detectamos, tal como ocorre em Drosophila, diferentes isoformas de Ubx, que neste Diptera tem perfis de transcrição e funções que variam de acordo com o tecido e o tempo de desenvolvimento. Assim, buscamos identificar os perfis de expressão das isoformas de Ubx em asas e pernas de operárias e rainhas de abelhas, sendo que asas caracterizam tecidos sem estruturas casta-específicas. As asas anteriores e as asas posteriores apresentaram as maiores diferenças de níveis de transcritos dentre os tecidos analisados. Estes resultados justificam as análises subseqüentes como uso da região da 3'UTR e dos miRNAs diferencialmente expressos nestes tecidos, buscando entender o controle da regulação pós-transcricional da expressão de Ubx. Os experimentos realizados neste trabalho estão resumidos na Figura 2.



Figura 2: Organograma dos experimentos realizados no presente trabalho.

 Para caracterização morfológica dos apêndices de operárias e rainhas, pernas do segundo e terceiro segmento torácico foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, as asas dos mesmos segmentos foram analisadas com auxílio de estereomicroscópio.

3.1. Material biológico - obtenção de pernas e asas de abelhas adultas

3.1.1. Microscopia eletrônica de varredura

Foram feitas análises morfológicas das pernas do segundo e terceiro segmento torácicos (a partir de agora denominados T2 e T3, respectivamente) de operárias e rainhas recém-emergidas por microscopia eletrônica de varredura. As pernas das abelhas foram dissecadas em solução salina (0,9% de NaCl) esterilizada, transferidas para fixador (glutaraldeído 25% e paraformaldeído 40% em tampão cacodilato 0,1M), onde foram mantidas por 12 horas. Em seguida, foram desidratadas por uma série crescente de etanol (30 a 100%), repetidas duas vezes por 10 minutos cada uma. Os passos correspondentes ao ponto crítico de secagem, banho de ouro, visualização em microscópio eletrônico de varredura Jeol Scanning Eletronmicroscope JSM-6610LV e fotografia foram feitas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

3.1.2. Fotografia em estereomicrocópio

Asas anteriores e posteriores de operárias e rainhas recém-emergidas foram analisadas morfologicamente. As asas das abelhas foram dissecadas em solução salina (0,9% de NaCl) esterilizada, incubadas em glicerol 80% em PBS (4 g NaCl, 0,1 g KCl, 0,72 g Na₂HPO₄, 0,12 g KH₂PO₄, 500 ml de água, pH 7,4) + Triton X-100, 0,5%, montadas em lâminas histológicas, na mesma solução, e fotografadas em Estereomicroscópio Zeiss Discovery V.12.

ii. Para identificação dos genes envolvidos no processo de diferenciação das pernas das fêmeas de *A. mellifera*, lâminas de *microarrays* de oligonucleotídeos foram hibridadas com RNA extraído de diferentes fases do desenvolvimento de rainhas e operárias de *A. mellifera*.

3.2. Material biológico - obtenção de abelhas, discos imaginais e pernas

Operárias e rainhas de abelhas africanizadas em três diferentes fases do desenvolvimento (L5F1, L5PP2 e Pw) foram coletadas para análise. Para a obtenção de larvas e ovos com idades controladas, a rainha foi confinada por um período de 6 horas, para a postura de ovos fecundados. Para a coleta, parte das larvas que eclodiram foi

transferida para células de cria de rainhas, as remanescentes foram levadas de volta às colônias, e criadas como operárias. As fases do desenvolvimento de operárias foram identificadas segundo Michelette e colaboradores (1993) (Tabela 1) e as de rainhas baseando-se nas descrições feitas para abelhas européias segundo Rembold e colaboradores (1980) (Tabela 2).

A dissecção de discos imaginais de pernas metatorácicas e de pernas metatorácicas de operárias e rainhas foi feita em solução salina (0,9% de NaCl) esterilizada. Foram coletadas duplicatas biológicas de discos imaginais de larvas L5F1 (*pool* com 40 a 50 pares), de pré-pupas (10 pares) e pernas de pupas de olho branco (5 pares) de cada casta. As amostras foram incubadas em reagente TRIzol® (Invitrogen) e congelados (-80ºC) até o momento da extração do RNA.

Tabela 1: Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) e pupal (P) de operárias de abelhas *A. mellifera* africanizadas. A duração dos estágios larvais no desenvolvimento preimaginal refere-se às horas após eclosão [modificado de (Michelette and Soares 1993)].

FASE			CARACTERIZAÇÃO	DURAÇÃO (horas)
Ονο			Embriões de 0 a 72 horas	72 (antes da eclosão)
Larva de primeiro estágio (L1)		o	Peso – 0,0001 a 0,0003 g	0-20 (após a eclosão)
Larva de segundo estágio (L2)		0	Peso – 0,0003 a 0,001 g	20-35
Larva de terceiro estágio (L3)		0	Peso – 0,0015 a 0,004 g	35-55
Larva de quarto estágio (L4))	Peso – 0,004 a 0,0248 g	55-80
	Fase de alimentação (F)	1	Peso – 0,029 a 0,06 g	80-95
		2	Peso – 0,06 a 0,11 g	95-105
		3	Peso – 0,11 a 0,16 g	105-115
Larva de	Fase de tecelagem do casulo (S)	1	Célula operculada, larva com intestino cheio	115-130
quinto estágio		2	Célula operculada, larva com intestino semi-cheio	120 145
(L5)		3	Célula operculada, larva com intestino vazio	130-145
	Pré-pupa (PP)	1	Comprimento da tíbia-tarso = 1,4 a 1,99mm	145-160
		2	Comprimento da tíbia-tarso = 2,0 a 2,6mm	160-180
		3	Comprimento da tíbia-tarso > 2,6mm	180-190
Pw			Pupa de olho branco	190-230
Рр			Pupa de olho rosa	230-250
Pdp			Pupa de olho rosa-escuro	250-265
Pb			Pupa de olho marrom	265-305
Pbl			Pupa de olho marrom com pigmentação torácica leve	305-330
Pbm			Pupa de olho marrom com pigmentação torácica intermediária	330-370
Pbd			Pupa de olho marrom com pigmentação torácica forte	370-390

FASE			CARACTERIZAÇÃO
Ονο			Embriões de 0 a 72 horas
Larva de primeiro estágio (L1)			Peso – 0,0001 a 0,00045 g
Larva de segundo estágio (L2)			Peso – 0,00035 a 0,0015 g
Larva de terceiro estágio (L3)			Peso – 0,0013 a 0,007 g
Larva de quarto estágio (L4)		gio	Peso – 0,0038 a 0,044 g
	Fase de	1	Peso – 0,035 a 0,090 g
	alimentação	2	Peso – 0,091 a 0,180 g
	(F)	3	Peso – 0,181 a 0,260 g
Larva de	Fase de tecelagem do casulo (S)	1	Larva com intestino cheio
quinto estágio		2	Larva com intestino semi-cheio
(L5)		3	Larva com intestino vazio
	Pré-pupa (PP)	1	Comprimento da tíbia-tarso = 1,6 a 2,19mm
		2	Comprimento da tíbia-tarso = 2,2 a 2,8mm
	(/	3	Comprimento da tíbia-tarso > 2,9mm
Pw			Pupa de olho branco
Рр			Pupa de olho rosa
Pdp			Pupa de olho rosa-escuro
Pb			Pupa de olho marrom
Pbl			Pupa de olho marrom com pigmentação torácica leve
Pbm			Pupa de olho marrom com pigmentação torácica intermediária
Pbd			Pupa de olho marrom com pigmentação torácica forte

Tabela 2: Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) e pupal (P) de rainhas de abelhas européias, *A. mellifera carnica* [modificado de (Rembold et al. 1980)].

3.3. Hibridação de lâminas de microarrays para análise dos perfis transcricionais

3.3.1. Hibridação de lâminas de microarrays

Para análise da expressão gênica diferencial durante o desenvolvimento de ambas as castas o RNA total foi extraído utilizando-se reagente TRIzol® seguindo o protocolo do fabricante (Invitrogen). Em seguida, o RNA foi purificado utilizando-se o kit RNA Cleanup (RNeasy Mini Kit, QIAGEN) e quantificado em NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Tecnologies) com comprimento de onda igual a 260 nm. Um micrograma de RNA total foi utilizado para a síntese da sonda para hibridação das amostras utilizando o kit Amino Allyl MessageAmp[™] II aRNA Amplification Kit, e seguindo o protocolo do fabricante (Ambion). O desenho experimental estabelecido para análise está representado na Figura 3. Cada seta indica uma combinação de amostras para hibridação de lâminas, sendo que para cada combinação foram feitas quatro réplicas técnicas (2 *dye-swaps*) de duas réplicas biológicas num total de 56 lâminas (sete combinações com oito réplicas cada).



Figura 3: Representação gráfica do modelo estatístico utilizado para análise da expressão gênica diferencial durante o desenvolvimento das pernas de *A. mellifera*. op: operárias; ra: rainha; L5F1: larva no início do 5° estágio; L5PP2: pré-pupas; Pw: pupa de olho branco.

(BeeOligo121106; As lâminas de microarrays University of Illinois; http://www.biotech.uiuc.edu/centers/Keck/Functional_genomics/Honey%20Bee%20Oligo. htm) contém um total de 28.800 spots dos quais 13.440 são seqüências únicas, representativas do genoma de A. mellifera baseados na versão 4.0 do genoma e 2.1 do Official Gene Set, além de ESTs, sequências de patógenos e parasitas de abelhas e outros controles como tampão e spots vazios, todos em réplicas duplas dispostas em 48 quadrantes. Cada um dos oligonucleotídeos é composto por 60-69 mers e foram sintetizados pela Invitrogen (San Diego, CA). A plataforma foi depositada no Gene Expression Omnibus database (GEO, NCBI database) sob o número de acesso GSE34293 (Bomtorin et al. 2012).

Para a hibridação, as lâminas foram preparadas como se segue:

Para fixação dos oligonucleotídeos à lâmina, estas foram inicialmente umedecidas em vapor de água com alto grau de pureza (daqui em diante denominada água milli-Q), secas em bloco térmico por cerca de 5 segundos e colocadas sob luz ultravioleta (6000 x 100 μJ/cm²). Após a fixação, as lâminas foram lavadas para remover o excesso de oligonucleotídeos. A primeira lavagem foi feita agitando-se as lâminas por 2 min em solução de SDS 0,2 %. Então, seguiram-se duas lavagens em água milli-Q e por último em isopropanol, seguidas de 3 min de centrifugação a 2000 rpm.

As lâminas foram incubadas em solução de pré-hibridação a 42 °C por pelo menos uma hora (Solução de pré-hibridação: 10 mL de formamida, 2,5 mL de solução de Denhardt 100X, 16,6 mL de SSC 20X, 0,5 mL de SDS 10% e 0,25 mL de tRNA 10 mg/mL, completando com água milli-Q para o volume final de 50 ml). Depois de retiradas da solução de préhibridação, as lâminas foram lavadas mais duas vezes em água milli-Q, uma em isopropanol e centrifugadas por 3 min a 2000 rpm. As lâminas foram mantidas a temperatura ambiente até o momento da hibridação.

Para a hibridação, 10 µg de RNA marcado (Cy3 e Cy5) foram combinados e 40 µL de solução de hibridação foram adicionados, completando um volume final de 80 µL. Esta mistura foi pré-aquecida a 99 °C por 3 min e mantidos a 55 °C, em banho-maria, até a aplicação sobre as lâminas que foram então colocadas a 55 °C. Após a aplicação da amostra na lâmina, a hibridação foi mantida por, em média, 22 h, a 42 °C.

Para retirar o excesso de solução de hibridação e reduzir o *background*, as lâminas foram lavadas por 2 vezes, por 2 min em cada uma das seguintes soluções: SSC 2X, SDS 0,1% (sendo a primeira destas duas lavagens a 42° C); SSC 0,5X, SDS 0,01%; SSC 2X; SSC 0,1X; água milli-Q e centrifugadas por 2 min a 2000 rpm. Após as lavagens, as lâminas foram mantidas no escuro até o momento de serem escaneadas. O organograma do experimento está resumido na Figura 4.



Figura 4: Organograma do experimento para análise, por *microarrays*, da expressão gênica diferencial durante o desenvolvimento das pernas de rainhas e operárias de *A. mellifera*. GDE: genes diferencialmente expressos. Amostras A e B referem-se a duas amostras biologicamente diferentes a serem comparadas.

3.3.2. Obtenção dos dados das lâminas e análises estatísticas

As lâminas foram escaneadas usando o escaner Axon GenePix 4000B, com 10 μm de resolução, usando iluminação laser operando a 532 ηm e 635 ηm para excitar Cy5 e Cy3, respectivamente. Os dados gerados por cada canal de fluorescência foram coletados e armazenados em arquivo TIFF e foram quantificados usando o pacote contido no próprio aparelho de leitura, por especial concessão da Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos e do Prof Dr. Jackson Antonio Marcondes de Sousa, do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho (UNESP – *campus* de Jaboticabal). As análises estatísticas e normalizações foram feitas utilizando-se a plataforma R64 para Mac (http://www.r-

project.org/) associado ao projeto BioConductor - pacote Limma (Wettenhall and Smyth 2004; Smyth 2005).

Os dados foram pré-processados para a correção do *background* para evitar valores negativos ou intensidades iguais a zero, utilizando o método "*normexp*", adicionando aos valores de *background* corrigidos uma intensidade *offset* de 50. Este método ajusta o *foreground* de acordo com as intensidades de *background* e resulta em intensidades ajustadas positivamente. A normalização *print-tip-loess* foi usada para corrigir os efeitos dos corantes e espaciais dentro dos *arrays*, assim como a normalização de um mesmo canal foi usada para facilitar a comparação entre arrays (Smyth 2005). Depois da normalização foram determinados os log₂ para cada amostra em cada *array*. O valor de *fold-change* de expressão e o erro padrão para cada gene foram calculados usando-se regressão linear dos dados de expressão normalizados. As análises estatísticas foram baseadas em Barchuk e colaboradores (Barchuk et al. 2007). Os parâmetros utilizados nas análises estão descritos nos Anexos A e B.

Os genes diferencialmente expressos entre as castas foram nomeados de acordo com a identidade proposta no GLEAN3-predicted protein sequences (GB) (The Honeybee Genome Sequencing Consortium). Para comparações com outras espécies, foram feitas buscas por ortólogos em D. melanogaster de todos os genes diferencialmente expressos. Os genes diferencialmente expressos foram agrupados, na busca de assinaturas de expressão gênica para os grupos comparados, utilizando-se o programa Cluster 3.0 com os parâmetros de agrupamento hierárquico Distância Euclidiana por (http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm) е visualizado em TreeView (http://jtreeview.sourceforge.net/).

3.4. Análises computacionais das regiões 5' e 3' dos genes diferencialmente expressos

O Dr. Alexandre dos Santos Cristino, colaborando com este projeto, agrupou os dados em clusters, cada um dos 5 clusters encontrados foram analisados na busca por motivos biologicamente relevantes, chamados elementos cis, nas regiões 5' dos genes. O *script* utilizado na descoberta de motivos foi baseado em Macisaac e Fraenkel (MacIsaac and Fraenkel 2006) e Cristino e colaboradores (Cristino et al. 2006). Para estas análises, foram utilizados 1500 pb da região 5' dos genes diferencialmente expressos, ou seja, 1500 pb *upstream* do códon inicial de cada gene. Entretanto, quando uma pauta de leitura aberta (ORF) predita fosse detectada nesta mesma região, os comprimentos de análise foram menores. Os agrupamentos gênicos foram analisados quanto ao enriquecimento da presença de motivos de ligação de fatores de transcrição conhecidos para *Drosophila* (TRANSFAC) (Wingender et al. 2000) e de genes Hox de vertebrados (Bulyk 2003) em relação à distribuição aleatória no genoma como descrito em Barchuk e colaboradores (Barchuk et al. 2007) (p>0,8).

iii. Para estudar o processamento do mRNA de Ubx em abelhas, foram utilizados apêndices dorsais e ventrais (pernas e asas) do segundo e terceiro segmentos torácicos de operárias e rainhas.

3.5. Material biológico - obtenção de asas e pernas de pupas de fêmeas

Pupas de olho branco de operárias e rainhas de abelhas africanizadas foram coletadas para análise do processamento do mRNA de *Ubx* e obtidas como descrito previamente na sessão 3.1. As fases do desenvolvimento de operárias foram identificadas segundo Michelette e Soares (Michelette and Soares 1993) (Tabela 1) e as de rainhas

baseando-se nas descrições feitas para abelhas européias segundo Rembold *et al.* (Rembold et al. 1980) (Tabela 2).

A dissecção dos apêndices de operárias e rainhas foi feita em solução salina (0,9% de NaCl) esterilizada. Foram coletadas triplicatas biológicas de asas do segundo (7-10 pares cada) e terceiro segmento torácico (7-10), pernas do segundo (5-7) e terceiro segmento torácico (5-7) de cada casta. As amostras foram incubadas em reagente TRIzol® (Invitrogen) e congelados em *freezer* (-80°C) até o momento da extração do RNA.

3.6. Extração de RNA e síntese do cDNA

O RNA total foi extraído utilizando-se reagente TRIzol® seguindo o protocolo do fabricante (Invitrogen). A quantificação do RNA foi obtida utilizando-se NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Tecnologies). A qualidade do RNA total extraído foi analisada por gel de agarose 1%. As amostras foram tratadas com DNasel (Invitrogen) seguindo protocolo do fabricante para remover possíveis contaminações com DNA.

A síntese de cDNA foi feita a partir de 3 μ g de RNA total dos apêndices por transcrição reversa utilizando-se SuperScript II Reverse Transcriptase e oligo dT¹²⁻¹⁸ primers de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen).

3.7. Análises de expressão gênica de Ubx

3.7.1. Análises por RT-PCR semi-quantitativa (RT-sqPCR)

Amplificações por RT-sqPCR foram usadas para testar se *Ubx* é processado alternativamente pelo mecanismo de *splicing* e também se há uso de diferentes tamanhos da região 3'UTR durante a diferenciação de apêndices. O gene da *proteína ribossomal-49* (*rp-49*, número de acesso: AF441189) foi utilizado como referência e controle quanto à contaminação com DNA, uma vez que os *primers* expandem uma região de 150 pb entre
dois éxons com um íntron entre eles de 50 pb. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados estão na Tabela 3. Os resultados foram analisados em gel de agarose 2%, tampão SB (2,25 g de ácido bórico, 0,4 g de hidróxido de sódio, 1 l de água), corado com brometo de etídio.

Os primers desenhados para as análises de *splicing* alternativo de *Ubx* expandem uma região de 155 pb compreendendo um éxon de 100 kb. Para testar o uso da região 3'UTR foram desenhados *primers* que estendem ao longo dos sítios preditos de poliadenilação (PAS) (AUUAAA) (Retelska et al. 2006) na região após o *stop* códon na sequência gênica de *Ubx*. O *forward primer* utilizado é específico para uma única região de 20 nt, enquanto o *reverse primer* pode parear em ao menos 6 pontos diferentes nesta região 3'UTR (Figura 5). Amostras de DNA foram utilizadas como controle das RT-sqPCR para análises de uso da 3'UTR. As sequências dos *primers* usados estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3: Lista de primers utilizados para os perfis de expressão de Ubx
--

Primers	Sequência (5'–3')	Tm (°C)
Am_ <i>Ubx</i> -fw	CCCTGGATGGCTATAGCAG	60
Am_ <i>Ubx</i> -rv	GTCAGGCAGAGCGAGTGTG	60
Am3utr.3-rv	GTGTTCACCACGCTCTGGA	58
Am3utr.4-fw	CTGGACGAGAGACTATTCC	58
m1-fw	TTGCTAAGCCACATTGGACA	60
m2-fw	AGATGCGAACGTTGTCGCGGTA	60
Am_rp49-fw	CGTCATATGTTGCCAACTGGT	60
Am_rp49-rv	TTGAGCACGTTCAACAATGG	60



Figura 5: Representação gráfica da região codificadora e 3'UTR do gene *Ubx* em *A. mellifera* e a posição dos primers e dos sítios de poliadenilação (PAS). Em caixas, a região codificadora (isoforma IVa-like); linha cinza, 3'UTR; triângulos invertidos, sítios de poliadenilação (PAS) (AUUAAA); pontas de setas para a direita, *forward primer*; pontas de setas para a esquerda, *reverse primer*.

3.7.2. Clonagem e sequenciamento

Os fragmentos das diferentes isoformas de *Ubx* e o maior fragmento encontrado na amplificação da região 3'UTR foram extraídos do gel de agarose e purificados com o kit QIAquick Gel Extraction Kit seguindo as instruções do fabricante (QIAGEN). Os fragmentos foram ligados ao vetor pGEM-T Easy (Promega) e clonados em células competentes da linhagem de *E. coli* DH5α e selecionados com X-Gal e IPTG. Depois da seleção das colônias brancas, os fragmentos foram confirmados por PCR de colônias. As colônias de interesse foram colocadas em meio de cultivo por 15 h e os plasmídeos extraídos utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit de acordo com o protocolo do fabricante (QIAGEN). Os plasmídeos obtidos foram digeridos com a enzima EcoRI por 1h a 37 °C e analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os plasmídeos de interesse foram seqüenciados utilizando-se DNA Sequencing Kit, BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction – ABI PRISM (Applied Biosystems).

3.7.3. Análises por RT-PCR quantitativa (RT-qPCR)

A análise das isoformas de *Ubx* foi feita por RT-PCR em Tempo Real utilizando-se SYBR® Green, aparelho 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems) e *primers* específicos para cada isoforma (Tabela 3). Para cada tecido, foram analisadas três amostras de cDNA de

apêndices dorsais e ventrais do segundo e terceiro segmento torácicos de operárias e rainhas. A reação de amplificação foi feita utilizando-se 20 µl de volume final, sendo: 10 µl de SYBR® Green PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems); 0,8 µl de cada primer (forward e reverse) de uma solução estoque de 10 pmol; 7,4 µl de água milli-Q autoclavada e uma alíquota de 1 µl de cDNA. O *threshold* e a linha de base foram ajustados automaticamente pelo sistema. O gene da *proteína ribossomal-49 (rp-49*) foi utilizado como gene de referência para controle das análises. Os valores de quantificação relativa foram calculados utilizando-se a metodologia de Δ Ct (Schmittgen and Livak 2008).

A eficiência da reação foi verificada por amplificação utilizando-se diluições seriadas 1:10 de pools de cDNA de discos imaginais de pernas metatorácicas de operárias e rainhas até a concentração de 1:10000. Os valores de *Slope*, fornecidos após a construção de uma curva de regressão linear (valores da curva padrão), foram utilizados para a verificação da eficiência da reação (E) utilizando-se a fórmula E=10^(-1/Slope) -1 (User Bulletin#2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System).

3.8. Análises de bioinformática da região 3'UTR de Ubx

A região genômica (*scaffold*) na qual o gene *Ubx* se encontra foi baixado do genoma de abelhas - Honeybee Genome version 4.0 Official Gene Set (The Honeybee Genome Sequencing Consortium) (Weinstock et al. 2006) e usado para anotação manual na plataforma Artemis (Rutherford et al. 2000). A anotação gênica foi usada para localizar os microéxons na região intrônica, encontrar os PAS preditos na região *downstream* ao *stop* códon, obter a região 3'UTR e desenhar os *primers*.

As sequências obtidas foram alinhadas utilizando a ferramenta *online* ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). As sequências de *Ubx* de outras espécies de Diptera (*D. melanogaster*, *D. ananassea*, *D. virilis*; ml de: *A. gambiae*, *A. aegypti* e *C.*

pipiens) foram obtidas do Flybase (www.flybase.org) e a seqüência de *Ubx* da vespa, *Nasonia vitripennis* do *website* do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas (http://zulu.fmrp.usp.br/beelab).

A estrutura secundaria do transcrito de *Ubx* foi predito por meio da ferramenta *online* RNAFold com parâmetros *default* (http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi) (Hofacker 2003). As regiões codificadoras e 3'UTR preditas (divididas em regiões proximal e repetitivas) foram sobrepostas à figura obtida da predição da estrutura secundária.

O algoritmo Probability of Interaction by Target Accessibility (PITA) (http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html) (Kertesz et al. 2007) foi usado para predição de sítios alvos para miRNAs e acessibilidade do mRNA. As análises foram feitas utilizando os parâmetros *default* do programa. Para acessar as interações entre os miRNAs e o mRNA de *Ubx* foi utilizada uma lista de miRNAs do genoma de abelhas obtida do miRBase v.19 (http://www.mirbase.org/). Como não há ainda evidências experimentais sobre as interações entre a região 3'UTR de *Ubx* e miRNAs em abelhas, os valores de $\Delta\Delta G$ para estas interações foram baseados naqueles utilizados por Patraquim e colaboradores (Patraquim et al. 2011) em um trabalho semelhante com drosofilídeos. Estes autores consideraram os valores de interação entre os miRNAs iab-4/iab-8 e a 3'UTR de *Ubx* ($\Delta\Delta G$ -8) como os menores valores aceitos para interações possivelmente verdadeiras, uma vez que a interação entre este gene e esses miRNAs já foi provada experimentalmente (Ronshaugen et al. 2002; Bender 2008; Stark et al. 2008; Tyler et al. 2008; Thomsen et al. 2010).

 iv. Para identificar os miRNAs expressos durante o desenvolvimento de asas de operárias, os miRNAs de discos imaginais de asas anteriores e metatorácicas de pré-pupas foram seqüenciados utilizando RNA next-generation sequencing.

3.9. Material biológico - obtenção de discos imaginais de asas de operárias

Operárias de abelhas africanizadas em fase de pré-pupa (PP2) foram coletadas para análise (ver Tabela 1). Para a obtenção de larvas, rainhas foram confinadas por um período de 6 horas, para a postura de ovos fecundados. A dissecção dos discos imaginais de asas foi feita em solução salina (0,9% de NaCl) esterilizada. Foram coletados um *pool* de discos imaginais de asas anteriores (T2) e um *pool* de discos imaginais de asas posteriores contendo em média 130 pares de discos imaginais para cada amostra. As amostras foram incubadas em reagente TRIzol® (Invitrogen) e congelados a -80°C até o momento da extração do RNA.

O RNA total foi extraído utilizando-se reagente TRIzol® seguindo o protocolo do fabricante (Invitrogen). Apenas dois terços do RNA total em etanol foram enviados para seqüenciamento na University of North Carolina em Chapel Hill (Estados Unidos), sendo que o restante permaneceu no nosso laboratório. O seqüenciamento foi feito utilizando-se a plataforma Illumina (Genome Analyzer II, Life Sciences) e o kit TruSeq[™] Small RNA Sample preparation (Illumina). Os sequenciamentos foram do tipo single-end.

3.10. Análises do seqüenciamento de RNA curtos quanto ao conteúdo de miRNA

As análises de expressão dos miRNAs foram feitas com o auxílio do Dr. Daniel Guariz Pinheiro. Inicialmente as *reads* (seqüências de 50 nt provenientes do seqüenciamento) idênticas foram agrupadas e contabilizadas, atribuindo o maior valor de qualidade para cada uma das bases. O programa Prinseq-lite versão 0.18.2 (Schmieder and Edwards 2011) foi utilizado para excluir as *reads* de baixa qualidade. As *reads* menores que 15 nucleotídeos não foram consideradas. Em seguida, o programa Cutadapt (Martin 2011) foi utilizado para remover as sequências dos adaptadores. O programa Prinseq foi, então, novamente utilizado com os mesmos parâmetros para remover as *reads* de baixa complexidade. As reads foram alinhadas contra o genoma de *A. mellifera* versão 4.5 com o programa BWA (Li and Durbin 2009). O programa miRDeep2 (versão 0.0.5) (Friedlander et al. 2008) foi usado para quantificar a expressão dos miRNAs nas bibliotecas (asas anteriores e posteriores). Isso foi realizado através da comparação e intersecção entre as coordenadas de mapeamento dos miRNAs (precursor e maduro) no genoma e as coordenadas de mapeamento das *reads* neste mesmo genoma. O programa original foi alterado para contabilizar apenas o número de fragmentos que estão dentro das coordenadas de mapeamento dos miRNAs maduros. Para a avaliação da significância estatística das diferenças observadas entre as bibliotecas foi utilizado o teste proposto por Audic e Claverie (Audic and Claverie 1997), que assume como hipótese nula que as contagens de *reads* do mesmo miRNA nas duas bibliotecas derivam de uma mesma distribuição de Poisson.

4. Resultados

4.1. Morfologia dos caracteres externos dos apêndices torácicos de operárias e rainhas

Para caracterizar morfologicamente os apêndices torácicos de operárias e rainhas, foram feitas preparações para microscopia eletrônica de varredura utilizando-se pernas mesotorácicas das fêmeas de *A. mellifera*. Os apêndices dorsais, as asas, foram montados em glicerol 80% diluído em tampão PBS com 0,05% Triton X-100 e visualizados e fotografados em estereomicroscópio.

Como já descrito por Bomtorin e colaboradores (2012), as pernas metatorácicas de operárias de *A. mellifera* possuem estruturas casta-específicas que são importantes para a coleta de pólen e própolis (veja Figura 1). Durante a coleta de pólen as pernas mesotorácicas das operárias também são importantes para varrer o pólen do corpo e transferí-lo para a escova-de-pólen das pernas metatorácicas (Grout 1949). Entretanto, nenhuma estrutura foi descrita nas pernas mesotorácicas de rainhas.

Nas preparações para microscopia eletrônica de varredura, vemos que as pernas mesotorácicas de rainhas são recobertas por cerdas sem ramificações (Figura 6B, D, F e H) semelhantes àquelas já descritas para as pernas metatorácicas (Bomtorin et al. 2012). Por outro lado, a cutícula da perna mesotorácica da rainha é formada por escamas poligonais assim como as pernas meso e metatorácicas de operárias, diferindo assim das pernas metatorácicas de rainhas [Figura 6G e H; veja Figura 1 para pernas metatorácicas (Bomtorin et al. 2012)]. Em operárias, na face interna do basitarso das pernas mesotorácicas, há uma estrutura formada por cerdas alinhadas (Figura 6A e C) semelhante à escova-de-pólen, presente nas pernas metatorácicas. As cerdas do basitarso de operárias são tais como as cerdas do basitarso de rainhas, mas as cerdas da tíbia de operárias são ramificadas, diferente das rainhas (Figura 6G e H, indicadas por ponta de seta).

Na Figura 7, asas anteriores e posteriores de rainhas e operárias foram arranjadas para comparação. Na Figura 7A e C, observa-se que as asas anteriores de operárias não variam quanto aos padrões de venação e que nas asas posteriores há uma pequena variação na porção mais distal, um início de veia (Figura 7C, indicado por seta). As rainhas, entretanto, variam mais quanto a presença de novas de venações em ambas as asas. Na Figura 7B são mostradas asas anterior e posterior com padrões de venação mais semelhantes às asas de operárias. Na Figura 7D, nota-se duas asas que diferem dos padrões vistos em operárias. A asa anterior tem o início de duas veias na porção mais distal (Figura 7D, indicadas por seta), enquanto na região mais central uma veia não está completa (Figura 7D, indicada por ponta de seta). Na asa posterior, há também o aparecimento de uma nova veia na porção distal (Figura 7D, indicada por seta).

Nossos resultados indicam que os apêndices torácicos ventrais apresentam estruturas casta-específicas, sendo estas diferenças mais pronunciadas em pernas metatorácicas onde se encontra, em operárias, e.g., a corbicula. As diferenças dos apêndices ventrais de operárias e rainhas são caracterizadas pela presença de estruturas formadas por arranjos diferenciais de cerdas, e também ao tipo de cerda ou cutícula. Por outro lado, as asas são muito semelhantes em ambas as castas e não possuem estruturas casta-específicas. Devido a essas características, asas e pernas são modelos ideais para o estudo comparativo da expressão gênica em abelhas.



Figura 6: Microscopia eletrônica de varredura de pernas mesotorácicas de operárias e rainhas recém-emergidas de *A. mellifera*. A: face interna da perna posterior de operária; B: face interna da perna posterior de rainha; C: detalhe da face interna do basitarso de operária com as cerdas alinhadas em um arranjo similar ao da escova-de-pólen; D: detalhe da face interna do basitarso de rainha; E: detalhe da junção entre a tíbia e o basitarso de operária; F: detalhe da junção entre a tíbia e o basitarso de operária; F: detalhe da junção entre a tíbia e o basitarso de operária; F: detalhe da junção entre a tíbia e seta indica cerda ramificada; H: detalhe das cerdas da tíbia da perna mesotorácica de operária. Ponta

de seta indica cerda lisa. Note que a cutícula de ambas é formada por escamas poligonais. Região proximal à esquerda. Cx-Tr: coxa e trocanter; Fm: fêmur; Tb: tíbia; Btar: basitarso; Tar: tarso; e Ptar: pré tarso. Barra de escalas originais do sistema de microscopia de varredura.



Figura 7: Asas anteriores e posteriores de operárias e rainhas de *A. mellifera* fotografadas em estereomicroscópio. A, C: Asas de operárias, mostrando as variações fenotípicas observadas; B, D: Asas de rainhas, mostrando as variações fenotípicas observadas. AA: asa anterior; AP: asa posterior. Região proximal à esquerda. Seta indica início de veia. Ponta de seta indica a venação interrompida. Barra de escalas originais do estereomicroscópio.

4.2. Assinaturas de expressão gênica durante o desenvolvimento de pernas metatorácicas de operárias e rainhas

Para entender a regulação diferencial do desenvolvimento das pernas metatorácicas de abelhas foram hibridadas 56 lâminas correspondentes ao *design* experimental proposto (veja Figura 3). Os dados foram pré-processados para correção do *background* para evitar valores negativos ou intensidades iguais a zero, utilizando o método *normexp*, adicionando aos valores de *background* corrigidos uma intensidade de *offset* de 50. As normalizações dentro de cada lâmina e entre elas foram feitas utilizando *print tip* *loess* para corrigir os efeitos de localização e dos corantes. Na construção das matrizes de análise, foram utilizados como referência os valores de operárias L5F1. Para as análises estatísticas, as réplicas técnicas e biológicas foram separadas. As duplicatas dos *spots* foram corrigidas, perfazendo assim um total de 14400 *spots* a serem analisados. Após as normalizações, o valor de *fold-change* (log₂) e seu erro padrão para cada gene foram calculados utilizando uma regressão linear para a normalização dos dados de expressão. Estatística Bayesiana Empírica foi utilizada nesta análise. O ambiente utilizado nas análises (Anexos A e B) foi baseado em Barchuk e colaboradores (2007) e Bomtorin e colaboradores (2012), que compararam genes diferencialmente expressos no desenvolvimento de operárias e rainhas.

Ao final da análise global, foram obtidos 1952 genes diferencialmente expressos (p<0,001) considerando todas as comparações (OpPP2-OpF1; OpPw-OpF1; OpPw-OpPP2; RaPP2-RaF1; RaPw-RaF1; RaPw-RaPP2; RaPw-OpPw; RaPP2-OpPP2; RaF1-OpF1). Todos os 1952 genes e as comparações OpPP2-OpF1, OpPw-OpF1, OpPw-OpPP2, RaPP2-RaF1, RaPw-RaF1 e RaPw-RaPP2 foram agrupados usando o programa Cluster 3.0, com parâmetros de distância Euclidiana, para um agrupamento hierárquico dos grupos (Anexo Digital A) (Figura 8). O agrupamento por distância Euclidiana agrupa os genes de acordo com os níveis transcricionais destes em cada comparação.

Na Figura 8, nota-se, pelas assinaturas de expressão gênica, que pernas de operárias e rainhas na mesma fase do desenvolvimento expressam os mesmos genes. As maiores diferenças de expresão gênica são vistas quando se comparam diferentes fases do desenvolvimento de cada casta. Além disso, podem ser destacados 5 grupos bem distintos de perfis transcricionais nos quais, mais uma vez, pode ser visto que operárias e rainhas nas mesmas fases do desenvolvimento têm perfis de transcrição muito semelhantes.

Em uma análise utilizando apenas as comparações entre as castas (RaPw-OpPw; RaPP2-OpPP2; RaF1-OpF1), foram encontrados 518 genes diferencialmente expressos (p<0,05), dos quais 375 são genes preditos (Anexo Digital B). Um agrupamento destes genes permite perceber que as maiores diferenças entre castas é de "timing", ou seja, há uma heterocronia no desenvolvimento das pernas metatorácicas de operárias e rainhas que leva ao desenvolvimento de características casta-específicas (Figura 9). Além disso, os genes diferencialmente expressos em discos imaginais de larvas L5F1 (em início de diferenciação entre castas) são agrupados separadamente de pré-pupas e pupas, as quais estão completando a morfogênese. O conjunto de genes que especifica L5F1 é diferente daquele que especifica pré-pupas e pupas.

A Figura 10 mostra as diferenças de expressão ao longo do desenvolvimento de cada casta e a relação (intersecção) entre as amostras analisadas, através do diagrama de Venn. Ao longo do desenvolvimento das castas há menos genes diferencialmente expressos entre pré-pupas e pupas, tanto de operárias quanto de rainhas. Contudo, entre as castas, as menores diferenças, como esperado, são entre operárias e rainhas no início do quinto instar larval (Figura 10C).

Assim, esses resultados sugerem que poucos genes (49) diferencialmente expressos no início do quinto estágio larval culminam na regulação diferencial de outros quase 200 genes que serão responsáveis pela morfogenese diferencial de pernas metatorácicas de operárias e rainhas. Além disso, há uma heterocronia na expressão de determinados genes entre operárias e rainhas, indicando uma regulação diferencial no "timing" da ativação ou repressão. Juntos, esses dados corroboram os dados de expressão gênica ao longo do desenvolvimento que mostram que operárias e rainhas são muito semelhantes ao longo do desenvolvimento.



Figura 8: Assinaturas de expressão, obtidas a partir de hibridação de lâminas de *microarrays*, ao longo do desenvolvimento de pernas metatorácicas de operárias e rainhas de *A. mellifera*. Em cada condição as referências são o segundo nome. A escala de cores representa em verde os genes menos expressos e em vermelho os mais expressos. OpPP2-OpF1, e.g., representam os valores de expressão encontrados em operárias PP2 em relação a operárias L5F1, sendo valores positivos indicativos de maiores níveis de transcritos na primeira. OpF1, operárias L5F1; OpPP2, operárias pré-pupas; OpPw, operárias no estágio de pupa-de-olho-branco; RaF1, rainhas L5F1; RaPP2, rainhas pré-pupas; RaPw, rainhas no estágio de pupa-de-olho-branco.



Figura 9: Assinaturas de expressão, obtidas a partir de hibridação de lâminas de *microarrays*, comparando-se o desenvolvimento das pernas metatorácicas de operárias e rainhas de *A. mellifera*. Em cada condição as referências são o segundo nome. A escala de cores representa em verde os genes menos expressos e em vermelho os mais expressos. RaF1-OpF1, e.g., representam os valores de expressão encontrados em rainhas L5F1 em relação a operárias L5F1, sendo valores positivos indicativos de maiores níveis de transcritos na primeira. OpF1, operárias L5F1; OpPP2, operárias prépupas; OpPw, operárias no estágio de pupa-de-olho-branco; RaF1, rainhas L5F1; RaPP2, rainhas prépupas; RaPw, rainhas no estágio de pupa-de-olho-branco.





Figura 10: Diagramas de Venn dos dados de expressão gênica diferencial durante o desenvolvimento de pernas metatorácicas de operárias e rainhas de *A. mellifera*. A: Genes diferencialmente expressos ao longo do desenvolvimento de pernas mesotorácicas de operárias. B: Genes diferencialmente expressos ao longo do desenvolvimento de pernas mesotorácicas de rainhas. C: Genes diferencialmente expressos ao longo do desenvolvimento de pernas mesotorácicas de operárias e rainhas. OpF1, operárias L5F1; OpPP2, operárias pré-pupas; OpPw, operárias no estágio de pupa-de-olho-branco; RaF1, rainhas L5F1; RaPP2, rainhas pré-pupas; RaPw, rainhas no estágio de pupa-de-olho-branco.

Um dos genes encontrados como diferencialmente expresso nestas análises, *Retinoic and fat acid Binding Protein (RfaBP* – GB11059), já foi análisado em um trabalho anterior feito por nós (veja Apêndice) (Bomtorin et al. 2012). *RfaBP* é mais expresso em pernas de rainhas PP2 do que de operárias e os perfis de expressão são semelhantes àqueles encontrados anteriormente (Figura 11), indicando que nossos dados são coerentes e que os dados obtidos por *microarrays* podem ser confirmados por RT-qPCR mesmo utilizando-se amostras independentes.



Figura 11: Confirmação por RT-PCR em Tempo Real do perfil de expressão do gene *RfaBP* (GB11059) em pernas metatorácicas de operárias e rainhas de abelhas obtido por hibridação de lâminas de *microarrays*. A – dados de expressão gênica obtidos por hibridação de lâminas de *microarrays*; B – dados de RT-PCR em Tempo Real usando três réplicas biológicas de dicos imaginais de operárias e rainhas [modificado de (Bomtorin et al. 2012)].

4.3. Genes similares ao grupo Trithorax (Trx-G) são mais expressos no início da diferenciação das pernas mesotorácicas

As análises dos perfis transcricionais de cada casta indicam que além de genes reguladores do desenvolvimento de segmentos das pernas, quatro genes relacionados a processos epigenéticos foram encontrados mais expressos nos discos das pernas metatorácicas de operárias e rainhas L5F1. Aqui verificamos que ssrp, CBP, dsp1 e pont (Tabela 4) estão mais expressos na fase L5F1 de ambas as castas, sendo que todos têm função de ativação de genes Hox (incluindo Ubx) similares ao Grupo Trithorax (TrxG) (Petruk et al. 2001; Shimojima et al. 2003; Rappailles et al. 2005; Diop et al. 2008). Na Figura 12, os perfis de transcrição indicam os valores de expressão normalizados de prépupa ou pupa de olho branco subtraído dos valores de L5F1 de operárias e rainhas. Valores negativos indicam mais transcritos no estágio L5F1. Ressaltamos também os perfis de expressão relativos às diferenças entre as castas (RaF1-OpF1, RaPP2-OpPP2 e RaPw-OpPw), de maneira que valores negativos indicam mais transcritos em operárias. Apesar de estarem, de forma alternada, um pouco mais expressos em rainhas ou operárias, estas diferenças são muito pequenas e não são estatisticamente significativas. Esses resultados indicam uma possível ativação da transcrição de Ubx e consegüente aumento no nível de transcritos desse gene em estágios subseqüentes (L5S), já mostrado por (Bomtorin et al. 2012).

Tabela 4: Genes relacionados ao Grupo Trithorax ativados em L5F1.

Nome do gene	GB	Símbolo
homolog of mammalian structure-specific recognition protein 1	GB13118	ssrp1
Dorsal switch protein 1	GB19168	dsp1
pontin	GB19570	pont
CREB-binding protein	GB11425	CBP



Figura 12: Perfil de transcrição dos genes do Grupo Trithorax durante o desenvolvimento de pernas metatorácicas de operárias e rainhas de *A. mellifera* obtidos por hibridação de lâminas de *microarrays*. OpPP2-OpF1, e.g., representam os valores de expressão encontrados em operárias PP2 em relação a operárias L5F1, sendo valores positivos indicativos de maiores níveis de transcritos na primeira. OpF1, operárias L5F1; OpPP2, operárias pré-pupas; OpPw, operárias no estágio de pupa-de-olho-branco; RaF1, rainhas L5F1; RaPP2, rainhas pré-pupas; RaPw, rainhas no estágio de pupa-de-olho-branco.

4.4. O miR-9a e seus alvos estão diferencialmente expressos entre operárias e rainhas

Os miRNAs são importantes reguladores da expressão gênica pós-transcricional. Neste trabalho, buscamos identificar os reguladores da expressão gênica durante o desenvolvimento de pernas metatorácicas de operárias e rainhas de abelhas, incluindo fatores de transcrição (já mencionados na sessão 4.3) e miRNA (que será discutido nesta sessão).

Dentre os 518 genes diferencialmente expressos obtidos nas análises comparativas de operárias e rainhas, destacamos o miR-9a, que está mais expresso em pernas metatorácicas de rainhas L5F1 e em operárias Pw. As análises de predição de sítios de ligação de miRNAs nos genes diferencialmente expressos indicam que o miR-9a tem 24 genes alvo expressos ao longo do desenvolvimento de operárias e rainhas. Entretanto, quando comparados os perfis de expressão gênica, apenas 5 genes apresentam perfis de expressão opostos ao miR-9a (Figura 13). Os genes identificados como GB19316, GB15055 e GB15494 não possuem ortólogos com *Drosophila*, os genes GB10078 e GB18118 são ortólogos dos respectivos genes de *Drosophila*, CG14470 e Ih. Os perfis de transcrição do miR-9a e seus alvos caracterizam a heterocronia no desenvolvimento de operárias e rainhas já mencionada anteriormente. Esses resultados indicam o envolvimento de miRNAs na regulação da diferenciação das pernas metatorácicas de fêmeas de *A. mellifera*.



Figura 13: Perfil de transcrição do miR-9a e seus alvos obtidos por hibridação de lâminas de *microarrays*. A: perfil de transcrição do gene GB19316. B: perfil de transcrição do gene GB10078 (CG14470). C: perfil de transcrição do gene GB15055. D: perfil de transcrição do gene GB15494. E: perfil de transcrição do gene GB18118 (Ih). Eixo x: estágios do desenvolvimento. Eixo y: *fold-change* (Log₂). OpF1, operárias L5F1; OpPP2, operárias pré-pupas; OpPw, operárias no estágio de pupa-de-olho-branco; RaF1, rainhas L5F1; RaPP2, rainhas pré-pupas; RaPw, rainhas no estágio de pupa-de-olho-branco.

4.5. Os genes do <u>cluster</u> 1a podem ser regulados por Ubx

Na busca por reguladores da expressão gênica diferencial durante o desenvolvimento de pernas metatorácicas de operárias e rainhas de abelhas, subdividimos os agrupamentos obtidos em busca de sítios de ligação de fatores de transcrição super-representados em cada grupo, da forma que segue. Um dos *clusters* obtido nas análises com Cluster 3.0 e TreeView usando todas as comparações de perfil de expressão foi então subdividido em sete grupos: 1, 1a, 1b, 2, 3, 4 e 5, sendo que o *cluster* 1 contém os *clusters* 1a (Anexo C) e 1b. Estes *subclusters* foram usados para buscas por sítios de ligação de fatores de transcrição super-representados na região promotora (até 1500 *upstream*) dos genes pertencentes a cada grupo (p>0.8). Os resultados obtidos na busca por sítios conhecidos para *Drosophila* [TRANSFAC (Wingender et al. 2000)] e de genes Hox de vertebrados (Bulyk 2003) seguem abaixo na Tabela 5.

Tabela 5: Sítios de ligação de fatores de transcrição encontrados super-representados nos promotores dos genes dos *clusters* dos genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento de pernas metatorácicas de operárias e rainhas, a partir de buscas com TRANSFAC e Bulyk.

Cluster	Fatores de transcrição			
1	Twist, TBP-related factor, Extradenticle			
1a	Twist, Zeste, Ultrabithorax			
1b	TBP-related factor			
2	Tailless			
3	Obox3_3439.1, Obox5_2284.1			
4	Tailless , Knirps			
5	Hoxc13_3127.1			

Destaca-se o *cluster* 1a que tem sítios de ligação de Ubx super-representado em seu grupo de genes. Um gráfico contendo todos os sítios de ligação dos promotores dos genes do *cluster* 1a é apresentado na Figura 15. Os valores de expressão, bem como os ortólogos em *Drosophila* dos genes deste *cluster* 1a estão no Anexo C. Além disso, um novo agrupamento foi feito com cada um destes *clusters* obtidos. Observa-se que os perfis de

expressão dos genes do *cluster* 1a separam operárias e rainhas, enquanto que o reagrupamento dos outros *clusters* aproximam operárias e rainhas das mesmas fases do desenvolvimento (Figura 14). Desta forma, o *cluster* 1a, além de ter um enriquecimento de sítios de ligação de Ubx nos promotores, também parece ser muito importante na diferenciação de castas.



Figura 14: Assinaturas de expressão dos *clusters* 1a e 4 (subgrupos dentro do total de genes diferencialmente expressos), obtidos a partir de hibridação de lâminas de *microarrays*, ao longo do desenvolvimento de pernas metatorácicas de operárias e rainhas de *A. mellifera*. A- cluster 1a; B cluster 4. A escala de cores representa em verde os genes menos expressos e em vermelho os mais expressos.

	3 5						GB10545
	4 2 9 1		30	30			GB10939
			3 43				GB11364
			4				GB11601
		3		4 3 			GB12094
* *		3					GB12585
	333 2 00 0 1 1			30	3		GB12718
						i	GB12721
		30		i	3 3		GB12799
	2		30			3	GB12924
						4	GB13042
4	2 3			30		1	GB13533
		2 I					GB14361
4							G814929
		2		2 2 		4	GB16986
	2 4				3 4		GB17198
	4						GB17693
			3 4				GB18452
				3		2	GB18454
				3	4		GB18664
					2		GB19166
•		4					G819228
		1					

Figura 15: Mapa dos motivos de ligação de fatores de transcrição encontrados no *cluster* 1a dos genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento de pernas metatorácicas de operárias e rainhas. Em linhas as regiões 5' dos genes a partir do códon de início da transcrição até 1500pb *upstream*; caixas genes com os GBs indicados; pinos indicam a posição relativa dos motivos. 2, Twist; 3, Ultrabithorax; 4, Zeste.

Os perfis de transcrição dos genes obtidos por hibridação de lâminas de *microarrays* que contêm sítios para ligação de Ubx do *cluster* 1a foram esquematizados na Figura 16 e Figura 17. Na primeira, nota-se que todos os genes estão regulados positivamente nas pré-pupas e pupas de olho branco das duas castas em relação ao estágio larval. Vale ressaltar que Ubx é altamente expresso em pré-pupas e pupas de fêmeas de abelhas (Bomtorin et al. 2012). Dos genes com sítio de ligação de Ubx, em *Drosophila, longitudinals lacking (lola*) foi descrito como ativado por Ubx (Pavlopoulos and Akam 2011) e estudos de ligação ao promotor mostram que Ubx se liga ao promotor de *lola* e *E75B* entre outros deste *cluster* (Slattery et al. 2011a). Destacamos os perfis de expressão de *lola* e *E75B* (Figura 16B) uma vez que, o primeiro já foi comprovado ser ativado por Ubx e o segundo é um importante gene de resposta a ecdisteróides.



Figura 16: Perfil de transcrição dos genes com sítios de ligação de Ubx durante o desenvolvimento de pernas metatorácicas de operárias e rainhas de *A. mellifera* obtidos por hibridação de lâminas de *microarrays*. A- todos os genes com sítio para ligação de Ubx do *cluster* 1a. B- Em destaque, os genes *E75B* e *lola*. OpPP2-OpF1, e.g., representam os valores de expressão encontrados em operárias PP2 em relação a operárias L5F1, sendo valores positivos indicativos de maiores níveis de transcritos na primeira. OpF1, operárias L5F1; OpPP2, operárias pré-pupas; OpPw, operárias no estágio de pupa-de-olho-branco; RaF1, rainhas L5F1; RaPP2, rainhas pré-pupas; RaPw, rainhas no estágio de pupa-de-olho-branco.

Quando se compara entre as castas, os perfis de transcrição dos genes com sítios de ligação de Ubx, é possível separá-los em 4 grupos (Figura 17). O primeiro contém aqueles mais expressos em operárias nos três estágios do desenvolvimento; o segundo, ativados em operárias L5F1 e em rainhas PP2 e Pw; o terceiro, oposto ao segundo, i.e. ativados em rainhas L5F1 e em operárias pré-pupas e pupas; e por último o quarto grupo, no qual os genes são ativados em operárias L5F1 e PP2 e em rainhas Pw. Destes, nota-se, no segundo grupo, a presença de dois genes relacionados ao desenvolvimento muscular (*Tpn* e *Tm2*).



Figura 17: Perfil de transcrição dos genes com sítios de ligação de Ubx comparando-se o desenvolvimento de pernas metatorácicas de rainhas e operárias de *A. mellifera* obtidos por hibridação de lâminas de *microarrays*. OpPP2-OpF1, e.g., representam os valores de expressão encontrados em operárias PP2 em relação a operárias L5F1, sendo valores positivos indicativos de maiores níveis de transcritos na primeira. OpF1, operárias L5F1; OpPP2, operárias pré-pupas; OpPw, operárias no estágio de pupa-de-olho-branco; RaF1, rainhas L5F1; RaPP2, rainhas pré-pupas; RaPw, rainhas no estágio de pupa-de-olho-branco.

No *cluster* 1a, encontra-se também um enriquecimento de genes relacionados com o desenvolvimento muscular, dos quais dois já foram mencionados acima (*Tpn* e *Tm2*) e possuem perfis de transcrição semelhantes (Figura 18A e B). Observa-se também que todos os genes deste grupo possuem perfis de transcrição similares nas duas castas. Excetuandose *Tm1*, que é menos expresso em pupas que larvas, os outros (*Tpn*, *Tm2*, *Mlc2*, *sqh* e *tmod*) são ativados após a eversão dos discos imaginais, i.e., durante a diferenciação das pernas de operárias e rainhas. Além disso, esses genes são menos expressos em rainhas que operárias L5F1, o oposto ocorre após o início da diferenciação destes apêndices. Embora os valores de expressão diferencial entre as castas não seja significativo para todos os genes deste cluster, o conjunto perfaz um agrupamento que parece ser casta específico. Ubx, que possue motivos de ligação de super-representados nos promotores dos genes deste *cluster*, já foi mostrado diferencialmente localizado nas pernas metatorácicas de operárias e rainhas, suporta a nossa hipótese (Bomtorin et al. 2012).



Figura 18: Perfil de transcrição dos genes de proteínas motoras do *cluster* 1a durante o desenvolvimento de pernas metatorácicas de rainhas e operárias de *A. mellifera* obtidos por hibridação de lâminas de *microarrays*. A- Perfil de transcrição dos genes das proteínas motoras do *cluster* 1a. B- Perfil de transcrição dos genes da *Tropomiosina 2 (Tpn e Tm2)*, os quais tem sítio de ligação de Ubx no promotor. OpPP2-OpF1, e.g., representam os valores de expressão encontrados em operárias PP2 em relação a operárias L5F1, sendo valores positivos indicativos de maiores níveis de transcritos na primeira. OpF1, operárias L5F1; OpPP2, operárias pré-pupas; OpPw, operárias no estágio de pupa-de-olho-branco; RaF1, rainhas L5F1; RaPP2, rainhas pré-pupas; RaPw, rainhas no estágio de pupa-de-olho-branco.

4.6. A transcrição de Ubx nos apêndices torácicos A. mellifera

4.6.1. <u>Ubx</u> sofre <u>splicing</u> alternativo durante o desenvolvimento dos apêndices torácicos de fêmeas de abelhas

Como mostrado anteriormente, a expressão de *Ubx* parece ser muito importante para a diferenciação das pernas metatorácicas de abelhas. Em *Drosophila*, de Navas e colaboradores (2011) demonstraram que as diferentes isoformas de *Ubx* têm potencial diferente no resgate de fenótipo dos halteres de mutantes para *Ubx*. Aqui investigamos se há formas alternativas do mRNA de *Ubx* nos apêndices torácicos de operárias e de rainhas de *A. mellifera*. Como mostrado na sessão 4.1, pernas de operárias e de rainhas possuem estruturas casta-específicas, enquanto asas são muito semelhantes em ambas as castas. Classicamente a expressão de Ubx está ligada ao terceiro segmento torácico. Desta forma, usamos as asas como um controle da expressão diferencial de *Ubx* e a presença de estruturas casta-específicas, bem como tecidos do segundo segmento torácicos os quais deveriam ser nulos quanto a expressão de *Ubx*.

Para investigar se *Ubx* passa por *splicing* alternativo em abelhas, foram feitas RTsqPCR na tentativa de detectar diferentes composições de *amplicons* deste gene. Foram utilizados *primers* específicos para *Ubx* expandindo as regiões entre os dois éxons (ver Figura 5) com *amplicon* de tamanho esperado de 155 pb. Experimentos de RT-sqPCR utilizando-se apêndices do segundo e terceiro segmentos torácicos (asas anteriores e posteriores e pernas meso e metatorácicas) de pupas de olho branco de operárias e rainhas indicaram a existência de duas formas alternativas de *Ubx* (Figura 19). Estas formas alternativas geram dois *amplicons* de tamanhos diferentes, 155 e 200 pares de bases, uma diferença aproximada de 50 pb, e foram nomeadas IVa-like e IIa-like, respectivamente, baseando-se nas isoformas de *Drosophila* (O'Connor et al. 1988).

Nossos resultados mostram que as duas isoformas são expressas nos apêndices do terceiro segmento, em níveis menores nas pernas mesotorácicas e não há níveis detectáveis de *Ubx* em asas anteriores (Figura 19). A isoforma IVa-like é a forma mais abundantemente transcrita em operárias e rainhas Pw (Figura 19). O gene da *proteína ribossomal 49* (*rp-49*) foi usado como controle da reação de RT-sqPCR.



Figura 19: Perfil de transcrição das isoformas de *Ubx* nos apêndices do segundo e terceiro segmentos torácicos de pupas de operárias e rainhas. PMs, perna mesotorácica; PMt, perna metatorácica; AA, asa anterior; AP, asa posterior. Gene de referência: *rp-49*, em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo.

4.6.2. Da natureza das isoformas de Ubx

Para analisar a seqüência de nucleotídeos das isoformas obtidas por RT-sqPCR, os fragmentos foram clonados, digeridos e seqüenciados. Os fragmentos esperados e seus respectivos tamanhos estão representados na Figura 20A. A digestão dos fragmentos IValike produziu os fragmentos esperados nas análises em gel de agarose (não mostrados aqui). Entretanto, a digestão da isoforma IIa-like produziu dois padrões de bandas em gel de agarose (Figura 20B – compare as amostras 3 e 4 no gel). Note que, na amostra 3, o fragmento produzido por digestão é maior que aquele das amostras 4, 5 e 6. Desta forma, as amostras 3 e 4 foram seqüenciadas bem como uma amostra da isoforma IVa-like.



Figura 20: Padrão do fragmento de *Ubx* clonado após digestão das isoformas usando EcoRI. A-Resultado predito para a digestão dos fragmentos de *Ubx* amplificados por RT-sqPCR (1- IVa-like; 2- IIa-like). B- Fragmentos IIa-like digeridos, visualizados em gel de agorose 2%, corado com brometo de etídeo (pista 3-6 – colônias brancas na clonagem). Note que o resultado da amostra 3 é diferente das amostras 4, 5 e 6

A seqüência da isoforma IVa-like confirmou a predição no genoma de *A. mellifera* (*Official Gene Set 2.0* e *3.1*). As seqüências das isoformas IIa-like (amostras 3 e 4) representam duas isoformas distintas. A amostra 4 contém um microéxon de 42 nt (m1) entre os dois éxons de *Ubx* (Figura 21A – Am_m1). Contudo, a seqüência obtida da amostra 3 contém um microéxon de 53 nt (m2) (Figura 21B – Am_m2), diferente do primeiro mencionado com 42 nt. Utilizando-se a plataforma Artemis, foi possível mapear os dois microéxons entre sítios canônicos de *splicing* (5'AG-GT) (Weir and Rice 2004) no íntron de 105 kb de *Ubx*. O m2 está situado *downstream* ao m1 e as regiões intrônicas formadas então, de 5' para 3', são 48, 22.5 e 38.5 kb em tamanho (Figura 21A e D). Depois da anotação gênica, as isoformas foram renomeadas baseadas nas isoformas de *Ubx* produzidas em *D. melanogaster* por *splicing* alternativo, considerando o uso dos microéxons. Assim, a isoforma que contém o m1 será chamada de IIIa-like e a que contém o

O alinhamento das seqüências dos microéxons presentes no genoma de Nasonia vitripennis indicou que somente o m1 é compartilhado entre N. vitripennis e A. mellifera. Am_m1 e Nv_m diferem em apenas 1 nt, na posição +32 (A \rightarrow C). Os microéxons Am_m1 e Am_m2 foram alinhados com as seqüências de microéxons de seis espécies de Diptera (mI e mII de: *D. melanogaster*, *D. ananassea*, *D. virilis*; mI de: *A. gambiae*, *A. aegypti* e *C. pipiens*) e com o microéxon predito para *N. vitripennis* (Figura 21B). As análises revelaram que há uma região de cinco nucleotídeos altamente conservada na região 5' de todos os microéxons descritos para *Ubx* (GTAAG). Nesta mesma região uma seqüência de seis nucleotídeos já foi descrita como um motivo importante para o *resplicing* de *Ubx* de *D. melanogaster* (Hatton et al. 1998). Todos os microéxons de Diptera bem como o Am_m2 possuem este motivo completo, enquanto que Am_m1 e Nv_m apresentam uma mutação na posição +6 (A \rightarrow G).

As predições para as seqüências de proteínas das três isoformas de *Ubx* usando a anotação gênica mostrou que as isoformas IIIa-like (que contém o m1) e IVa-like produzem uma proteína Hox (Figure 21C). Entretanto, a isoforma IIa-like tem um *stop* códon no final do microéxon que deve parar a tradução impedindo a síntese da porção que contém o domínio homeótico. Embora esta isoforma não produza uma proteína Hox, ela transcreve o éxon 3' assim como as outras duas.

Aqui, mostramos que o *splicing* alternativo de Ubx em abelhas produz três isoformas de mRNA, baseado no uso alternativo de dois microéxons localizados na região intrônica do gene *Ubx*. Além disso, uma das isoformas não produz uma proteína homeótica, já que com a inclusão do microéxon m2 há a inserção de um *stop* códon antes do éxon 3', o qual contém o domínio homeótico. Esses microéxons alternativamente utilizados possuem uma região, importante durante o evento de *resplicing*, altamente conservada com os microéxons de Diptera e *N. vitripennis.*



Figura 21: Análises dos microéxons de *Ubx*. A- Representação esquemática da organização dos éxons e microéxons de *Ubx*. A seqüência de cada microéxon encontra-se em destaque (Am_m1 e Am_m2). Íntron em linha; éxon, caixa cinza escuro; microéxon, caixa cinza claro. B- Alinhamento dos microéxons de abelhas, vespas e moscas/mosquitos. Caixa laranja destaca a seqüência importante para o *resplicing*, conservada entre estas espécies (mI e mII de: *D. melanogaster*, *D. ananassea*, *D. virilis*; mI de: *A. gambiae*, *A. aegypti* and *C. pipiens*; m1 and m2 de *A. mellifera* e *N. vitripennis* microéxon predito com base em abelhas). C- Seqüências consenso de Ubx deduzidas com base nas isoformas seqüenciadas. D. Representação gráfica das isoformas de *Ubx* obtidas. Éxons em caixas prestas; microéxons em caixas cinza; números representam tamanho da região intrônica em kb.

4.6.3. A transcrição diferencial de <u>Ubx</u> em pupas está relacionada aos apêndices torácicos

morfologicamente diferentes em operárias e rainhas

Para entender se as diferenças morfológicas nos apêndices dos adultos estão relacionadas à transcrição diferencial de *Ubx*, RT-qPCR foram feitas usando asas e pernas de pupas de operárias e rainhas e *primers* específicos para cada isoforma. Na Figura 22A, observa-se que asas anteriores de operárias e de rainhas não transcrevem *Ubx* enquanto asas posteriores de ambas as castas transcrevem *Ubx* nos mesmos níveis. Por outro lado, pernas mesotorácicas e metatorácicas transcrevem *Ubx* diferencialmente entre operárias e rainhas. As pernas mesotorácicas estão fora do domínio de expressão de *Ubx* já descrito para *Drosophila* e outros insetos e transcrevem *Ubx* em níveis menores que as asas e

pernas do terceiro segmento torácico. Considerando todas as formas de *Ubx* transcrito, asas de operárias e rainhas têm níveis similares de mRNA de *Ubx*, ao passo que, nas pernas meso e metatorácicas, rainhas transcrevem cerca de 40% menos *Ubx* que operárias.

Quando analisadas as porcentagens de expressão de cada isoforma em cada tecido, claramente a isoforma IVa-like, sem microéxons, é a mais transcrita em todos os tecidos. Entretanto, nota-se que nas asas anteriores, onde há menos *Ubx*, a isoforma IIa-like, que não produz uma proteína com homeodomínio, é proporcionalmente mais transcrita que em asas posteriores e pernas (Figura 22B). Destaca-se também uma tendência à inclusão do microéxon m1 ao mRNA de *Ubx* transcrito em pernas e asas posteriores de rainhas em comparação a operárias, ou seja, a isoforma IIIa-like é proporcionalmente mais transcrita em rainhas. Já a isoforma IIa-like é produzida na mesma proporção em ambas as castas nestes tecidos.

No presente trabalho, mostramos que as asas anteriores transcrevem baixos níveis *de Ubx*, enquanto asas posteriores de operárias e rainhas têm o mesmo nível de transcritos de *Ubx*. Nossos resultados mostraram, claramente, uma relação entre a expressão diferencial de *Ubx* em tecidos cuja estrutura adulta apresenta grandes diferenças morfológicas (pernas). Desta forma, nossos resultados suportam a hipótese de que *Ubx* está relacionado à diferenciação de castas em *A. mellifera*. Além disso, as asas anteriores transcrevem mais a isoforma IIa-like (sem homeodomínio) que os outros tecidos, indicando uma regulação na expressão gênica de *Ubx*, diminuindo ainda mais a quantidade de proteína homeótica formada nesses tecidos. Acreditamos que as asas representem um excelente cenário para um modelo da regulação pós-transcricional de *Ubx* em abelhas.



Figura 22: Quantificação relativa por RT-qPCR dos transcritos das isoformas IIa-like, IIIa-like e IVa-like em asas e pernas de operárias e rainhas de *A.mellifera*. As isoformas de *Ubx* foram quantificadas utilizando-se primers específicos para cada uma delas e os níveis de expressão comparados pelo método 2^{-ΔCt}. A: Quantificação total da transcrição das isoformas de *Ubx*. B: Proporções do uso de cada isoforma em cada tecido analisado. opAA, asa anterior de operárias; opAP, asa posterior de operárias; opPMs, perna mesotorácica de operárias; opPMt, perna metatorácica de operárias; raAA, asa anterior de rainhas; raAP, asa posterior de rainhas; raPMs, perna metatorácica de rainhas.

4.7. O uso da região 3'UTR de <u>Ubx</u> durante o desenvolvimento das asas de operárias

O processamento da região 3'UTR é amplamente conhecido como um processo importante durante a vida do mRNA (Lutz and Moreira 2011), sendo alvo de miRNAs que regulam a expressão gênica após a transcrição. Após anotação do gene *Ubx*, a região 3'UTR foi analisada. Em *Drosophila*, a forma longa da região 3'UTR utilizada durante o desenvolvimento tem em torno de 2,4 kb (Thomsen et al. 2010), sendo os sítios de poliadenilação (PAS) aproximadamente conservados em 12 espécies de moscas (Patraquim et al. 2011). Com base nesses dados, foi analisado até 3 kb da região 3' após o *stop* códon do gene *Ubx*, na busca por PAS conservados entre moscas e humanos (Retelska et al. 2006). O sítio consenso de PAS mais comumente usado (AAUAA) não foi encontrado. No entanto, o segundo sítio mais usado (AUUAAA) é predito seis vezes ao longo de uma região 2,7 kb da região putativa da 3'UTR (Figura 23A). Para testar qual PAS é usado durante o desenvolvimento de abelhas, foram desenhados *primers* que estendem ao longo da região 3' (de + 1,6 a 2,5 kb) (Figura 23A).

Experimentos de RT-sqPCR utilizando asas anteriores e posteriores de operárias e DNA como controle positivo da reação indicam que um sítio de PAS localizado próximo a + 2,1 kb é utilizado durante o desenvolvimento de asas posteriores (Figura 23B). Os resultados apresentados na Figura 23B mostram os fragmentos obtidos para as reações de RT-sqPCR, onde podemos ver que o maior *amplicon* para cDNA de asas posteriores está em torno de 560 pb, ao passo que, nas reações utilizando DNA como controle o maior *amplicon* tem 860 pb. O gene da *proteína ribossomal-49 (rp-49*) foi utilizado como referência e controle quanto à contaminação com DNA.

O maior *amplicon* obtido para as reações de RT-sqPCR utilizando cDNA de asas posteriores como molde foi clonado e seqüenciado. A seqüência obtida foi alinhada com o genoma de *A. mellifera* e anotado no gene *Ubx*. Análises de BLAST com esta seqüência

mostraram que a mesma é uma região repetitiva descrita como uma região de microssatélite do genoma de abelhas (GenBank accession number AJ509723.1) (Solignac et al. 2003). Portanto, os resultados aqui apresentados, indicam o uso de uma longa cauda 3'UTR de em torno de 2,1 kb, incluindo uma região microssatélite.



Figura 23:Uso do PAS em asas de pupas de operárias. A- Representação gráfica do gene *Ubx* com os PAS putativos, o quarto representado com uma cauda poliA. Região 5', em barra preta; éxon, caixa cinza escuro; microéxon, caixa cinza; 3'UTR, linha cinza claro; sítios de poliadenilação (PAS) (AUUAAA), triângulos invertidos; *forward primer*, pontas de setas para a direita; *reverse primer*, pontas de setas para a esquerda; números representam o tamanho do íntron e da distância do PAS ao *stop* códon, em mil pares de base (kb); setas e linhas azuis para a esquerda e laranjas para a direita representam o maior *amplicon* utilizando cDNA de asas posteriores e DNA no painel B, respectivamente. B- Perfil de expressão da região 3'UTR de *Ubx* usando asas anteriores e posteriores de operárias, visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 100pb, marcador de 100pb; AA, asa anterior; AP, asa posterior; DNA, DNA extraído de corpo todo de operária adulta.

4.8. A região repetitiva da região 3'UTR de Ubx tem menos sítios de ligação para os miRNAs

A estrutura secundária do mRNA é considerada muito importante na acessibilidade dos miRNAs ao mRNA alvo. Para simular o dobramento do mRNA de *Ubx*, a região 3'UTR de aproximadamente 2,1 kb transcrita em asas posteriores de pupas de operárias (ver sessão 4.7) foi utilizada para a análise com o programa *online* RNAFold. A estrutura secundária de *Ubx* indica que a região repetitiva da 3'UTR se dobra em um ramo separado das regiões *upstream* a ela. Notam-se três grandes ramos formados pela região codificadora (CDS) e regiões proximal e distal da 3'UTR (Figura 24).



Figura 24: Predição da estrutura secundária de *Ubx* usando o programa RNAFold. As diferentes regiões do mRNA foram sobrepostas. CDS, seqüência codificadora; 3'UTR proximal, região proximal da 3'UTR; 3'UTR repetitiva, região distal da 3'UTR, onde se encontram os microssatélites.

A regulação gênica pós-transcricional por miRNAs tem sido amplamente estudada em Biologia do Desenvolvimento. Aqui foram feitas predições de sítios de ligação de miRNAs a região 3'UTR de *Ubx*. Para isso, a região 3'UTR de 2,1 kb foi utilizada para a predição dos sítios-alvo de miRNAs e a acessibilidade do mRNA, utilizando o programa PITA. A acessibilidade do mRNA é dada pelo valor de Δ Gopen. A Figura 25A mostra que a acessibilidade aumenta na região repetitiva da 3'UTR (valores de Δ Gopen mais positivos).

Quanto aos sítios-alvo de miRNA, uma lista de 157 sítios preditos (51 miRNA) foi obtida utilizando-se parâmetros rigorosos ($\Delta\Delta$ G<-8). Embora tenha valores de Δ Gopen maiores, as predições de alvos de miRNAs revelaram que a região repetitiva seria alvo de somente seis miRNAs (Tabela 6) (Figura 25B). O miRNA com mais sítios preditos é o miR-6059 com 15 sítios de ligação preditos ao longo da região 3'UTR de *Ubx* (Figura 26). Esses resultados indicam que a regulação pós-transcricional do mRNA de *Ubx* por miRNAs ocorre na região mais proximal da região 3'UTR.

miRNA	Posição (pb)		
miR-6044-5p	1623		
miR-6046-3p	1799		
miR-6044-5p	1948		
miR-3741-3p	1950		
miR-6046-3p	1953		
miR-6044-5p	2082		

Tabela 6: Sítios de ligação de miRNAs preditos na região de microssatélites na região 3'UTR de Ubx.




Figura 25: Acessibilidade do mRNA e sítios-alvo de miRNAs da região 3'UTR de *Ubx* usando o programa PITA. A- Valores de acessibilidade do RNA (Δ Gopen) no eixo y *versus* o comprimento da região 3'UTR de *Ubx*. Baixos valores de Δ Gopen indicam menor acessibilidade. B- Posição relativa dos sítios-alvo dos miRNAs ao longo da região 3'UTR (números representam a distância dos sítios ao *stop* codon).



Figura 26: Número de sítios preditos de cada miRNA na região 3'UTR de *Ubx* de *A. mellifera* usando o programa PITA. Os valores de $\Delta\Delta G$ utilizados foram baseados em Patraquim *et al.*, (2011), com base em valores preditos para interações reais entre *Ubx* e o miRNA iab-4 ($\Delta\Delta G$ <-8). Os valores acima das barras indicam o número de sítios preditos para o respectivo miRNA.

4.9. Os miRNAs expressos nas asas de operárias

Para identificar os miRNAs expressos durante o desenvolvimento de asas de abelhas, os RNA pequenos de asas anteriores e posteriores de pré-pupas de operárias foram seqüenciados. As asas são um modelo clássico quando se estuda a expressão de *Ubx*; e estão se tornando um bom modelo com relação a função dos miRNAs; além disso em *A. mellifera*, as asas não apresentam diferenças morfológicas entre as castas de abelhas. Diversos autores já mostraram a função dos miRNAs durante o desenvolvimento de asas e halteres, como, por exemplo, a família iab-4/iab-8 que regula a expressão de *Ubx* em *Drosophila* (Ronshaugen et al. 2005). Para comparação, os RNA pequenos de asas e halteres de *Drosophila* em fase equivalente do desenvolvimento também foram seqüenciados, porém não serão mostrados aqui (Richard Kaschula, comunicação pessoal).

As análises mostram 95 miRNAs diferencialmente expressos entre as asas anteriores e posteriores de operárias (p<0,05), dos quais 63 são mais expressos nas asas anteriores (Figura 27). Dentre os 95 miRNAs destacamos: bantam, let-7, iab-4, miR-9a, miR92a e miR92b, os quais já foram descritos nos discos imaginais de *Drosophila* (Ruby et al. 2007; Tennessen and Thummel 2008; Waldron and Newbury 2012). Os resultados de seqüenciamento mostram que muitos miRNAs já descritos como peças-chave no desenvolvimento de asa são expressos de maneira conservada em asas de abelhas.



Figura 27: Expressão diferencial dos miRNAs entre asas anteriores e posteriores de pré-pupas de operárias obtidos por seqüenciamento de última geração. À direita, representados os miRNAs mais expressos em asas anteriores e à esquerda, os miRNAs mais expressos em asas posteriores. Eixo x, valores de *fold-change* (Log₂).

4.9.1. Dez miRNAs com sítios de ligação preditos em <u>Ubx</u> são expressos nas asas de operárias

Devido às semelhanças entre asas de operárias e rainhas, os níveis de expressão de Ubx muito baixos observados em asas anteriores, as maiores proporções da isoforma Ilalike e os mesmos níveis de transcrição de Ubx em asas posteriores de operárias e rainhas, as asas são o modelo ideal para testarmos a redundância na regulação da expressão de Ubx.

Dos 51 miRNAs com sítios-alvo preditos em *Ubx* (ver Seção 4.10.), 10 são diferencialmente expressos entre as asas anteriores e posteriores de operárias. Dentre os 10 miRNAs, oito são mais expressos em asas anteriores, onde há menos transcritos de *Ubx*. Apenas dois miRNAs (miR-6000b-3p e miR-6012-3p) estão mais expressos em asas posteriores (Figura 28). Dentre os miRNAs diferencialmente expressos entre as asas, o miR-210, que tem sítios-alvo preditos na região 3'UTR de drosofilídeos, tem o maior valor de diferença de expressão (valor de *fold-change* = 5).

Os níveis de expressão de *Ubx* são basais nas asas anteriores. Os níveis de transcrição da isoforma que não produz uma proteína contendo o homeodomínio são proporcionalmente maiores nas asas anteriores. Isto sugere uma redundância na regulação da expressão de *Ubx* após a transcrição por miRNAs nos apêndices dorsais do segundo segmento torácico, correspondente domínio de expressão evolutivamente conservado de outro gene Hox, Antenapedia.



Figura 28: Expressão diferencial de miRNAs com sítios preditos na região 3'UTR de *Ubx* em asas anteriores e posteriores de pré-pupas de operárias obtidos por seqüenciamento de última geração. À direita, representados os miRNAs mais expressos em asas anteriores e à esquerda, os miRNAs mais expressos em asas posteriores. Eixo x, valores de *fold-change* (log₂).

5. Discussão

Define-se plasticidade como a habilidade de um organismo alterar seu próprio desenvolvimento em resposta a diferentes condições ambientais (Moczek et al., 2011). Os efeitos ambientais podem originar desde modestos ajustes à taxa de crescimento ou alocação de tecidos, até dramáticas mudanças fenotípicas pelas quais um mesmo genótipo pode originar diferentes fenótipos alternativos (Nijhout, 2003). Apesar do grande interesse dos cientistas pela plasticidade fenotípica, as cascatas gênicas ligando a nutrição, como um dos fatores ambientais determinantes do desenvolvimento diferencial, às diferenças morfológicas nesses organismos alternativos são pouco conhecidas.

As abelhas *A. mellifera* têm como característica marcante a presença de dois morfos, denominado castas, originados da modificação do desenvolvimento morfogenético em resposta a estímulos ambientais. O desenvolvimento de características complexas, como asas e outros apêndices em insetos, é fortemente influenciado pela nutrição e condições da população (Moczek et al. 2011). Em abelhas, as asas de operárias e rainhas não apresentam estruturas casta-específicas, ao passo que as pernas meso e metatorácicas de operárias, que são polinizadores altamente especializados, possuem modificações castaespecíficas para a coleta e o carregamento de pólen. Nas rainhas, essas estruturas estão ausentes. Esses apêndices torácicos de operárias e rainhas foram caracterizados morfologicamente e propomos que a regulação diferencial do gene Hox *Ubx* durante o desenvolvimento desses apêndices esteja relacionado ao desenvolvimento diferencial de estruturas casta-específicas em pernas de operárias. Além disso, propomos um modelo de regulação pré- e pós-transcricional de *Ubx* em *A. mellifera*. 5.1. A regulação do desenvolvimento diferencial do par de pernas metatorácicas de operárias e rainhas

As diferenças morfológicas observadas nas pernas metatorácicas de operárias e rainhas já foi há muito tempo caracterizadas, devido a sua função na divisão de trabalho reprodutivo (Snodgrass 1956). Em um trabalho buscando desvendar o controle genético do desenvolvimento da morfologia diferencial de pernas metatorácicas em adultos (Bomtorin et al. 2012), nosso grupo mostrou que Ubx é diferencialmente localizado em pré-pupas e pupas de operárias e rainhas. Além disso, dados de hibridação de lâminas de *microarrays* comparando-se pernas metatorácicas de operárias e rainhas apenas em estágio de pré-pupas, mostraram que conjuntos de genes codificadores de proteínas cuticulares, membros da família P450, incluindo genes relacionados ao desenvolvimento de cerdas sensoriais estão diferencialmente expressos entre as castas (Bomtorin et al. 2012).

No presente trabalho, foram feitas análises de expressão gênica ao longo do desenvolvimento de pernas metatorácicas de operárias e rainhas, bem como análises de expressão diferencial entre as castas em três estágios do desenvolvimento. Em comparação com o número de genes diferencialmente expressos entre as fases do desenvolvimento, há um número menor de genes diferencialmente expressos entre as castas. Como esperado, pernas de operárias e rainhas em estágios equivalentes do desenvolvimento são muito semelhantes. Esses achados indicam que as diferenças morfológicas observadas nos adultos são devidas a um pequeno número de genes. Uma busca na literatura por função dos genes ortólogos aos diferencialmente expressos mostrou que muitos desses estão envolvidos em proliferação celular, morte celular programada, genes de desenvolvimento de apêndices e controle epigenético tanto do DNA quanto do mRNA.

Uma análise global de expressão gênica diferencial evidenciou que o número de genes diferencialmente expressos entre as castas é menor que o número de genes

diferencialmente expresso ao longo do desenvolvimento de operárias e rainhas. Análises de agrupamentos gênicos mostram que apenas um dos *clusters* (*cluster 1a*) agrupa operárias separadamente de rainhas, e está constituído por genes que têm sítios de ligação de Ubx super-representados (ver Figuras 14 e 15).

Assim como em fêmeas de abelhas a alimentação diferencial determina o desenvolvimento de apêndices em besouros. Os machos de *Ontofagus taurus*, têm ou não chifre dependendo da quantidade de alimento disponível durante o desenvolvimento larval (EMLEN 1994). Esses apêndices dos machos também variam de tamanho de acordo com o crescimento do corpo, sendo que essa variação é dependente dos níveis de HJ em prépupas (Emlen and Nijhout 2001).

Análises em escala genômica mostraram que os perfis de expressão gênica de tecido epitelial do tórax (região dos discos imaginais dos chifres) de pupas de machos com e sem chifres são mais parecidos entre si, do que com fêmeas que não apresentam chifres. Por outro lado, análises da região dos chifres da cabeça mostram que os perfis de expressão de machos sem chifre e fêmeas são mais parecidos entre si do que com machos com chifre. Dentre os genes diferencialmente expressos nas análises supramencionadas, encontram-se genes codificadores de proteínas cuticulares, exonucleases e membros da família P450 (Snell-Rood et al. 2011). Embora esses dados correspondam a uma única janela temporal do desenvolvimento podendo representar apenas uma heterocronia na expressão de alguns genes, estes dados são comparáveis àqueles descritos no presente trabalho como responsáveis pela diferenciação de pernas metatorácicas de fêmeas de abelhas.

5.1.1. A regulação gênica do desenvolvimento de cerdas sensoriais em pernas metatorácicas de operárias

Além do arranjo diferencial de cerdas na tíbia e basitarso que caracterizam as estruturas casta-específicas observadas em pernas de operárias (e.g., corbícula, pente e escova-de-polen), o tipo de cerda observado em cada casta também difere (Bomtorin et al. 2012). Diferente de todos os outros tipos de cerdas presentes em pernas de operárias e rainhas (veja Figuras 1 e 6), a tíbia das pernas metatorácicas de operárias apresenta cerdas que se assemelham a órgãos sensoriais (Ford et al. 1981; Bomtorin et al. 2012).

Essa importante característica diferencial de pernas metatorácicas de operárias e rainhas, i.e., o tipo de cerda presente na tíbia de cada uma, parece ser regulada por Ubx. Durante o desenvolvimento desses apêndices, como já mostrado em um trabalho prévio, é possível ver os núcleos das cerdas alinhados aos pares nas pernas de pré-pupas de operárias, os quais são maiores em pernas de pupas de olho branco. Por outro lado, nas rainhas é possível encontrar esses núcleos organizados aos pares, característicos de cerdas, somente nas pernas de pupas de olho branco, indicando que a diferenciação das cerdas acontece mais tardiamente em rainhas. A expressão diferencial de Ubx está associada a essa diferenciação dos núcleos formando padrões negativos de expressão que se assemelham aos padrões de cerdas observados nas pernas das fêmeas adultas (veja Figura 1) (Ford et al. 1981; Bomtorin et al. 2012).

Em *Drosophila*, a expressão tardia de Ubx durante o desenvolvimento de pernas bloqueia a formação de determinadas cerdas durante o desenvolvimento de órgãos sensoriais (Rozowski and Akam 2002). Mais recentemente, o miR-9a foi descrito como um inibidor da produção de células precursoras de órgãos sensoriais (SOPs) em asas (Li et al. 2006). No presente trabalho encontramos o miR-9a diferencialmente expresso entre as castas. Em discos imaginais das pernas posteriores de fêmeas de *A. mellifera*, o miR-9a é

mais expresso em rainhas nos estágios iniciais da diferenciação desses apêndices (L5F1) e em operárias, apenas em pupas de olho branco. Em adultos, o miR-9a é o que mais se distingue entre as fêmeas, sendo mais expresso em tórax e abdômen de operárias que rainhas (Weaver et al. 2007). Em *Drosophila*, o miR-9a é expresso em células adjacentes às precusoras de células sensoriais, inibindo as células laterais de se diferenciarem em células sensoriais. Mais precisamente, a super-expressão de miR-9a leva à redução do número de SOPs presentes em asas e, congruentemente, a perda da função deste miRNA leva ao aumento do número de SOPs (Li et al. 2006). Esses resultados indicam que a supressão da formação de SOPs em rainhas pode ser dada via o controle deste miR-9a nos estágios iniciais da diferenciação de pernas.

Em Drosophila, o miR-9a controla a formação de SOPs regulando a expressão do gene senseless, o que faz pareando-se diretamente à região 3'UTR deste gene e promovendo a degradação do mRNA (Li et al. 2006). No presente trabalho, foram feitas buscas apenas dos miRNAs preditos como ligantes na região 3'UTR dos genes diferencialmente expressos. Senseless, no entanto, não está diferencialmente expresso entre as castas. Dos alvos preditos para o miR-9a apenas cinco apresentam perfil de transcrição oposto ao deste miRNA. Destes, apenas dois têm ortólogos em Drosophila (CG14470 e Ih), sendo que apenas o gene do Ih (canal iônico cátion-não-seletivo) tem função descrita na literatura. Mutantes Ih apresentam problemas de comportamento, expectativa de vida diminuída e a sensibilidade ao açúcar aumentada, fato importante no desenvolvimento diferencial de abelhas. Ih também foi localizado em neurônios cordotonais do sistema nervoso periférico (Chen and Wang 2012). A expressão de Ih é controlada por Abd-A, sendo ativada durante o desenvolvimento embrionário e reprimida por este mesmo fator de transcrição durante a metamorfose [revisado por (Monier et al.

2007)]. Esses dados reforçam a hipótese de participação do miR-9a regulando o desenvolvimento de órgãos sensoriais nas pernas de operárias e rainhas.

5.1.2. O controle da expressão gênica diferencial entre as castas por Ubx

A expressão dos genes Hox é controlada epigeneticamente, sendo que os genes do *Policomb Group* (PcG) agem como repressores e os do *Trithorax Group* (TrxG), como ativadores. Em *Drosophila*, os produtos protéicos de *ssrp* e *CBP* são descritos como ativadores de *Ubx* ligando-se diretamente ao *bxd* PRE (*bithoraxoid* PRE, região do promotor de *Ubx* de resposta a proteínas do PcG) (Petruk et al. 2001; Shimojima et al. 2003; Petruk et al. 2008). Embora *pont* não seja um gene do grupo TrxG, seu produto protéico se associa a proteínas TrxG ligando-se ao promotor de *Ubx* e ativando a transcrição deste (Diop et al. 2008). Entretanto, *dsp1* pode agir como PcG ou TrxG dependendo do *locus* considerado (Decoville et al. 2001). A atividade de TrxG por *dsp1* tem sido associada aos discos imaginais das pernas do primeiro segmento torácico e à ativação da expressão de *Sex comb reduced* (Rappailles et al. 2005).

Em abelhas, *ssrp*, *dsp1* e *CBP* são mais transcritos em discos imaginais de pernas metatorácicas de larvas no início do quinto estágio do desenvolvimento. Em estágios subseqüentes do desenvolvimento (L5S), os níveis de transcritos de *Ubx* aumentam em torno de 25 vezes em pernas metatorácicas de operárias e rainhas (Bomtorin et al. 2012), o que pode estar associado à ativação por esses genes semelhantes a ou ligantes de TrxG. Esses dados indicam que a regulação da expressão diferencial de *Ubx* ocorre em momentos mais tardios, próximos ao estágio de pré-pupas e não em estágios iniciais da diferenciação de pernas.

Há muito se sabe que Ubx controla o desenvolvimento de músculos no tórax de Drosophila (Fernandes et al. 1994). Estudos mais recentes mostraram que a diferenciação

das células musculares começa no embrião (Rivlin et al. 2001; Dutta et al. 2010) e que *knockout* de *Ubx* diminui o número de células musculares (LaBeau et al. 2009). Slattery e colaboradores (2011b), utilizando a técnica de ChIP-on-Chip em halteres e pernas metatorácicas, mostraram que Ubx se liga ao promotor de duas proteínas motoras *spaghet squash* (*sqh*) e *Tm1*. Especialmente *sqh* foi descrito como importante durante a morfogênese dos discos imaginais de pernas e asas (Edwards and Kiehart 1996). Embora estes dois genes estejam representados no *cluster 1a*, em abelhas, foram encontrados sítios de ligação de Ubx apenas em outros genes de proteínas motoras (*Tm2* e *Tpn*), indicando que pode haver uma regulação direta de Ubx sobre os genes de proteínas musculares em abelhas.

Tpn e Tm2 são proteínas ligantes de actina e regulam a contração do sarcômero muscular. Mutantes para Tpn resultam em hipercontração e degeneração dos músculos indiretos do vôo do tórax (PRADO et al. 1995). Todavia, Tpn foi identificada em núcleos de embriões e sua função pode também estar relacionada ao controle do ciclo celular, uma vez que Tpn, Tm1 e Tm2 são necessárias à manutenção da estabilidade da integridade do cromossomo (Sahota et al. 2009). Juntos esses dados sugerem que, Ubx pode regular genes de proteínas motoras que podem estar envolvidas também na divisão celular e controlar diferenças casta-específicas.

Em *Drosophila*, outro gene com sítio de ligação de Ubx é *lola* (Slattery et al. 2011b). Pavlopoulos e Akam (Pavlopoulos and Akam 2011), em um elegante trabalho buscando identificar os genes de resposta a Ubx, produziram mutantes que expressavam Ubx de forma ectópica em discos de asas de larvas de *Drosophila* levando à completa transformação de asas em halteres. Os mutantes portando o transgene *UAS-Ubxla* foram expostos a 29 °C em intervalos entre 4 a 24 h, para a indução da expressão de Ubx. Esses autores identificaram centenas de genes que respondem a Ubx direta ou indiretamente.

Dentre estes, o gene *lola* foi identificado como sendo induzido por Ubx. O produto protéico de *lola* tem sido caracterizado como um importante regulador da extensão dos motoneurônios (Madden et al. 1999). Em abelhas, *lola* é mais expresso em pernas de prépupas e pupas de operárias e rainhas, as quais apresentam maiores níveis de transcritos de *Ubx* quando comparados ao último estágio larval (Bomtorin et al. 2012). Esses dados indicam que a regulação da expressão gênica por Ubx é conservada entre esses grupos filogeneticamente distantes.

Os apêndices dorsais dos segmentos T2 e T3 (asas e halteres), de *Drosophila*, apresentam claramente grandes diferenças, enquanto os apêndices ventrais destes mesmos segmentos são muito similares entre si. As funções e redes gênicas de Ubx no desenvolvimento dos apêndices do terceiro segmento torácico têm extensamente estudadas (Weatherbee et al. 1998; Rozowski and Akam 2002). Ubx liga-se diretamente ao promotor de muito mais genes-alvo em halteres que em pernas. Do número total de alvos de Ubx em pernas, aproximadamente 85% são compartilhados com halteres, enquanto que somente quase 16% dos alvos de halteres são compartilhados em pernas, indicando assim uma rede de regulação por Ubx em halteres bem maior do que em pernas (Slattery et al. 2011a). Comparados aos nossos resultados, esses dados podem sugerir que, Ubx pode regular uma gama de genes com funções conservadas ao longo da evolução controlando assim o desenvolvimento de características táxon-específicas.

5.2. A expressão diferencial de <u>Ubx</u> entre as castas está associada a apêndices torácicos com estruturas casta-específicas

Em formigas, a presença e ausência de asas é uma característica casta-específica. Em *Pheidole morrisi*, rainhas e machos são alados, soldados e operárias são desprovidos de tais apêndices e a determinação de castas é baseada na presença de HJ em diferentes

estágios do desenvolvimento. Durante o desenvolvimento larval as classes reprodutivas possuem discos imaginais que expressam os genes envolvidos no controle do desenvolvimento de asas já caracterizados em *Drosophila* (Weatherbee et al. 1998; Abouheif and Wray 2002). Por outro lado, os soldados possuem apenas o par de discos imaginais correspondentes às asas anteriores, que irão se degenerar ao longo do desenvolvimento, enquanto operárias não possuem nenhum disco imaginal de apêndices torácicos dorsais. Dentre os genes de padronização das asas, *Ubx* é, como esperado, ausente nos discos vestigiais de asas anteriores de soldados. *engrailed e wingless* são expressos de maneira semelhante nos indivíduos da classe reprodutiva que possuem asas, entretanto, *spalt* tem perfil de expressão alterado (Abouheif and Wray 2002). Em abelhas, as asas anteriores diferem das posteriores, embora estruturas casta-específicas estejam ausentes. Acreditamos que a rede de expressão gênica de controle da diferenciação de asas seja afetada pela ausência de Ubx no segundo segmento torácico tornando, assim, esses dois apêndices diferentes entre si.

As pernas metatorácicas e as mesotorácicas, contudo, apresentam variações fenotípicas relacionadas à divisão de trabalho e comportamento. Para investigar se a expressão diferencial de *Ubx* em pernas metatorácicas de operárias e rainhas poderia ser relacionada a tecidos que possuem características casta-específicas, avaliamos os perfis de expressão de *Ubx* nos apêndices torácicos. Além disso, testamos se *Ubx* pode sofrer *splicing* alternativo durante o desenvolvimento dos apêndices de operárias e rainhas, uma vez que, o processamento alternativo do mRNA de *Ubx* em *Drosophila* produz isoformas com diferentes funções ao longo do desenvolvimento das moscas (Reed et al. 2010; de Navas et al. 2011).

5.2.1. Sobre o controle do splicing alternativo de Ubx em A. mellifera

Um dos pontos fundamentais na moderna biologia evolutiva do desenvolvimento é que as unidades dos promotores (*enhancer*) são os sítios primários para evolução (King and Wilson 1975; Levine and Tjian 2003), tornando amplamente aceita a idéia de que grandes mudanças evolutivas refletem a evolução da regulação da expressão gênica. Por outro lado, as modificações do transcrito primário de mRNA (*splicing*) são a maior fonte de variedade protéica em um organismo (Maniatis and Tasic 2002). Em humanos, por exemplo, de 13 a 20% das mutações que causam a fibrose cística afetam diretamente sítios de *splice* ou regiões controladoras de *splicing* no gene que produz a proteína *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (Garcia-Blanco et al. 2004). Alonso e Wilkins (2005) em uma revisão sobre este assunto, propõem que ambos controles da expressão gênica, dados pelos controles via promotor e *splice* alternativo do RNA, são efetivos para a evolução do desenvolvimento.

Há muito tempo acredita-se que o processamento alternativo do mRNA de *Ubx* pelo uso facultativo de microéxons seria uma característica exclusiva dos Diptera. Trabalhos prévios do grupo do Dr. Claudio Alonso mostraram que as isoformas de *Ubx* têm diferentes funções durante a embriogênese (Reed et al. 2010) e o desenvolvimento de apêndices dorsais (de Navas et al. 2011). Entretanto, neste estudo mostramos que *Ubx* produz três isoformas alternativas de mRNA durante o desenvolvimento de apêndices nas castas de *A. mellifera*.

Em Drosophila, Ubx produz uma família de seis isoformas por meio de splicing alternativo de dois microéxons (mI e mII – 51 nt e 17 aa cada, que se localizam dentro de uma região intrônica de aproximadamente 74 kb) e um elemento ao final do éxon 5', chamado elemento "b" (O'Connor et al. 1988; Kornfeld et al. 1989). Assim como D. melanogaster e outros insetos, a região intrônica de Ubx em abelhas é muito longa (>100 kb). Embora as abelhas também possuam dois microéxons (m1, 42 nt; m2, 53 nt), elas somente produzem três isoformas do mRNA de *Ubx*, sendo uma delas incapaz de produzir uma proteína homeótica, uma vez que possui um *stop* códon antes do último éxon.

Burnette e colaboradores (2005) mostraram que, em *Drosophila, Ubx* experimenta um *recursive splicing*, usando um sítio recorrente de *splice (recursive splice site*), também chamado de ponto de ancoragem (*ratcheting point* - RP), localizado mais próximo ao éxon 3', ou seja, *downstream* aos dois microéxons. Esse sítio é usado para facilitar o *splicing* do mRNA em genes com íntrons muito longos. Estes mesmos autores encontraram este sítio RP (5' TAAGTATTACAGGTAAGT) em abelhas, o qual foi localizado nas anotações manuais (Artemis) feitas para *Ubx* no genoma de *A. mellifera* e *N. vitripennis*. Esta seqüência está localizada na região intrônica mais longa (48 kb), entre o éxon 5' e o microéxon m1 (veja Figura 21D), dividindo-a em dois fragmentos menores de 25,7 e 22,8 kb, respectivamente. Também mostramos que o motivo de *resplicing* dos microéxons descrito por Hatton e colaboradores (1998) é conservado em abelhas e vespas. Portanto, nossos resultados indicam a conservação dos mecanismos de *splicing* para o gene Hox *Ubx*, de mais de 300 milhões de anos de evolução destes grupos.

Em *Drosophila*, essas isoformas de *Ubx* produzidas por *resplicing* (Hatton et al. 1998) são expressas diferentemente no tempo, nos tecidos e células (O'Connor et al. 1988; Kornfeld et al. 1989; Lopez and Hogness 1991). Durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, a isoforma IVa é transcrita em menor quantidade. Com o desenvolvimento do sistema nervoso, a expressão desta isoforma aumenta (aproximadamente 20 h de desenvolvimento embrionário) (O'Connor et al. 1988; Lopez and Hogness 1991). O mecanismo pelo qual o *splicing* de *Ubx* ocorre é afetado pela taxa de transcrição da Polimerase II (Pol II) (de la Mata et al. 2003). Mutantes heterozigotos para Pol II, entretanto selvagens para *Ubx* (chamados C4), apresentam fenótipo chamado de

"efeito Ubx" (Greenleaf et al. 1980). Assim, mutantes C4 têm maiores níveis de transcritos da isoforma IVa do que esperado durante os estágios iniciais do desenvolvimento (de la Mata et al. 2003). Estes dados sugerem mais um mecanismo que pode afetar o controle do *splicing* alternativo.

Das isoformas transcritas, durante o desenvolvimento embrionário de moscas-dafruta, a isoforma IVa é a mais efetiva na ativação do alvo natural de Ubx, *decapentaplegic*, na mesoderme. Experimentos *in vitro* mostraram que o complexo Ubx-Extradenticle (Ubx-Exd) se liga mais efetivamente ao DNA que Ubx sozinho. Quando comparadas as eficiências das isoformas (Ubx-Exd) na ligação ao DNA, a isoforma Ia é mais eficiente que a isoforma IVa. A substituição do motivo "YPWM" [característico da ligação de Ubx ao promotor de *distalless* (Tour et al. 2005)] por resíduos de Alanina₄ mostram que a isoforma mais longa (Ia) independe deste motivo para ligação ao DNA, enquanto que a isoforma IVa tem a efetividade de ligação ao DNA diminuída em 40% (Reed et al. 2010).

No presente trabalho, mostramos que os níveis de transcritos de *Ubx* variam, dentre os apêndices aqui estudados, entre as castas apenas em pernas, sendo que os níveis totais de transcritos em asas são aproximadamente os mesmos em ambas as castas (ver Figura 22A). Nossos resultados indicam, fortemente, uma regulação casta-específica da expressão de *Ubx* em pernas, tecidos cuja estrutura adulta apresenta grandes diferenças morfológicas, suportando a hipótese de que Ubx está relacionado à diferenciação de castas em *A. mellifera*.

Quanto ao uso das isoformas, embora a isoforma mais curta (IVa-like) seja a mais transcrita em todos os apêndices torácicos analisados, as asas anteriores de fêmeas de abelhas transcrevem mais a isoforma IIa-like (sem homeodomínio) que os outros tecidos, indicando uma regulação na expressão gênica de *Ubx*, via redução da quantidade de proteína homeótica formada nesses tecidos. Contudo, em pernas e asas posteriores, as

rainhas têm maior tendência a inserir o microéxon m1 (isoforma IIIa-like) que operárias, as quais transcrevem mais a isoforma IVa-like (ver Figura 22B).

Esses resultados mostram que *Ubx* é regulado de maneira casta-específica na região ventral torácica, ou seja, em pernas de *A. mellifera*, enquanto asas, tecidos que não possuem diferenças casta-específicas, não são reguladas diferencialmente. Os dados aqui apresentados sugerem uma regulação mais fina condizente com as isoformas que são transcritas nos diferentes tecidos e nas castas. Seja via Pol II ou ligantes de sítios de *splice*, esses dados mostram que rainhas tendem a incorporar mais o microéxon m1 ao mRNA de *Ubx* transcrito. Portanto, podemos sugerir que durante a diferenciação morfológica de apêndices de abelhas o controle da expressão de *Ubx* é dada pela combinação dos controles de regiões *Cis*-regulatórias que devem controlar os níveis de mRNA nos tecidos e dos tipos de transcritos incorporados ao mRNA de cada casta.

Em halteres de *Drosophila*, a isoforma la é mais eficiente no resgate do fenótipo de mutantes de *Ubx* que a isoforma IVa. Porém, com o aumento do nível da expressão da isoforma IVa é possível obter-se os mesmos fenótipos resgatados pela isoforma la (de Navas et al. 2011). Somado ao fato da isoforma apresentar maior capacidade de ligação ao DNA *in vitro* (Reed et al. 2010), a regulação da maior expressão da isoforma IIIa-like em apêndices de rainhas de *A. mellifera* pode ser um mecanismo que aumenta a eficiência da regulação de genes *downstream* a Ubx, ou na verdade um mecanismo de resgate de operárias de mesma eficiência, ou maior ainda, na ligação aos sítios alvos de Ubx por um aumento da expressão deste.

5.2.2. Sobre o uso da região 3'UTR de Ubx em abelhas

A expressão de cada isoforma de *Ubx* tem sido associada ao uso de tamanhos alternativos de 3'UTR (Kornfeld et al. 1989). Trabalhos recentes do grupo do Dr. Claudio

Alonso mostraram que as formas curta e longa da 3'UTR são expressas são temporalmente coordenadas, bem como nos tecidos, e que a expressão dirigida por Elav (embryonic-lethal abnormal visual system) da forma curta do mRNA no sistema nervoso central leva a um acúmulo de Ubx na região posterior, enquanto que a expressão da forma longa é controlada nessas regiões mais posteriores (Thomsen et al. 2010). Entretanto, resultados mais recentes mostram que se por um lado o aumento da região 3'UTR adiciona mais sítios-alvo de miRNA, por outro a acessibilidade de alguns destes sítios é dificultada (Patraquim et al. 2011).

O seqüenciamento da cauda Poli(A) de 39 transcritos poliadenilados usados para criar um mapa global de sítios de poliadenilação (poliA) em 24 tecidos de cinco espécies de mamíferos (humanos, macaco-rhesus, cão, camundongo e rato) mostraram que muitos dos sítios representam eventos de poliA não caracterizados e extensões de transcritos de humanos e camundongo. Cerca de 70% dos genes conhecidos de humanos, detectados nesse estudo tem múltiplos sítios poliA na 3'UTR, sendo que cerca de 50% tem três ou mais sítios. Esses autores também mostraram que os sítios canônicos de poliA são altamente enriquecidos e conservados em todas as espécies (Derti et al. 2012).

Em *Drosophila*, os testículos de machos apresentam os transcritos com a região 3'UTR mais curta e o sistema nervoso central de larvas apresentam as mais longas regiões 3'UTR transcritas (Smibert et al. 2012). Experimentos de expressão ectópica de Elav revela um enriquecimento de regiões 3'UTR mais longas fora do sistema nervoso central (Hilgers et al. 2012). Associados aos resultados de Thomsen e colaboradores (2010), que mostraram que a forma longa de *Ubx* é mais degrada na região posterior do embrião que a forma curta, é possível imaginar que o aumento da região 3'UTR transcrita facilite a degradação por miRNAs no sistema nervoso. Entretanto, há trabalhos que mostram que o aumento da

região 3'UTR pode aumentar a estabilidade do mRNA e favorecer a tradução do mesmo em proteínas, tanto em humanos quanto em *Drosophila* (An et al. 2008; Pinto et al. 2011).

Em busca de um cenário inicial para entender o controle pós-transcricional de *Ubx* por miRNAs, foram feitas RT-sqPCR usando asas anteriores e posteriores e *primers* específicos para identificar a região 3'UTR de *Ubx* de *A. mellifera*. Semelhante aos dados descritos para *Drosophila* que transcrevem a forma longo do mRNA de *Ubx* com uma região 3'UTR de 2,4 kb (Thomsen et al. 2010), os resultados apresentados aqui mostram que, em abelhas, o sítio de poliA de *Ubx* está em torno de 2,1 kb, sugerindo uma conservação também do tamanho da região 3'UTR além da seqüência primária da região codificadora. Embora haja outros sítios possíveis de poliA dentro desta região, ainda não fomos capazes de identificar o uso alternativo da poliA em abelhas.

Análises da seqüência de nucleotídeos da região 3'UTR mostram que esta é uma região microssatélite já descrita para abelhas (Solignac et al. 2003). Essas regiões de possíveis alterações dentro de uma espécie na porção 3'UTR dos genes não são uma característica exclusiva de abelhas. Seqüenciamentos de regiões 3'UTR de duas espécies de cerejeiras revelam que uma considerável parte considerável dessas regiões possui mutações de nucleotídeos únicos (SNPs) (Koepke et al. 2012). Em humanos, alelos de um gene associado à esquizofrenia foram caracterizados por mutações (SNPs) na região 3'UTR. Ensaios de luciferase revelaram que a degradação induzida pelo mir-124 é diminuída em um desses alelos em relação ao outro, indicando que a susceptibilidade a doenças genéticas pode estar associada à região não-traduzida de determinados genes (Gong et al. 2013).

Análises de estrutura secundária bem como de acessibilidade do mRNA revelam que esta região distal da 3'UTR é alvo de um número menor de miRNAs que a região proximal. Smibert e colaboradores (2012) analisaram o número relativo de sítios de ligação

de miRNAs nas 3'UTR curtas e longas dos mRNAs e seus resultados indicam que, de maneira geral, as regiões mais proximais da 3'UTR longa (aquela mais expressa em sistema nervoso) possuem mais sítios conservados de ligação a miRNAs que as regiões mais distais. Assim, nossos resultados são congruentes com o que é observado de maneira geral para 3'UTR longas, sendo mais um indicativo de que esta é a forma mais longa de 3'UTR de *Ubx*, no entanto não temos indicações de uma outra forma em abelhas.

Análises da região 3'UTR de *Ubx* das 12 espécies de *Drosophila* com genoma seqüenciado mostram que a poliA aternativa do mRNA é compartilhada em todas essas espécies e que embora a seqüência primária da região 3'UTR não seja muito conservada, as regiões dentro desta seqüência apresentam uma topologia do RNA muito semelhante (regiões de acessibilidade) o que indica que a estrutura do RNA está sob forte pressão de seleção. A forma longa da 3'UTR de espécies mais próximas a *D. melanogaster* são de aproximadamente 2,4 kb, enquanto espécies mais distantes apresentam a forma longa de 2,1 kb em média (Patraguim et al. 2011).

Apesar da baixa conservação entre as regiões não-traduzidas de espécies distantes, os miR-184 e miR-210 compartilham sítios-alvo preditos nas regiões 3'UTR de *Ubx* de abelhas e das 12 espécies de *Drosophila* com genoma seqüenciado (Patraquim et al. 2011). Esses miRNAs que também tem sítios preditos em outras espécies são mais expressos em asas anteriores de operárias e o miR-184 é mais expresso em asas de *Drosophila* em relação aos halteres (R. Kaschula, comunicação pessoal), o que indica uma possível conservação da regulação de *Ubx* por este miRNA.

O miRNA iab-4 já foi descrito como regulador de *Ubx* em asas e halteres de *Drosophila* (Ronshaugen et al. 2005) e como parte do cromossomo onde se encontram os genes Hox (Stark et al. 2008). Em abelhas, este miRNA encontra-se no cromossomo dos genes Hox (cromossomo 16), em sintenia com os outros insetos (Dearden et al. 2006; Miura

et al. 2011), porém, é mais expresso em asas posteriores, oposto à expressão desse miRNA em *Drosophila* (veja Figura 27), e não possui sítios preditos de ligação a *Ubx*. Vários dos miRNAs seqüenciados em apêndices de T2 e T3 de abelhas e moscas (R. Kaschula, comunicação pessoal) em fases equivalentes do desenvolvimento apresentam o mesmo perfil de expressão, indicando que muitos desses miRNAs podem ter perfis de expressão semelhantes durante o desenvolvimento adulto dessas espécies, como já foi mostrado para o miR-9a durante o desenvolvimento embrionário de abelhas e *Drosophila* (Zondag et al. 2012). Em *Drosophila*, o miRNA iab-4, já caracterizado como regulador de *Ubx*, tem perfil de expressão complementar a este durante o desenvolvimento embrionário e adulto Em abelhas, oito miRNAs com sítios de ligação preditos na região 3'UTR de *Ubx* são mais expressos em asas anteriores que posteriores.

Desta forma, propomos que os níveis de *Ubx* são regulados em asas anteriores de maneira pré-transcricional, por controle do nível de transcrição desse gene por fatores de transcrição que classicamente bloqueiam a transcrição de *Ubx* no T2; durante o processamento do mRNA (*splicing*) aumentando a inclusão do microéxon m2, que insere um *stop* códon e inviabiliza a formação de proteína homeótica; e finalmente, por controle pós-transcricional por meio de miRNAs, criando um sistema redundante de regulação desse gene.

6. Conclusões

O presente estudo representa, para nosso entendimento, um importante avanço na caracterização morfogenética do desenvolvimento de asas e pernas de operárias e rainhas de A. mellifera. As asas de operárias e rainhas são muito semelhantes e não apresentam estruturas casta-específicas, enquanto pernas, apresentam estruturas especializadas para a coleta de pólen e própolis. Durante o desenvolvimento de pernas metatorácicas, as maiores diferenças de padrões globais de expressão gênica entre operárias e rainhas são encontradas guando Ubx é diferencialmente expresso. Os genes ativadores da transcrição de Ubx são mais expressos no início da diferenciação de pernas metatorácicas. Dentre os genes diferencialmente expressos, há um enriquecimento de sítios de ligação de Ubx no promotor dos genes do *cluster 1a*. A expressão diferencial de Ubx está associada à morfologia casta-específica de apêndices torácicos adultos, sendo que durante o desenvolvimento destes tecidos, operárias e rainhas tendem a transcrever diferentes quantidades das isoformas. Nas asas anteriores a expressão de Ubx é quase ausente e a isoforma que não produz uma proteína Hox (devido à inserção de um códon de terminação) é mais transcrita nesses tecidos que em outros. miRNAs preditos como reguladores da expressão de Ubx são mais expressos em asas anteriores que posteriores, indicando uma regulação redundante dos níveis de Ubx fora de seu domínio característico de expressão. Desta maneira, nossos resultados mostram que a expressão diferencial de Ubx é regulada por fatores de transcrição, por splicing alternativo, e pela expressão espaçoe casta-específica de miRNAs, controlando, assim, a morfogênese diferencial dos apêndices observada em fêmeas de A. mellifera.

7. Referências bibliográficas

- Abouheif E, Wray GA. 2002. Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants. *Science* **297**: 249-252.
- Alonso CR. 2002. Hox proteins: Sculpting body parts by activating localised cell death. *Current Biology* **12**: R776-R778.
- Alonso CR, Wilkins AS. 2005. The molecular elements that underlie developmental evolution. *Nature Reviews Genetics* **6**: 709-715.
- Ambros V. 2004. The functions of animal microRNAs. in *Nature*, pp. 350-355, England.
- An JJ, Gharami K, Liao GY, Woo NH, Lau AG, Vanevski F, Torre ER, Jones KR, Feng Y, Lu B et al. 2008. Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* **134**: 175-187.
- Asgari S. 2012. MicroRNA functions in insects. Insect Biochem Mol Biol.
- Audic S, Claverie JM. 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res* **7**: 986-995.
- Barchuk AR, Cristino AS, Kucharski R, Costa LF, Simoes ZLP, Maleszka R. 2007. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee Apis mellifera. *Bmc Developmental Biology* **7**.
- Bartel DP. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 136: 215-233.
- Becam I, Rafel N, Hong X, Cohen SM, Milán M. 2011. Notch-mediated repression of bantam miRNA contributes to boundary formation in the Drosophila wing. *Development* 138: 3781-3789.
- Bender W. 2008. MicroRNAs in the Drosophila bithorax complex. *Genes & Development* **22**: 14-19.
- Bomtorin AD, Barchuk AR, Moda LM, Paulino Simoes ZL. 2012. Hox Gene Expression Leads to Differential Hind Leg Development between Honeybee Castes. *Plos One* **7**.
- Bomze HM, Lopez AJ. 1994. Evolutionary conservation of the structure and expression of alternatively spliced Ultrabithorax isoforms from Drosophila. *Genetics* **136**: 965-977.
- Bulyk ML. 2003. Computational prediction of transcription-factor binding site locations. in *Genome Biol*, p. 201, England.
- Burnette JM, Miyamoto-Sato E, Schaub MA, Conklin J, Lopez AJ. 2005. Subdivision of large introns in Drosophila by recursive splicing at nonexonic elements. *Genetics* **170**: 661-674.
- Caygill EE, Johnston LA. 2008. Temporal regulation of metamorphic processes in Drosophila by the let-7 and miR-125 heterochronic microRNAs. *Curr Biol* **18**: 943-950.
- Chen Z, Wang Z. 2012. Functional study of hyperpolarization activated channel (Ih) in Drosophila behavior. *Sci China Life Sci* **55**: 2-7.
- Cristino AS, Nunes FMF, Lobo CH, Bitondi MMG, Simoes ZLP, Costa LD, Lattorff HMG, Moritz RFA, Evans JD, Hartfelder K. 2006. Caste development and reproduction: a genomewide analysis of hallmarks of insect eusociality. *Insect Molecular Biology* **15**: 703-714.
- de la Mata M, Alonso CR, Kadener S, Fededa JP, Blaustein M, Pelisch F, Cramer P, Bentley D, Kornblihtt AR. 2003. A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Mol Cell* **12**: 525-532.
- de Navas LF, Reed H, Akam M, Barrio R, Alonso CR, Sánchez-Herrero E. 2011. Integration of RNA processing and expression level control modulates the function of the Drosophila Hox gene Ultrabithorax during adult development. *Development* **138**: 107-116.

- Dearden PK, Wilson MJ, Sablan L, Osborne PW, Havler M, McNaughton E, Kimura K, Milshina NV, Hasselmann M, Gempe T et al. 2006. Patterns of conservation and change in honey bee developmental genes. *Genome Res* **16**: 1376-1384.
- Decoville M, Giacomello E, Leng M, Locker D. 2001. DSP1, an HMG-like protein, is involved in the regulation of homeotic genes. *Genetics* **157**: 237-244.
- Dedej S, Hartfelder K, Aumeier P, Rosenkranz P, Engels W. 1998. Caste determination is a sequential process: effect of larval age at grafting on ovariole number, hind leg size and cephalic volatiles in the honey bee (Apis mellifera carnica). *Journal of Apicultural Research* **37**: 183-190.
- Derti A, Garrett-Engele P, Macisaac KD, Stevens RC, Sriram S, Chen R, Rohl CA, Johnson JM, Babak T. 2012. A quantitative atlas of polyadenylation in five mammals. *Genome Res* 22: 1173-1183.
- Devenport MP, Blass C, Eggleston P. 2000. Characterization of the Hox gene cluster in the malaria vector mosquito, Anopheles gambiae. *Evolution & Development* **2**: 326-339.
- Diop SB, Bertaux K, Vasanthi D, Sarkeshik A, Goirand B, Aragnol D, Tolwinski NS, Cole MD, Pradel J, Yates JR, 3rd et al. 2008. Reptin and Pontin function antagonistically with PcG and TrxG complexes to mediate Hox gene control. in *EMBO Rep*, pp. 260-266, England.
- Duboule D. 1994. Guidebook to the homeobox genes. *Guidebook to the homeobox genes*: i-viii, 1-284.
- Dutta D, Umashankar M, Lewis EB, Rodrigues V, Vijayraghavan K. 2010. Hox genes regulate muscle founder cell pattern autonomously and regulate morphogenesis through motor neurons. *J Neurogenet* **24**: 95-108.
- Edwards KA, Kiehart DP. 1996. Drosophila nonmuscle myosin II has multiple essential roles in imaginal disc and egg chamber morphogenesis. *Development* **122**: 1499-1511.
- EMLEN D. 1994. ENVIRONMENTAL-CONTROL OF HORN LENGTH DIMORPHISM IN THE BEETLE ONTHOPHAGUS-ACUMINATUS (COLEOPTERA, SCARABAEIDAE). *Proceedings* of the Royal Society B-Biological Sciences **256**: 131-136.
- Emlen DJ, Nijhout HF. 2001. Hormonal control of male horn length dimorphism in Onthophagus taurus (Coleoptera : Scarabaeidae): a second critical period of sensitivity to juvenile hormone. *Journal of Insect Physiology* **47**: 1045-1054.
- Fernandes J, Celniker SE, Lewis EB, VijayRaghavan K. 1994. Muscle development in the fourwinged Drosophila and the role of the Ultrabithorax gene. *Curr Biol* **4**: 957-964.
- Ford DM, Hepburn HR, Moseley FB, Rigby RJ. 1981. Displacement sensors in the honeybee pollen basket. *Journal of Insect Physiology* **27**: 339-&.
- Friedlander MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S, Rajewsky N. 2008. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nature Biotechnology* **26**: 407-415.
- Garcia-Blanco M, Baraniak A, Lasda E. 2004. Alternative splicing in disease and therapy. *Nature Biotechnology* **22**: 535-546.
- Gong Y, Wu CN, Xu J, Feng G, Xing QH, Fu W, Li C, He L, Zhao XZ. 2013. Polymorphisms in microRNA target sites influence susceptibility to schizophrenia by altering the binding of miRNAs to their targets. *Eur Neuropsychopharmacol*.
- Greenleaf AL, Weeks JR, Voelker RA, Ohnishi S, Dickson B. 1980. Genetic and biochemical characterization of mutants at an RNA polymerase II locus in *D. melanogaster. Cell* **21**: 785-792.
- Grout RA. 1949. The hive and the honey bee. The hive and the honey bee.
- Hatton AR, Subramaniam V, Lopez AJ. 1998. Generation of alternative Ultrabithorax isoforms and stepwise removal of a large intron by resplicing at exon-exon junctions. *Molecular Cell* **2**: 787-796.

- Hilgers V, Lemke SB, Levine M. 2012. ELAV mediates 3' UTR extension in the Drosophila nervous system. *Genes Dev* 26: 2259-2264.
- Hofacker IL. 2003. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Research* **31**: 3429-3431.
- Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. 2007. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nature Genetics* **39**: 1278-1284.
- King MC, Wilson AC. 1975. Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* **188**: 107-116.
- Koepke T, Schaeffer S, Krishnan V, Jiwan D, Harper A, Whiting M, Oraguzie N, Dhingra A.
 2012. Rapid gene-based SNP and haplotype marker development in non-model eukaryotes using 3'UTR sequencing. *BMC Genomics* 13: 18.
- Kornfeld K, Saint RB, Beachy PA, Harte PJ, Peattie DA, Hogness DS. 1989. Structure and expression of a family of Ultrabithorax messenger-RNAs generated by alternative splicing and polyadenylation in Drosophila. *Genes & Development* **3**: 243-258.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. 2011. miRBase: integrating microRNA annotation and deepsequencing data. *Nucleic Acids Res* **39**: D152-157.
- LaBeau EM, Trujillo DL, Cripps RM. 2009. Bithorax complex genes control alary muscle patterning along the cardiac tube of Drosophila. *Mech Dev* **126**: 478-486.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**: 843-854.
- Legeai F, Rizk G, Walsh T, Edwards O, Gordon K, Lavenier D, Leterme N, Méreau A, Nicolas J, Tagu D et al. 2010. Bioinformatic prediction, deep sequencing of microRNAs and expression analysis during phenotypic plasticity in the pea aphid, Acyrthosiphon pisum. *BMC Genomics* **11**: 281.
- Leimar O, Hartfelder K, Laubichler MD, Page RE. 2012. Development and evolution of caste dimorphism in honeybees a modeling approach. *Ecology and Evolution*.
- Levine M, Tjian R. 2003. Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424: 147-151.
- Lewis EB. 1978. Gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature* 276: 565-570.
- Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. in *Bioinformatics*, pp. 1754-1760, England.
- Li Y, Wang F, Lee JA, Gao FB. 2006. MicroRNA-9a ensures the precise specification of sensory organ precursors in Drosophila. *Genes Dev* 20: 2793-2805.
- Lopez AJ, Hogness DS. 1991. Immunochemical dissection of the Ultrabithorax homeoprotein family in Drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9924-9928.
- Lutz CS, Moreira A. 2011. Alternative mRNA polyadenylation in eukaryotes: an effective regulator of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**: 22-31.
- MacIsaac KD, Fraenkel E. 2006. Practical strategies for discovering regulatory DNA sequence motifs. *PLoS Comput Biol* **2**: e36.
- Madden K, Crowner D, Giniger E. 1999. lola has the properties of a master regulator of axon-target interaction for SNb motor axons of Drosophila. *Developmental Biology* **213**: 301-313.
- Mahfooz N, Turchyn N, Mihajlovic M, Hrycaj S, Popadic A. 2007. Ubx regulated differential enlargement and diversification of insect hind legs. *PLoS ONE* **2**: 1-9.
- Maniatis T, Tasic B. 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* **418**: 236-243.
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMB net journal* **17**: 10-12.
- McGinnis W, Krumlauf R. 1992. Homeobox genes and axial patterning. Cell 68: 283-302.

- Michelette ERD, Soares AEE. 1993. Characterization of preimaginal developmental stages in africanized honey-bee workers (Apis-mellifera L). *Apidologie* **24**: 431-440.
- Michener CD. 1969. Comparative social behaviour of bees. A Rev Ent 14: 299-342.
- -. 1974. The social behavior of the bees. A comparative study. *The social behavior of the bees A comparative study*: i-xii,1-404.
- Miura S, Nozawa M, Nei M. 2011. Evolutionary changes of the target sites of two microRNAs encoded in the Hox gene cluster of Drosophila and other insect species. *Genome Biol Evol* **3**: 129-139.
- Moczek AP, Sultan S, Foster S, Ledon-Rettig C, Dworkin I, Nijhout HF, Abouheif E, Pfennig DW. 2011. The role of developmental plasticity in evolutionary innovation. in *Proc Biol Sci*, pp. 2705-2713. This journal is 2011 The Royal Society, England.
- Monier B, Tevy MF, Perrin L, Capovilla M, Sémériva M. 2007. Downstream of homeotic genes: in the heart of Hox function. *Fly (Austin)* **1**: 59-67.
- Nijhout HF. 2003. Development and evolution of adaptive polyphenisms. *Evolution & Development* **5**.
- Nijhout HF, Wheeler DE. 1982. JUVENILE-HORMONE AND THE PHYSIOLOGICAL-BASIS OF INSECT POLYMORPHISMS. *Quarterly Review of Biology* **57**: 109-133.
- O'Connor MB, Binari R, Perkins LA, Bender W. 1988. Alternative RNA products from the Ultrabithorax domain of the Bithorax Complex. *Embo Journal* **7**: 435-445.
- Patraquim P, Warnefors M, Alonso CR. 2011. Evolution of Hox Post-Transcriptional Regulation by Alternative Polyadenylation and MicroRNA Modulation Within 12 Drosophila Genomes. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2453-2460.
- Pavlopoulos A, Akam M. 2011. Hox gene Ultrabithorax regulates distinct sets of target genes at successive stages of Drosophila haltere morphogenesis. in *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 2855-2860, United States.
- Pearson JC, Lemons D, McGinnis W. 2005. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nature Reviews Genetics* **6**: 893-904.
- Petruk S, Sedkov Y, Smith S, Tillib S, Kraevski V, Nakamura T, Canaani E, Croce CM, Mazo A. 2001. Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. in *Science*, pp. 1331-1334, United States.
- Petruk S, Smith ST, Sedkov Y, Mazo A. 2008. Association of trxG and PcG proteins with the bxd maintenance element depends on transcriptional activity. *Development* **135**: 2383-2390.
- Pinto PA, Henriques T, Freitas MO, Martins T, Domingues RG, Wyrzykowska PS, Coelho PA, Carmo AM, Sunkel CE, Proudfoot NJ et al. 2011. RNA polymerase II kinetics in polo polyadenylation signal selection. *EMBO J* **30**: 2431-2444.
- PRADO A, CANAL I, BARBAS J, MOLLOY J, FERRUS A. 1995. FUNCTIONAL RECOVERY OF TROPONIN-I IN A DROSOPHILA HELDUP MUTANT AFTER A 2ND SITE MUTATION. *Molecular Biology of the Cell* **6**: 1433-1441.
- Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K. 1990. Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen Comp Endocrinol* **79**: 31-38.
- Rappailles A, Decoville M, Locker D. 2005. DSP1, a Drosophila HMG protein, is involved in spatiotemporal expression of the homoeotic gene Sex combs reduced. in *Biol Cell*, pp. 779-785, England.
- Reed HC, Hoare T, Thomsen S, Weaver TA, White RAH, Akam M, Alonso CR. 2010. Alternative Splicing Modulates Ubx Protein Function in Drosophila melanogaster. *Genetics* **184**: 745-U192.
- Rembold H, Kremer JP, Ulrich GM. 1980. Characterization of post-embryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, Apis-mellifera L. *Apidologie* **11**: 29-38.

- Retelska D, Iseli C, Bucher P, Jongeneel CV, Naef F. 2006. Similarities and differences of polyadenylation signals in human and fly. *Bmc Genomics* **7**.
- Rigoutsos I. 2009. New tricks for animal microRNAS: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer Res* **69**: 3245-3248.
- Rivlin PK, Gong A, Schneiderman AM, Booker R. 2001. The role of Ultrabithorax in the patterning of adult thoracic muscles in Drosophila melanogaster. *Dev Genes Evol* 211: 55-66.
- Ronshaugen M, Biemar F, Piel J, Levine M, Lai EC. 2005. The Drosophila microRNA iab-4 causes a dominant homeotic transformation of halteres to wings. *Genes Dev* **19**: 2947-2952.
- Ronshaugen M, McGinnis N, McGinnis W. 2002. Hox protein mutation and macroevolution of the insect body plan. *Nature* **415**: 914-917.
- Rozowski M, Akam M. 2002. Hox gene control of segment-specific bristle patterns in Drosophila. *Genes & Development* **16**: 1150-1162.
- Rubio M, de Horna A, Belles X. 2012. MicroRNAs in metamorphic and non-metamorphic transitions in hemimetabolan insect metamorphosis. *BMC Genomics* **13**: 386.
- Ruby JG, Stark A, Johnston WK, Kellis M, Bartel DP, Lai EC. 2007. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of Drosophila microRNAs. in *Genome Res*, pp. 1850-1864, United States.
- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**: 944-945.
- Sahota V, Grau B, Mansilla A, Ferrus A. 2009. Troponin I and Tropomyosin regulate chromosomal stability and cell polarity. *Journal of Cell Science* **122**: 2623-2631.
- Schertel C, Rutishauser T, Förstemann K, Basler K. 2012. Functional Characterization of Drosophila microRNAs by a Novel in Vivo Library. *Genetics* **192**: 1543-1552.
- Schmieder R, Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. in *Bioinformatics*, pp. 863-864, England.
- Schmittgen T, Livak K. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. *Nature Protocols* **3**: 1101-1108.
- Shimojima T, Okada M, Nakayama T, Ueda H, Okawa K, Iwamatsu A, Handa H, Hirose S. 2003. Drosophila FACT contributes to Hox gene expression through physical and functional interactions with GAGA factor. in *Genes Dev*, pp. 1605-1616, United States.
- Slattery M, Ma L, Negre N, White KP, Mann RS. 2011a. Genome-wide tissue-specific occupancy of the Hox protein Ultrabithorax and Hox cofactor Homothorax in Drosophila. *PLoS One* **6**: e14686.
- Slattery M, Riley T, Liu P, Abe N, Gomez-Alcala P, Dror I, Zhou T, Rohs R, Honig B, Bussemaker H et al. 2011b. Cofactor Binding Evokes Latent Differences in DNA Binding Specificity between Hox Proteins. *Cell* **147**: 1270-1282.
- Smibert P, Miura P, Westholm JO, Shenker S, May G, Duff MO, Zhang D, Eads BD, Carlson J, Brown JB et al. 2012. Global patterns of tissue-specific alternative polyadenylation in Drosophila. *Cell Rep* **1**: 277-289.
- Smyth GK. 2005. Limma: Linear models for microarray data. *Bioinformatics and Computational Biology Solution Using R and Bioconductor*: 397-420.
- Snell-Rood EC, Cash A, Han MV, Kijimoto T, Andrews J, Moczek AP. 2011. Developmental decoupling of alternative phenotypes: insights from the transcriptomes of horn-polyphenic beetles. *Evolution* **65**: 231-245.
- Snodgrass RE. 1956. Anatomy of the honey bee. Anatomy of the honey bee: xiv + 334 pp.

- Solignac M, Vautrin D, Loiseau A, Mougel F, Baudry E, Estoup A, Garnery L, Haberl M, Cornuet JM. 2003. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (Apis mellifera L.) genome. *Molecular Ecology Notes* **3**: 307-311.
- Stark A, Bushati N, Jan CH, Kheradpour P, Hodges E, Brennecke J, Bartel DP, Cohen SM, Kellis M. 2008. A single Hox locus in Drosophila produces functional microRNAs from opposite DNA strands. *Genes & Development* 22: 8-13.
- Stern DL. 1998. A role of Ultrabithorax in morphological differences between Drosophila species. *Nature* **396**: 463-466.
- Surridge AK, Lopez-Gomollon S, Moxon S, Maroja LS, Rathjen T, Nadeau NJ, Dalmay T, Jiggins CD. 2011. Characterisation and expression of microRNAs in developing wings of the neotropical butterfly Heliconius melpomene. *BMC Genomics* **12**: 62.
- Tennessen JM, Thummel CS. 2008. Developmental timing: let-7 function conserved through evolution. in *Curr Biol*, pp. R707-708, England.
- Thomsen S, Azzam G, Kaschula R, Williams LS, Alonso CR. 2010. Developmental RNA processing of 3 ' UTRs in Hox mRNAs as a context-dependent mechanism modulating visibility to microRNAs. *Development* **137**: 2951-2960.
- Tomoyasu Y, Wheeler SR, Denell RE. 2005. Ultrabithorax is required for membranous wing identity in the beetle Tribolium castaneum. *Nature* **433**: 643-647.
- Tour E, Hittinger CT, McGinnis W. 2005. Evolutionarily conserved domains required for activation and repression functions of the Drosophila Hox protein Ultrabithorax. *Development* **132**: 5271-5281.
- Tyler DM, Okamura K, Chung WJ, Hagen JW, Berezikov E, Hannon GJ, Lai EC. 2008. Functionally distinct regulatory RNAs generated by bidirectional transcription and processing of microRNA loci. *Genes & Development* **22**: 26-36.
- Waldron JA, Newbury SF. 2012. The roles of miRNAs in wing imaginal disc development in Drosophila. in *Biochem Soc Trans*, pp. 891-895, England.
- Weatherbee SD, Halder G, Kim J, Hudson A, Carroll S. 1998. Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the Drosophila haltere. *Genes & Development* **12**: 1474-1482.
- Weatherbee SD, Nijhout HF, Grunert LW, Halder G, Galant R, Selegue J, Carroll S. 1999. Ultrabithorax function in butterfly wings and the evolution of insect wing patterns. *Current Biology* **9**: 109-115.
- Weaver DB, Anzola JM, Evans JD, Reid JG, Reese JT, Childs KL, Zdobnov EM, Samanta MP, Miller J, Elsik CG. 2007. Computational and transcriptional evidence for microRNAs in the honey bee genome. *Genome Biol* **8**: R97.
- Wei Y, Chen S, Yang P, Ma Z, Kang L. 2009. Characterization and comparative profiling of the small RNA transcriptomes in two phases of locust. *Genome Biol* **10**: R6.
- Weinstock GM Robinson GE Gibbs RA Worley KC Evans JD Maleszka R Robertson HM Weaver DB Beye M Bork P et al. 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee Apis mellifera. *Nature* **443**: 931-949.
- Weir M, Rice M. 2004. Ordered partitioning reveals extended splice-site consensus information. *Genome Research* **14**: 67-78.
- Wettenhall JM, Smyth GK. 2004. limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data. in *Bioinformatics*, pp. 3705-3706, England.
- Wheeler DE. 1986. Developmental and physiological determinants of caste in social hymenoptera Evolutionary implications. *American Naturalist* **128**: 13-34.
- Wingender E, Chen X, Hehl R, Karas H, Liebich I, Matys V, Meinhardt T, Pruss M, Reuter I, Schacherer F. 2000. TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. in *Nucleic Acids Res*, pp. 316-319, England.
- Winston ML. 1987. The biology of the honey bee. The biology of the honey bee: 1-281.

Zondag L, Dearden PK, Wilson MJ. 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.

8. Anexos

8.1. Anexo A: Ambiente de análise na plataforma R para os resultados de análise ao longo

do desenvolvimento de operárias e rainhas

```
library("limma")
targets <- readTargets("durva_targets_total_biol.txt")</pre>
RG <- read.maimages(targets$FileName, source="genepix", path="data")
spotTypes <- readSpotTypes("spottype BeeOligo120406 color.txt")</pre>
RG$genes <- readGAL(galfile="BeeOligo120406 GB.txt")
RG$printer <- getLayout(RG$genes)
RG$genes$Status <- controlStatus(spotTypes, RG)
# PLOT SLIDES BACKGROUND IMAGES
for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {
slidename <- removeExt(targets$FileName[i])
png(paste("graf_redbackground_",slidename,".png", sep=""))
imageplot(log2(RG$Rb[,i]), RG$printer, low="white", high="red")
dev.off()}
for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {
slidename <- removeExt(targets$FileName[i])</pre>
png(paste("graf_greenbackground_",slidename,".png", sep=""))
imageplot(log2(RG$Gb[,i]), RG$printer, low="white", high="green")
dev.off()}
#BACKGROUND CORRECTION
RGb <- backgroundCorrect(RG, method="normexp", offset=50)
for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {
slidename <- removeExt(targets$FileName[i])</pre>
png(paste("graf_RGbackground_",slidename,".png", sep=""))
plotMA(RGb, array=i)
dev.off()}
png("graf_RGb_densities.png")
plotDensities(RGb)
dev.off()
#NORMALIZATION FOR IMBALANCES IN RED/GREEN DYES (VARIATION IN SPOT INTENSITY
AND SPATION POSITION)
MA.w <- normalizeWithinArrays(RGb, method="loess")
for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {
slidename <- removeExt(targets$FileName[i])
png(paste("graf_MAw_",slidename,".png", sep=""))
plotMA(MA.w, array=i)
dev.off()
png(paste("graf_MAw_tip_",slidename,".png", sep=""))
plotPrintTipLoess(MA.w)
dev.off()}
png("graf_MAw_box.png")
boxplot(MA.w$M~col(MA.w$M),names=colnames(MA.w$M))
dev.off()
png("graf MAw densities.png")
plotDensities(MA.w)
```

dev.off()

```
#NORMALIZATION FOR IMBALANCES IN RED/GREEN DYES (VARIATION IN SPOT INTENSITY
AND SPATION POSITION)
MA.b <- normalizeBetweenArrays(MA.w)
for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {
slidename <- removeExt(targets$FileName[i])</pre>
png(paste("graf_MAb_",slidename,".png", sep=""))
plotMA(MA.b, array=i)
dev.off()
png(paste("graf MAb tip ",slidename,".png", sep=""))
plotPrintTipLoess(MA.b, array=i)
dev.off()
png(paste("graf_MAbackground_",slidename,".png"))
imageplot(MA.b$M[,i], RG$printer, zlim=c(-3,3))
dev.off()}
png("graf_MAb_box.png")
boxplot(MA.b$M~col(MA.b$M),names=colnames(MA.b$M))
dev.off()
png("graf MAb densities.png")
plotDensities(MA.b)
dev.off()
#SET REFERENCE AND BIOLOGICAL REPLICATES
1, 1, 1, 2, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 2)
corfit <- duplicateCorrelation(MA.b, ndups = 1, block = biolrep)</pre>
fit <- ImFit(MA.b, block = biolrep, cor = corfit$consensus)
reference <- "OpF1 1"
design <- modelMatrix(targets, ref=reference)</pre>
cor <- duplicateCorrelation(MA.b, ndups= 2, spacing=1)</pre>
fit2 <- ImFit(MA.b, design, ndups=2, correlation=cor$consensus.correlation)</pre>
cont.matrix <- makeContrasts(OpPP2=(((OpPP2 1+OpPP2 2)/2)-((OpF1 1+OpF1 2)/2)),
OpPw=(((OpPw_1+OpPw_2)/2)-((OpF1_1+OpF1_2)/2)), OpPw-
OpPP2=(((OpPw_1+OpPw_2)/2)-((OpPP2_1+OpPP2_2)/2)),
RaPP2=(((RaPP2_1+RaPP2_2)/2))-((RaF1_1+RaF1_2)/2)), RaPw=(((RaPw_1+RaPw_2)/2)-
((RaF1_1+RaF1_2)/2)), RaPw-RaPP2=(((RaPP2-1+RaPP2-2)/2)-((OpPw-1+OpPw-2)/2)), RaF1-
OpF1=(((RaF1_1-RaF1_2)/2)-((OpF1_1+OpF1_2)/2)), RaPP2-OpPP2=(((RaPP2_1-
RaPP2_2)/2)-((OpPP2_1+OpPP2_2)/2)), RaPw-OpPw=(((RaPw_1-RaPw_2)/2)-
((OpPw 1+OpPw 2)/2)) levels=design)
fit.c <- contrasts.fit(fit, cont.matrix)
fit.eb<- eBayes(fit.c)
for(i in c(1:length(fit_pairwise$t[1,]))) {
coef_name <- colnames(fit_pairwise$coefficients)[i]</pre>
png(paste("graf_MA_fit_"tar,coef_name,".png", sep=""))
plotMA(fit_pairwise, array=i)
abline(0,0,col="blue")
dev.off()
png(paste("graf_volcano_", coef_name, ".png", sep=""))
volcanoplot(fit_pairwise,coef=i,names=fit2$genes$Name,xlab="Log2(Fold-Change)",
ylab="-log10(P-Value)", pch=16, cex=0.35, main=coef name)
abline(v=c(-1,1), col="blue")
```

abline(h=-log(0.05,10), col="red") dev.off()} png("graf_qqt_ebayes_pairwise.png") qqt(fit_pairwise\$t,df=fit_pairwise\$df.prior+fit_pairwise\$df.residual,pch=16,cex=0.2) abline(0,1) dev.off() table_ref <- topTable(fit.eb, coef=1, n=nrow(fit.eb\$genes)) write.table(table_ref, "table_pairwise2.dat") results_pairwise <- decideTests(fit_pairwise) write.table(results_pairwise, "decidetests_pairwise.dat") 8.2. Anexo B: Ambiente de análise na plataforma R para os resultados de análise

```
comparando-se o desenvolvimento de pernas metatorácicas de operárias e rainhas
```

```
library("limma")
targets <- readTargets("durva_targets_wXq.txt")</pre>
RG <- read.maimages(targets$FileName, source="genepix", path="data")
spotTypes <- readSpotTypes("spottype BeeOligo120406 color.txt")</pre>
RG$genes <- readGAL(galfile="BeeOligo120406 GB.txt")
RG$printer <- getLayout(RG$genes)
RG$genes$Status <- controlStatus(spotTypes, RG)
# PLOT SLIDES BACKGROUND IMAGES
for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {
slidename <- removeExt(targets$FileName[i])</pre>
png(paste("graf_redbackground_",slidename,".png", sep=""))
imageplot(log2(RG$Rb[,i]), RG$printer, low="white", high="red")
dev.off()
}
for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {
slidename <- removeExt(targets$FileName[i])</pre>
png(paste("graf_greenbackground_",slidename,".png", sep=""))
imageplot(log2(RG$Gb[,i]), RG$printer, low="white", high="green")
dev.off()
}
#BACKGROUND CORRECTION
RGb <- backgroundCorrect(RG, method="normexp", offset=50)
for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {
slidename <- removeExt(targets$FileName[i])</pre>
png(paste("graf_RGbackground_",slidename,".png", sep=""))
plotMA(RGb, array=i)
dev.off()
}
png("graf_RGb_densities.png")
plotDensities(RGb)
dev.off()
#NORMALIZATION FOR IMBALANCES IN RED/GREEN DYES (VARIATION IN SPOT INTENSITY
AND SPATION POSITION)
MA.w <- normalizeWithinArrays(RGb, method="loess")
for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {
slidename <- removeExt(targets$FileName[i])
png(paste("graf_MAw_",slidename,".png", sep=""))
plotMA(MA.w, array=i)
dev.off()
png(paste("graf_MAw_tip_",slidename,".png", sep=""))
plotPrintTipLoess(MA.w)
dev.off()
}
png("graf MAw box.png")
boxplot(MA.w$M~col(MA.w$M),names=colnames(MA.w$M))
```

```
dev.off()
png("graf_MAw_densities.png")
plotDensities(MA.w)
dev.off()
#NORMALIZATION FOR IMBALANCES IN RED/GREEN DYES (VARIATION IN SPOT INTENSITY
AND SPATION POSITION)
MA.b <- normalizeBetweenArrays(MA.w)
for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {
slidename <- removeExt(targets$FileName[i])</pre>
png(paste("graf_MAb_",slidename,".png", sep=""))
plotMA(MA.b, array=i)
dev.off()
png(paste("graf_MAb_tip_",slidename,".png", sep=""))
 plotPrintTipLoess(MA.b, array=i)
 dev.off()
 png(paste("graf_MAbackground_",slidename,".png"))
imageplot(MA.b$M[,i], RG$printer, zlim=c(-3,3))
dev.off()
}
png("graf MAb box.png")
boxplot(MA.b$M~col(MA.b$M),names=colnames(MA.b$M))
dev.off()
png("graf MAb densities.png")
plotDensities(MA.b)
dev.off()
#SET REFERENCE AND BIOLOGICAL REPLICATES
1, 1, 1, 2, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 2)
corfit <- duplicateCorrelation(MA.b, ndups = 1, block = biolrep)</pre>
reference <- "OpF1"
design <- modelMatrix(targets, ref=reference)</pre>
cor <- duplicateCorrelation(MA.b, ndups= 2, spacing=1)</pre>
fit2 <- ImFit(MA.b, design, ndups=2, correlation=cor$consensus.correlation)
cont.matrix <- makeContrasts(RaF1,RaPP2-OpPP2,RaPw-OpPw, levels=design)
fit.c<- contrasts.fit(fit2, cont.matrix)</pre>
fit.eb<- eBayes(fit.c)
for(i in c(1:length(fit.eb$t[1,]))) {
coef name <- colnames(fit.eb$coefficients)[i]</pre>
 png(paste("graf_MA_fit_",coef_name,".png", sep=""))
 plotMA(fit.eb, array=i)
abline(0,0,col="blue")
dev.off()
png(paste("graf_volcano_", coef_name, ".png", sep=""))
volcanoplot(fit.eb,coef=i,names=fit.c$genes$Name,xlab="Log2(Fold-Change)",
       ylab="-log10(P-Value)", pch=16, cex=0.35, main=coef_name)
abline(v=c(-1,1), col="blue")
abline(h=-log(0.05,10), col="red")
 dev.off()
}
png("graf_qqt_ebayes.png")
```
qqt(fit.eb\$t,df=fit.eb\$df.prior+fit.eb\$df.residual,pch=16,cex=0.2)
abline(0,1)
dev.off()
table_ref <- topTable(fit.eb,n=nrow(fit.eb\$genes))
write.table(table_ref, "wor_que_data.txt")
results_pairwise <- decideTests(fit.eb)
write.table(results_pairwise, "decidetests_wor-timeline.txt")
png("venn_diagram_pairwise.png")
vennDiagram(results_pairwise)
dev.off()</pre>

8.3. Anexo C: <u>Cluster</u> 1a – Lista de genes diferencialmente transcritos durante o desenvolvimento de pernas metatorácicas de operárias e rainhas. Respectivos ortólogos em <u>Drosophila</u> (Dm-ort), presença de sítios de ligação de Ubx no promotor e valores de expressão relativa entre as fases indicadas.

Número de		Ubx-							
acesso (OGS 2.0)	Dm-ort	site	OpPP2-OpF1	OpPw-OpF1	RaPP2-RaF1	RaPw-RaF1	RaF1-OpF1	RaPP2-OpPP2	RaPw-OpPw
GB10228	CG1444	-	1.242419225	1.407780018	0.668602893	1.308215097	0.019662831	-0.554153501	-0.07990209
GB10545	TpnC73F	+	-0.020673698	0.164520078	0.503152525	0.486419943	-0.189353341	0.334472883	0.132546524
GB10939	Tm2	+	0.309077367	0.38943473	1.57069123	1.376067119	-0.872775654	0.388838209	0.113856735
GB10973	Argk	-	1.043309384	0.783902736	0.984137231	1.566713302	-0.043841402	-0.103013554	0.738969164
GB11364	Eip75B	+	0.112737232	0.608399046	0.241217998	0.751851225	-0.197272596	-0.068791831	-0.053820417
GB11601	rtv	-	0.369873836	0.079586071	0.519180874	0.652737522	-0.274104812	-0.124797774	0.299046639
GB12094	lola	+	0.364913082	0.418777202	0.288166086	0.532695613	-0.044446056	-0.121193052	0.069472356
GB12439	CG2846	-	0.401017436	0.319229929	0.434823866	0.79909373	-0.255103804	-0.221297374	0.224759998
GB12585	Eph	+	0.604257342	0.561390521	0.3442385	0.423419028	-0.086054089	-0.346072931	-0.224025583
GB12718	None	+	0.688960522	0.742747153	0.560504533	1.459968085	-0.129008128	-0.257464117	0.588212805
GB12721	Pcd	+	0.635891087	0.932509258	0.448621885	0.897820567	0.040653843	-0.146615358	0.005965152
GB12799	Rassf	+	1.025757412	1.412595052	1.483818212	1.753362992	-0.2514183	0.2066425	0.089349639
GB12924	CG5921	+	1.585208641	1.995076024	1.08094992	1.455723232	0.096218141	-0.408040579	-0.44313465
GB13042	Fmo-1	-	0.452453395	0.095724581	0.710054037	0.818113416	-0.260607961	-0.003007318	0.461780874
GB13399	Mlc2	-	0.199017792	0.454679055	1.313580113	1.640572819	-0.607114478	0.507447843	0.578779286
GB13533	l(2)05510	+	1.052439418	1.167443625	0.853645459	0.844719401	0.102179685	-0.096614275	-0.220544539
GB13967	None	-	0.452169709	0.371032142	0.69879671	0.780407124	-0.063154662	0.183472339	0.34622032
GB14361	Lsp2	-	-0.23635826	0.764701503	1.370902963	1.305128643	-0.620145827	0.987115396	-0.079718688
GB14490	cib	-	0.606825079	0.502379148	0.696221737	0.918053794	-0.097006152	-0.007609494	0.318668493
GB14824	CG7675	-	1.628676215	1.62227356	1.4499625	2.364278421	0.057009876	-0.121703839	0.799014737
GB14929	CG32066	-	0.582129908	0.688269585	0.549121253	0.786643169	-0.13407208	-0.167080734	-0.035698496
GB15450	tmod	-	0.340738657	0.307363166	0.365857911	0.488538513	-0.081611708	-0.056492454	0.099563638
GB15613	CG8860	-	0.475437972	0.261047704	0.536677888	0.534664209	0.145379597	0.206619514	0.418996102
GB16986	Cht5	-	0.514820175	0.893487621	0.377555648	0.802091182	0.0237916	-0.113472927	-0.067604839
GB17198	None	+	0.743272983	0.918441944	0.860566668	1.329840606	-0.388235661	-0.270941977	0.023163001
GB17693	sqh	-	0.212111094	0.194330909	0.861118243	0.643469907	-0.436493348	0.212513801	0.012645651
GB18452	CG11777	+	0.361713078	0.499168337	0.46581035	0.585963068	-0.123601547	-0.019504276	-0.036806817
GB18454	CG11739	+	0.406874806	0.54845602	0.456267977	0.779765097	-0.151799757	-0.102406587	0.07950932
GB18664	CG7656	+	0.584322452	0.489721117	0.618356372	0.872404229	-0.260584085	-0.226550165	0.122099026
GB19122	None	-	0.701887093	0.747223015	0.845040342	0.88770648	-0.123147435	0.020005814	0.01733603
GB19166	Rab1	-	0.432917295	0.329676667	0.508465566	0.727477407	-0.15014788	-0.074599609	0.24765286
GB19228	CG42330	-	0.59320395	0.845473184	0.404470806	0.744052081	0.003537613	-0.185195531	-0.09788349
GB30512	Tm1	-	1.132937004	-0.310243829	1.19039242	-0.162148055	-0.051347702	0.006107715	0.096748073

9. Apêndice

9.1. Apêndice: Artigo publicado durante o Doutorado.

OPEN & ACCESS Freely available online



Hox Gene Expression Leads to Differential Hind Leg Development between Honeybee Castes

Ana Durvalina Bomtorin¹, Angel Roberto Barchuk², Livia Maria Moda¹, Zila Luz Paulino Simoes³*

1 Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preco, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preco, São Paulo, Brazil, 2 Departamento de Biologia Celular, Tación al a do Decenvolvimento Instituío de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Genais, Brazil, 3 Departamento de Biologia, Faculdade de Tecidual e do Desenvolvimento, Instituto de Ciercias Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil, 3 Departo Filosofía, Ciéncias e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Abstract

Beyond the physiological and behavioural, differences in appendage morphology between the workers and queens of Apis mellifera are pre-eminent. The hind legs of workers, which are highly specialized pollinators, deserve special attention. The hind tibia of worker has an expanded bristle-free region used for carrying pollen and propolis, the corbicula. In queens this structure is absent. Although the morphological differences are well characterized, the genetic inputs driving the development of this alternative morphology remain unknown. Leg phenotype determination takes place between the fourth and fifth laval instar and herein we show that the morphogenesis is completed at brown-eyed pupa. Using results from the hybridization of whole genome-based oligonucleotide arrays with RNA samples from hind leg imaginal discs of pre-pupal honeybees of both castes we present a list of 200 differentially expressed genes. Notably, there are castes preferentially expressed cuticular protein genes and members of the P450 family. We also provide results of qPCR analyses determining the developmental transcription profiles of eight selected genes. Including addominal-A. distal-less and determining the developmental transcription profiles of eight selected genes, including abdominal-A, distal-less and ultrabithorax (Ubx), whose roles in leg development have been previously demonstrated in other insect models. Ubx expression in workers hind leg is approximately 25 times higher than in queens. Finally, immunohistochemistry assays show that Ubx localization during hind leg development resembles the bristles localization in the tibia/basitarsus of the adult legs in both castes. Our data strongly indicate that the development of the hind legs diphenism characteristic of this corbiculate species is driven by a set of caste-preferentially expressed genes, such as those encoding cuticular protein genes, P450 and Hox proteins, in response to the naturally different diets offered to honeybees during the larval period.

Citation: Bomtorin AD, Barchuk AR, Moda LM, Simoes ZLP (2012) Hox Gene Expression Leads to Differential Hind Leg Development between Honeybee Castes. PLoS ONE 7(7): e40111. doi:10.1371/journal.pone.0040111

Editor: Gro V. Amdam. Arizona State University. United States of America Received January 5, 2012; Accepted June 1, 2012; Published July 25, 2012

Copyright: © 2012 Bomtorin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Financial support was provided by the Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP grants 2005/03926-5 and 2011/03171-5), which also provided a fellowship to ADB (2009/05675-0). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the also provide manuscript

- 1

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist

* E-mail: zlpsimoe@usp.br

Introduction

Apis mellifera queens and workers are prime examples of how deeply the environment can affect ontogenesis. These two classes of females, named castes, develop from genetically equivalent eggs that undergo different developmental pathways in response to different diets, thus constituting an example of the widespread phenomenon of developmental plasticity. Processes and concepts associated with this phenomenon have attracted researchers' attention over time. Despite this interest, the genetic cascade linking nutrition to the morphological outputs in such divergent and specialized organisms is unknown and represents a very interesting biological problem.

The development of complex traits, such as wings and other appendages, is strongly influenced by nutrition and population conditions [1]. In bees, a differential protein-containing diet is responsible for the high levels of juvenile hormone (JH) observed in queens, which, in turn, directs larval development and the morphological differences observed in both castes [2]. JH has been described as one of the major components of insect development, integrating reproduction and the development of morphological traits. However, in the honeybee A. mellifera, JH seems to have lost

. PLoS ONE | www.plosone.org

its gonadotropic activity (for review see [3]), although JH is still capable of activating the expression of specific developmental gene capable of activating the expression of specific developmental gene pathways that end up in two specialized morphs, queens and workers [4]. The specific morphological traits and related physiology developed during the differentiation process convert the queen to an organism specialized in reproduction by losing some organ functions and gaining others, whereas workers develop into multitasking and facultatively sterile organisms [5]. A good example of developmental plasticity in honeybee casts is the differentiation of the hird thia. In workers, this region forms the differentiation of the hind tibia. In workers, this region forms the corbicula, or pollen basket, a smooth region surrounded by a row of long scopal hairs used for carrying pollen and other materials to the nest [6]. The corbicula and corresponding behavior are absent in queens

Grafting experiments at different times of larval development and the suppression of *tor (target of robumycia)* activity showed that the development of the pollen-collecting apparatus is determined after the fourth larval stage [7,8] and is probably under the control of JH mutti [9]. Nonetheless, the morphological aspects of the differential development of hind legs in honeybee castes and the molecular mechanism underlying the morphogenesis of the corbicula, which is a morphological characteristic with

Here, we show details of the initial steps of hind leg morphogenesis in honeybee castes. We present a list of differen tially expressed genes generated by an analysis of the whole genome using hybridization of oligonucleotide arrays with RNA samples from hind leg imaginal discs of pre-pupa of both castes. We used qPCR analyses to validate eight selected genes, including abdominal-A (abd-A), distal-less (dll) and ultrabithorax (Ubx), for which roles in leg development in other insect models have been previously demonstrated [11-13], and ataxin-2 (atx-2), cryptocephal (ac), dachshund (dac) and grunge (gug), which are also related to leg development and have been found to be differentially expressed in whole larval samples of both castes [4]. Finally, using immuno-histochemistry, we show that the expression of Ubx in developing honeybee hind legs is negatively correlated with bristle distribution in the corbicula. These results indicate that a differential nutrition during the initial stages of post-embryonic development leads to the establishment of differential gene expression patterns, including the caste-specific transcription and translation of a Hox gene which seems to be a key player during the differential development of hind legs in honeybee castes.

Results

Morphological Analyses

The differences in hind leg morphology between castes of adult oneybees, meaning bristle patterning [14] and the stage in which the developmental determination of these caste-specific structures takes place are widely known [7,8]. To determine the stage the bristles are formed we dissected hind legs from worker and queen pupae for Scanning Electron Microscopy (SEM) analyses. We puper to be an increase of the second cuticle of worker hind legs is formed by polygonal scales, which contrasts with the smooth appearance of the same region in queens (compare Fig. 1B and 1E, arrowhead). In addition, bristles of the tibia in worker hind legs have a characteristic socket, usually observed in mechanoreceptors (external proprioceptors). These bristles differ strikingly with the bristles found on queen legs, which do not contain this socket aspect [15] (Fig. 1B and 1E, arrow; Fig. 1C and 1F, detail).

Microarray Analyses

We performed oligonucleotide microarray hybridization analyses comparing RNA samples from hind leg imaginal discs of queen and worker pre-pupae, which is the stage when the JH level in queens are much higher than that in workers [16]. We got a list of 200 differentially expressed genes (DEGs; see M&M Section, and Table S1). The majority of them were found to be upregulated in queen pre-pupae (127), whereas 72 were up-regulated in worker pre-pupae (see Table S1 and GEO database, accession number GE34293). Sixty-five queens' and 39 workers' DEGs have orthologs in *Drasphila melanogastar*. Using the Gene Ontology tool of the *D. melanogastar* database, we showed that most of the DEGs that have D. melanogaster orthologs code for binding proteins (60%Q/47%W). The second-most represented molecular function in queens belonged to the class of nucleotide binding, ion binding and proteins with hydrolase activity (21%), and in workers, the orthologs were genes coding for proteins with oxidoreductase activity (22%) (Fig. 2).

July 2012 | Volume 7 | Issue 7 | e40111

Gene Expression and Leg Diphenism in Honeybees

Among the DEGs detected in queen pre-pupae, we identified the *Drosphila* ortholog Utp7, GB17081, which is expressed 18 times more in this caste than in workers. In addition, in this caste we found groups of highly expressed genes clearly associated with JH metabolism, such as Relinoic and faity acid Binding protein (RfaBp) and juvenile hormone acid methyl transferase (see Table S1). Three other genes, members of the IIS/TOR pathway [insulin-like peptide-3 (ILP3), tuberous sclerosis protein 1 (TSCI) and Phosphatidylinositol 3kinase (Pi3k)], as well as three storage proteins, hexamerins 70a, 70b and 110, were also found to be highly expressed in queen pre-pupa hind legs.

Five members of another group of genes, the Cytochrome P450 (Cyp) family, were found to be differentially expressed between castes. Three of them were expressed more in workers (GB18872; GB14915 and GB11973) and two in queens (GB15634 and GB17588). In addition, a homeobox gene related to sensory organ development, rough (ro), which controls photoreceptor differentiation [17], is over-expressed in workers. Interestingly, fushi tarazu ription factor-1 (ftz-f1) is expressed at a higher level in queen hind legs. We found three genes up-regulated in workers that are inhibited by Ftz-f1 in honeybees (GB13457, Glycine-rich protein; GB11973, another member of the Cytochrome P450 family related to nervous system development; and GB15203, a cuticula protein gene). A different cuticular protein gene, GB15046, expressed more in queens, is up-regulated by Fiz-fi (Simos, ZLP, unpublished data) (Table S1). Overall, we found six cuticular protein genes differentially expressed between castes, three upregulated in queens (GB30200; GB30334 and GB15046) and three in workers (GB12524; GB15203 and GB13457).

The Developmental Transcription Profile of the abd-A, atx-2, crc, dac, dll, gug, RfaBp and Ubx genes During Leg Morphogenesis in Honeybee Castes

Because Dedej and colaborators [8] and Patel and colaborators [7] demonstrated that hind leg determination in honeybees occurs between the 4th and 5th larval stages and our results of morphological analyses showed that hind leg structures are completely formed in Pb, we determined the developmental transcription profiles of eight genes associated with leg morphogenesis in honeybee castes from L4 to Pw (Table 1). We chose four genes related to leg development that are upregulated in whole bodies of fourth larval instar workers (atx-2, crc, dat and gug: [4]: R/aBp, a gene found to be up-regulated in queen pre-pupa hind legs in this work (Table S1) and previously characterized as down-regulated by JH [4], and the homeobox genes abd-A, dll and Ubx, whose participation in hind leg and bristle leg formation has reviously been demonstrated in D. melanogaster and hemimetabola f11.18].

We assessed the transcription profiles of the abdominal-A, ataxincryptocphal dachshund, distal-less, gamge and ultrabilhorax genes in L4, L5F, L5S, L5PP and Pw (see Table 1) of worker and queen hind leg imaginal discs/legs using Real Time RT-PCR (Fig. 3). Despite its low level of transcription, *abd-A* is similarly expressed in both castes when developmental timing is considered, although it is expressed five times more in the hind legs of worker Pw compared to those of queens (P<0.01). *atx-2* and *dll* also show similar profiles in both castes, with queens expressing higher mRNA levels. However, this difference is not statistically significant (P>0.01). In contrast, crc and gug do not have similar transcription profiles and are not differentially expressed between castes (P>0.01). dac shows a high level of transcripts in queen larval imaginal discs, but this difference is not statistically significant (P>0.01). *RfaBp* shows the same transcription profile in both castes, with levels being slightly higher in queen pre-pupa and gug hind legs (P<0.01). Although atx-2, crc, dac

DLoS ONE | www.plosone.org

2



Figure 1. SEM images showing divergent morphologies of A. mellifera worker and queen hind legs during pupal development (Pb). A: Worker hind leg external surface, note the bristle arrangement forming the pollen basket in the tibla, i.e., corbicula, B: Distal portion of the tibla of worker hind leg external surface. C: The single bristle on the worker hind leg external surface. This bristle may be a mechanoreceptor like the other bristle on the worker hind legs. D: Queen hind legs external surface. E: Distal portion of the tibla of the queen hind legs. D: Queen hind leg external surface. E: Distal portion of the tibla of the queen hind leg external surface. F: A bristle on the queen hind leg external surface. Arrow points to bristle socket and arrowhead points to the structure of the cuticle. Original scale bars of scanning electron microscopy system.

3

DLoS ONE | www.plosone.org



Figure 2. Overrepresented Gene Ontology terms for the differentially expressed genes in the hind legs of worker and queen prepupae. A: Classification according to Biological Processes at GO. B: Classification according to Molecular Function. Blue: queens; Orange: workers. doi:10.1371/journal.pone.0040111.g002

Table 1. Characteristics of stages of female honeybee larval development.

Stage of development	Symbol	Characteristic	
Fourth Instar larvae	L4	0.004 to 0.0248g (W)	0,004 to 0,044g (Q)
Afth instar larvae feeding	LSF	0.06 to 0.11g (W)	0.09 to 0.18g (Q)
lifth instar larvae defecting	LSS	Larval period after sealing	
Prepupae	1.5PP	No feeding, inactive stage	
White eyed pupae	Pw	Pupae with no pigmentation	
Brown eved pupae	Pb	Pupae with brown eyes and no	pigmentation in the thorax

4

Q: queens. doi:10.1371/journal.pone.0040111.t001

DLoS ONE | www.plosone.org

preferentially expressed in the whole body of worker larvae [4], they are not differentially expressed during hind leg development. These genes might play different developmental roles in tissues and organs during development [19–23], however during leg development they may be part of the basic leg patterns in both castes and, therefore, are independent of the environment.

Unlike the other genes evaluated, Ubx was clearly expressed differently between castes, with higher expression in workers during pre-pupa and white-eyed pupal stages than in queens during the same stages (P<0.01). These results suggest that Ubxcould regulate differences in hind leg morphological development between queens and workers.

Immunolocalization of Ubx in the Developing Hind Legs of Queen and Worker Honeybees

In different Drosophila species, Ubx regulates, on a fine scale, the differences in bristle and trichome distribution and the morphology of these structures in the hind and middle less [13,24]. To compare the distribution of Ubx expression in the hind legs of queens and workers, we performed immunocytochemistry staining using a antibody that detects conserved epitopes in Ubx and Abd-A proteins, the mouse monoclonal antibody FP6.87 [25], and DAPI. At the pre-pupal stage, our results showed that the Ubx protein is localized in two segments of the worker hind legs whereas in queens, it is localized in only one. Specifically, in workers Ubx is localized to the nucleus of cells in the tibia and basitarsus (Fig. 4B and Fig. 4E), whereas in queens, Ubx is localized only in the basitarsus (Fig. 4G-I).

In the tibia and basitarsus of workers, during pre-pupal stage, some cells are arranged in pairs and the cells are negative for Ubx; these nuclei are larger than the other nuclei in the appendage (Fig. 4A-F). This arrangement is similar to the nuclei of bristle precursor cells, as described by Thurm [26]. However, in queen pre-pupa hind legs, there is no paired arrangement of cells.

In early pupae (Pw) worker hind legs, Ubx is still localized in both the tibia and basitarsus, but it is more evident in the tibia. In the tibia, the previously mentioned paired arrangements of the nuclei express Ubx (Fig. 5A-F). However, in the border of the tibia/basitarsus there is a region negative for Ubx. On the other hand, in the basitarsus, the coupled cells present larger nuclei when compared to the other cells present in same leg segment and do not express Ubx (Fig. 5G-I). In Pw queens, Ubx is expressed only in the basitarsus. Opposite to the previous stage (pre-pupal stage), at pupal stages it is easy to see the paired cell arrangement with one of the nuclei negative for Ubx (detail, Fig. 5M). The distribution of the paired cells in queens and workers resembles the adult hind leg bristle distribution. The pattern of expression of both castes, at pre-pupal and pupal stages, is represented in the cartoon Fig. 6.

Discussion

Bristles on the Tibia of Worker Hind Legs May be Mechanoreceptors

We show here that the bristles of the tibia in the worker hind legs have characteristics suggesting that they are mechanoreceptors. The morphological organization of this type of bristle has been characterized in honeybees by Thurm, [27] working with head mechanoreceptors. A mechanoreceptor (a type of sensillum) consists of cuticular components, a sensory neuron and a sheath of cells, and it is used for the mechanical perception of external stimuli [28]. Any mechanical force exerted on this type of sensory bristle activates nerve endings [27].

DLoS ONE | www.plosone.org

5

July 2012 | Volume 7 | Issue 7 | e40111

Our microarray analysis evidenced three genes related to the development of the sensorial system as up-regulated in the legs of worker prepupae. Two are members of the P450 family (Cyp303a1 and Cyp4g15). One of these is described as related the development and function of sensory organs in Drosophila [29], and the second as associated with nervous system deelopment [30]. The third gene is annotated as a homeobox gene related to sensory organ development, ro, which controls photoreceptor differentiation [17]. The inference is that genes involved in sensory system development are up-regulated in the development of worker hindlegs. This is supported by our SEM results which show that bristles localized to the tibia of worker hind legs have characteristics of sensory organs, whereas the bristles on queen hind legs are much simpler structures. Information on the pollen load on the corbicula would then be conveyed by these mechanoreceptors informing a pollen forager when it is time to return to the hive. Though while plausible, this is still a hypothesis that needs further testing

Two Sets of "Caste-specific" Genes may Underlie Differential Cuticular Morphogenesis and Allow for Pollen-collecting Behavior in Workers

Our SEM results also showed that the cuticle that covers the adult hind leg has caste-specific characteristics. In workers, polygonal scales form the cuticle in this region, whereas in queens, it has a smooth appearance (see Fig. 1). This cuticle diphenism might be controlled by the differential expression of cuticular protein genes because queens and workers up-regulate different sets of these genes. This differential expression of cuticular protein genes may be governed by JH acting through the transcription factor Ftz-f1, which, as we could show, is more expressed in queens than in workers. Ftz-f1, an orphan nuclear receptor, is known to activate cuticular protein genes in *Drosophila* [31,32]. In *A. mellifera*, JH induces the expression of ftz-f1 in queen-destined larvae, thus possibly driving the expression of honeybee cuticular protein genes, up-regulating the expression of honeybee cuticular protein genes, up-regulating the expression of honeybee cuticular protein genes, during a time window when JH titers are up to three times higher in queens than in workers [16]. We could furthermore show that ftz-f1 and the gene GB15046 are more expressed in the legs of queens and that GB15023 is highly expressed in workers at this same time of development. We consider that such differences could explain the differential cuticle formation in the two castes.

As said, we expect the cuticular proteins, which are differentially expressed between castes to be associated with the different cuticle types. Among the cuticular proteins, the CPR family, characterized by the R&R consensus motif [33], is the most abundant one [34]. This family is subdivided into three classes according to the motif present in the consensus region (RR-1, RR-2, RR-3). Whereas RR-1 proteins are related to soft/flexible cuticles and RR-2 proteins to hard/stiff cuticle, the RR-3 proteins cannot be associated with any particular type of cuticle [35]. Using the Cuticle DB [36], classification of the cuticular protein genes expressed during leg development in honeybee castes shows that workers up-regulate two RR-2 genes, whereas queens up-regulate only one RR-1 and another CPR gene that could not be further classified through its Droughila ortholog [37]. Thus, the over-expression of RR-2 genes in workers and the RR-1 gene in queens might be responsible for the rough cuticle of the former and the smooth cuticle of the latter. The rough surface of the worker hind leg

Gene Expression and Leg Diphenism in Honeybees



Figure 3. Transcriptional pattern of abdominal-A, ataxin-2, cryptocephal, dachshund, distal-less, grunge, Retinoic and fat acid Binding protein and ultrabithorax during leg development in A. mellifera castes. Ordinates represent relative transcript levels assessed by QRT-PCR. Data were normalized by ribosomal protein-49. Three biological samples were analyzed in technical duplicates. L4, L5F and L5S: larval stages; L5PP: pre-pupae; Pv: white-eyed pupae; *: significant statistical differences between castes (P<0.01). doi:10.1371/journal.pone.0040111.g003

tibia (cuticle with polygonal scales), together with the pollen basket (see Fig. 1), pollen comb and pollen press, could be biological stratagems allowing efficient pollen-collecting behav-

ior. It is worthy of note that the corbicula is an ancestral character, present already in solitary species of the corbiculate clade, and conserved in the worker caste of these eusocial bees.

PLoS ONE | www.plosone.org
6 July 2012 | Volume 7 | Issue 7 | e40111



Figure 4. Immunolocalization of Ubx (FP6.87 antibody) in honeybee prepupal hind legs. A-F: Ubx is expressed in the tibia and basitarsi of worker pre-pupae. Note that nuclei that do not express Ubx are arranged in a similar pattern to that of bristles in the adult hind leg (arrowhead) (see Figure 1D). G-I: Ubx is expressed only in the basitarsi of queen pre-pupae hind legs. In blue: DAPI; in red: Ubx; Tar: tarsi; Btar: basitarsi; Tb: tibia. Original scale bars of confocal system. doi:10.1371/journal.pone.0040111.g004

7

Ultrabithorax Expression Pattern During Hind Leg Development Coincides with Bristle Localization in Adults

The theorem is the terminal programs along the anteroposterior axis of bilaterian animals [38-40]. Besides conservation in sequence and expression domains, changes in Hox gene expression is known to give rise to new structures or even new body patterns during animal evolution, directly linking Hox gene activity with morphological diversity [41-44]. Ubx expression is known to be determined by other transcription factors and auto-regulation [45-46], as well as by epigenetic factors of

DLoS ONE | www.plosone.org

chromatin modification, with Polycomb and Trithorax being amongst the best known Ubx regulators [47]. In Drosphila, the ubiquitin-specific protease 7 (Up7) has also been associated with Ubx expression, with Usp7 being described as a Hox gene transcription inhibitor that, when disrupted, produces strong homeotic transformations in the second thoracic segment resembling Ubx over-expression [48]. Herein we showed that Up7 is preferentially expressed in queen prepupae (microarray experiment). These have lower Ubx mRNA and protein levels, pointing towards Up7 as a candidate regulator of Ubx expression during postembryonic development of honeybees.



Figure 5. Immunolocalization of Ubx (FP6.87 antibody) in honeybee white-eyed pupale hind legs. A-C: Ubx is expressed in the tibia and bastarsi of workers. There is a region in the tibia (which may be the future corbicula) that does not express Ubx. D-I: In the basitarsus and distal portion of the tibia (arrowhead) in workers, there are double nuclei that do not express Ubx, arranged in a similar pattern as that of the bristles in the adult hind leg. J-L: In the hind legs of queen white-eyed pupae, Ubx is expressed only in the basitarsi. In blue: DAPI; in red: Ubx; Btar: basitarsi; Tb: tibia. Original scale bars of confocal system. doi:10.1371/journal.pone.0040111.g005

8

We also showed that Ubx transcripts and its protein product are differentially expressed in queens and workers of A. mellifer during the development of caste-specific hind leg morphology revealed that the pollen basket is formed in a region of the tibia that is free of bristles or trichomes, and it is three where we detected high levels of Ubx in prepupal and early pupal phases. The basitarsus of adult workers shows a linear arrangement of bristles, the pollen comb, and is exactly in this region were Ubx expression was absent in certain cells with large nuclei during early pupal stages of workers. Furthermore, the hind legs of queens are covered with bristles and Ubx expression was absent in certain cells with large nuclei during early pupal stages of workers. Furthermore, the hind legs of queens are covered with bristles and Ubx expression was absent in the respective tibia segment. The distribution of bristles and trichomes and their presence/absence on the hind leg are also controlled by Ubx expression in *Dosophila melanogater* [24] and in related species (*D. simulans* and *D. withil*), where an interesting polymorphism was observed on the femure of the hind leg, "the naked valley" [24]. This region is characterized by high levels of Ubx expression, which is not observed in other species of the group where this region of the leg is covered by trichomes, leading to infer that development of the "naked valley" is dependent on the absence of Ubx expression [24]. This region may thus be considered as ontogenetically equivalent to the pollen basket on the tibia of A. multifica workers.

The point of bristle insertion in the cuticula, the socket, also revealed an important trait. In the worker tibia it has a mechanosensorial-type morphology, similar to that described in *Dosophila*, that was correlated with Ubx localization in different bristle precursor cells in late larval and early pupal stages [13]. In worker honeybees, the localization of Ubx also appears to be associated with the mechanosensorial character of these bristles. These data strongly suggest that the differential expression of Ubx is associated to the acquisition of hind leg-specific morphological traits and the patterning of bristles distribution in honeybees.

A gene regulatory network leading to polyphenism in a social insect was exemplarily investigated by Abouheif and Wray [49] in the ant *Phieldole marrisi* with respect to wing development. In this species, caste determination takes place in three switch points, governed by genetic (the first) and environmental cues (the other two), giving rise to queens, soldiers, and workers, respectively. When analyzing the expression pattern of six genes described as regulators of wing development in *Drosophila*, these authors found that in *P. marrisi* (and in three other ant species) Ubx is always expressed in the hind wing disc/pad during development.

Taken together, these data indicate that the differential expression of Ubx controls alternative appendage development in non-social insects, as well as the acquisition of caste-specific traits in social species, including the honeybee *A. mellijea*.

DLoS ONE | www.plosone.org



Figure 6. Chart of immunolocalization of Ubx in hind legs of pre-pupae and white-eyed pupae of honeybee castes. At pre-pupae workers' hind leg; B: white-eyed pupae queens' hind leg; C: pre-pupae queens' hind leg; D: white-eyed pupae queens' hind leg. In blue: DAPI; in red: Ubx, note that the different red degrees represent the Ubx level observed in the stainings; Tar: tarsi; Btar: basitarsi; Tb: tibia; Fm: femur; Cx-Tr: coxa and tenchered. and trochanter. doi:10.1371/journal.pone.0040111.g006

Conclusions

This study represents, to our knowledge, the first attempt to understand the molecular mechanisms underlying the caste-specific differential development of the hind leg in honeybees. specific differential development of the hind leg in honeybees. We propose that this diphenism is driven by a gene regulatory network where crucial switch genes are differentially expressed in workers and queens, such as certain genes encoding cuticular proteins, members of the cytochrome P450 family, as well as a Ubx. In particular, we showed that temporal and spatial differences in Ubx expression during laval and popal develop-ment appear to be a crucial factor for defining divergent hind leg morphogenesis. Furthermore, these findings should provide a conceptual firamework to test the function of homeotic genes in honeybee caste development. in honeybee caste development.

Materials and Methods

Bees

The honeybee colonies were maintained accordingly to standard beekeeping practices. Workers and queens of the Africanized honeybee *A. mellifera* were collected directly from brood cells. To obtain larvae of the same age; queens were confined for 6 h on combs without young brood. Queen larvae and pupae were obtained by transferring first instar female larvae into queen cups and introducing them back into a regular colony; as described in Barchuk and colaborators [50]. Then, naturally workers were fed with worker jelly and queens with royal jelly, which has substances to induce queen phenotypes such as Royalactin a 57 KDa protein [2]. Worker larvae were staged

. PLoS ONE | www.plosone.org

according to the criteria defined by Michelette and Soares [51], and queen larvae were staged based on Rembold et al. [52]. The developmental characteristics of the larvae used in our work are summarized in Table 1.

Scanning Electron Microscopy

Scanning Electron Microscopy The hind legs from brown-eyed pupae (Pb) of workers and queens were dissected in sterile 0.9% NaCl solution (the pupal cuticle was removed to expose the pharate-adult cuticle) and fixed in Karnovsky's fixative overnight. Then, the legs were washed in In Karnovsky's name overnigm. Then, the regs were wasted an cacodylate buffer and dehydrated using an ethanol washes. After obtaining the critical drying point, the samples were placed on stubs and coated with an ultrathin coating of gold. Samples were visualized and photographed using a Jeol Scanning Microscope ISM (sem) (b). A COBO (1991) (1991) (1991) JSM-5200 (film ACROS 100/120 Neopan - Fujifilm).

Organ Sampling and RNA Extraction

Three pooled samples of hind leg imaginal discs of larvae and pre-pupae (n=20) and hind legs of white-eyed pupae (Pw; n=6-8), dissected in sterile 0.9% NaCl solution, were used for RNA extraction. Total RNA from pupae was isolated using TRIzol[®] reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's TAXAN¹ reagent (invitigen) actorning to the manufacturery instructions. As the larvae imaginal discs provided minor amounts of total RNA, it was done using the GenEluteTM Mammalian Total RNA Kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions. The total RNA were stored in -80°C until the time of use. RNA quantification was done using Nanodrop-1000 (Thermo Scientific).

Table 2. Primer sequences, annealing temperatures and fragment lengths (bp).

Primer pairs	Predicted gene	PRIMER sense	PRIMER antisense	Annealing temperature ("C	Fragment length (bp)
abd-A	GB19738	5'ACAACCACTACCTGACGCG	5'ACTCCITCITCAATITEATC	60	114
atx-2	GB18802	5'ACAACATCCCAACAGTCAC	5'TGTAGGTCGCAAAGGTAATGG	60	162
enc	GB19338	5'GGAGATGIGGAAGCHICTCA	5'AIGGITGIACIGGTIGIAAAGI	60	133
dar	GB17219	S'GCACCTCAGTCACATGCAAT	5'GACATGTICGGGTTCACCTT	62	150
dll	GB14516	5'ACGCCTACGGATATCACCTG	5'CCCTTTAGCGTTCCTCAAG	60	146
gug	GB18685	5'ATTAGTTCTGTGACAGAGGAC	5'CATTCCGTACAGAGCAATAAC	60	158
RIaBP	GB11059	STECAAAGGCTGACGCTCAC	5'TGCCATCGCTGGTGACAGT	60	167
Ubx	GB30077	5'CCCTGGATGGCTATAGCAG	5'GTCAGGCAGAGCGAGTGTG	60	155
np-49	AF441189	5'CGTCATATGTTGCCAACTGGT	S'TIGAGCACGTTCAACAATGG	60	150
B-actin	AB023025	5 TOCCAACACIGICCTITICIG	5'AGAATTGACCCACCAATCCA	60	156

doi:10.1371/journal.pone.0040111.t002

Transcription Profiling Analyses Microarray hybridization. Microarray experir ients vere performed and are described according to the MIAME specifica-tions [53], and the data have been deposited in the Gene Expression Omnibus database (GEO, at NCBI database) under the accession number GSE34293. The microarrays slides design has been described by [54].

One microgram of total RNA isolated from hind leg imaginal disci of pre-puppe was purified using the RNA. Cleanup kit (RNeasy Mini Kit, QIACEN) and amplified using the Amino Allyl MessageAmpTM II aRNA Amplification Kit (Ambion). Twenty micrograms of amplified RNA was labeled with Cy3 or Cy5 dye Amersian Biosciences). Two sets of labeled probes were then hybridized to whole genome oligonucleotide arrays (Functional Genomics Unit of the W.M. Keck Center at the University of Illinois, Urbana-Champaign). Prior to pre-hybridization, each slide was UV cross-linked and plunged in 0.2% SDS, water, and ethanol and then centrifuged at a low speed for 3 min. Pre-hybridizations were carried out for at least 45 min in a warm solution (42°C) containing 20% Formamide, 10% Denhardt's solution 50x, 33.2% SSC 20x, 0.1% SDS and 0.5% tRNA (10 mg/mL) and then rinsed in Milli-Q water, plunged in isopropyl alcohol and dried by centrifugation at low speed for 3 min. Hybridizations were carried out following a loop design with dye-swaps and utilizing two slides. Probes (in 80 μL of 49% Formamide, 49% SSC 20x and 0.2% SDS) were preheated at $55^{\circ}\mathrm{C}$ for 3 min, placed on microarray slides and covered with lifter-slip cover glasses (22 ×60, 31.25 $\mu\mathrm{L}).$ Slides were then placed in single slide hybridization chambers and incubated in a water bath for 17 h at 42°C. The washing procedure included the following steps, $2\times$ SSC and 0.1% SDS; $2\times$ SSC; 0.1 \times SSC and Milli-Q water; shaking manually for 30 s and, all at room temperature. Slides were dried by centrifugation at 2000 rpm for 2 min and scanned using an Axon Genepix 4000B scanner (Molecular Devices) with GENEPIX software 10-micron resolution, Cy3 with Green Laser (532 run) and Cy5 with Red Laser (635 nm).

cDNA synthesis and quantitative RT-PCR (RT-qPCR). One microgram of total RNA from the hind legs of workers and queens staged at L4, L5F, L5S, L5PP and Pw (prior treated with DNasel - Invitrogen) was used to synthesize Inst-stranded cDNA by reverse transcription with SuperScript II Reverse Transcriptase and an oligo $(dT_{12,18})$ primer (Invitrogen)

. PLoS ONE | www.plosone.org

10

July 2012 | Volume 7 | Issue 7 | e10111

To quantitatively compare the levels of gene transcription abd-A, ats-2, or, dae, dll, gug, RfaBp and Ubx between workers and queens, a Real Time quantitative RT-PCR assay was performed using a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Amplifica-tions were carried out in a 20-µL reaction mixture containing 10 μ L of SYBR[®] Green Master Mix 2x (Applied Biosystems), 0.8 μ L of 10 mM of each gene specific forward and reverse primers (Table 2) and 1 μ L of first-strand cDNA samples diluted (1/5) in water. The RT-qPCR conditions were 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C or 62°C (dae) for 1 min. Each of the three biological replicates was run in two technical replicates. To choose the reference gene, we tested the β -actin (β -act) and ribosomal protein 49 (rp-49) genes and the minor expression values were used as references. As described in $[55]_i$ #49 was the best gene for normalizing gene transcription data and was used in our work. Relative quantities of transcripts were calculated using the comparative Ct method (Applied Biosystems, User bulletin#2). The slope, R^3 and efficiency values are presented in the Table S2. Statistical analyses were carried out are presented in the Table S.: Statistical analyses were carried out with the SigmaStat 3.1 software (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA), using Two Way ANOVA with two-tailed probabilities, followed by the Holm-Sidak *past hac* test. The PCR fragment of each gene was cloned, sequenced and aligned using NCBI BLAST tool to check the specificity. All the fragments retrieved the correct and predicted sequence of the gene target.

Bioinformatics

Gene annotation. The genes analyzed in this work were manually annotated, and the primers were designed using Artemis platform [56]. To confirm primers specificity, the PCR target fragments were sequenced.

Microarrays analyzes. Images obtained after scanning hybridized microarrays were processed using ScanAlyze (Rana [http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm]) with default parame-ters. All normalizations and fold-change calculations were performed using functions in the library *Limma* of the R/ Bioconductor package (R Development Core Team, 2005) as described in Barchuk and others [4]. After statistical analyses $(\alpha < 0.05; B > 0)$ and cutting off values from spots with low intensity signals (compared to empty spots), was selected a list of 200 differentially expressed genes (DEGs). All DEGs with *Drasaphila* orthologs were annotated according to the Gene Ontology terms for Biological Process and Molecular Function [57], using the FatiGO web tool [58]

Immunocytochemistry

Leg staining (DAPI/FP6.87) was performed according to Patel [59], with modifications. The anti-Ubx antibody used herein has previously been used to characterize Ubx expression during honeybee embryogenesis [60] Samples were dissected in sterile 0.9% NaCl and fixed in two different solutions: first with 2% paraformaldehyde in n-heptane and then in 2% paraformaldehyde containing 0.1% Tween-20. Samples were then permeabi-lized with 0.5 Triton X-100 in PBS and blocked with 0.1% BSA and 5% normal goat serum. Ubx protein expression was detected by incubating legs for 16 hours at 4°C with mouse monoclonal antibody FP6.87 [25], kindly provided by Dr. R. White (University of Cambridge), followed by the addition of Cy3 (Jackson Immunoresearch, 1:300 dilution) goat anti-mouse. Pupal legs were incubated for 30 hours at 4°C, whereas pre-pupal legs were were included to 30 nours at 4°C. The negative control was incubated incubated for 12 hours at 4°C. The negative control was incubated without the primary antibody (see Figure S1). The specimens were washed with 0.5% Triton X-100 in PBS, and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma) staining was then performed at room temperature for 4 min, followed by another wash series in PBS with 0.5% Triton X-100. The legs vere mounted in 80% Glycerol and analyzed using a Leica TCS-SP5 scanning confocal microscope.

Supporting Information

Figure S1 Negative control of immunolocalization of Ubx (FP6.87 antibody) in honeybee worker prepupal hind leg. A: DAPI; B: incubated without anti-Ubx antibody

References

- Moczek AP, Sultan S, Foster S, Ledon-Rettig C, Dworkin I, et al. (2011) The role of developmental plasticity in evolutionary innovation. Proc Biol Sci. England: This journal is 2011 The Royal Society. 2700 2713.
 Kamakura M (2011) Royalactin induces queen differentiation in honeybees. Nature 473: 478 480.
 Hattfelder K, Emlen DJ, Lawrence IG (2012) 11 Endocrine Control of Insect Dolphenism. Insect Endocrinology. San Diego: Academic Press. 464 522.
 Barchuk AR, Cristino AS, Kucharski R, Costa LF, Simose ZLP, et al. (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybeer. Apps mellifera. Barc Development all Gology 7.
 Haydak MH (1943) Lauval food and development of castes in the honeyber. Distribution of a queen: TOR pairway 54: 679 792.
 Michener CD (2000) The bees of the world. The bees of the world. pp. 1.
 Datel A, Fondrik MK, Kaflanogik O, Emore C, Huut G, et al. (2007) The making of a queen: TOR pairway is a key player in diphenic caste development. ELos One 2: e509.
 Doch 2: hartfelder K, Ammeier P, Rosenkranz P, Engels W (1996) Caste during in and cephalic volatile in the honey bee (Apis mellifera carrica). Journal of Apicultural Research 37: 183 190.
 Mutti NS, Dolezal AG, Wolschin F, Mutti JS, Gill KS, et al. (2011) IIS and fOR nattiene-signaling pathways act via juvenial homemote to influence honey bee caste fate. The Journal of Experimental Biology 214: 3977 3284.
 Matti NS, Dolezal AG, Wolschin F, Mutti JS, Gill KS, et al. (2011) University of Knasa Science Bulletin 54: 57 164.
 Makono NS, LI, F. Ponakic A (2004) Differential expression patterns of the hox gene acassociated with differential growth of insect tinal less. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United Staves of America 104 427.

- Autenerer CD (1989) Classification of the Apidae (Hymenoptera). University of Kanass Science Bulletin 54: 75 164.
 Mahfoor NS, Li H, Popadic A (2004) Differential expression patterns of the hox gene are associated with differential growth of inset hind lags. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 4877 4882
- 4662.
 Cohen SM, Jurgens G (1969) Proximal-distal pattern formation in Drosophila: cell autonomous requirement for Distal-less gene activity in limb development. EMBO J 8: 2045 2055.
 Rozowski M, Akam M (2002) Hox gene control of segment-specific bristle patterns in Drosophila. Genes & Development 16: 1150–1162.
 Snodgrass RE (1956) Anatomy of the honey bee. Anatomy of the honey bee: xiv +334.
- +334
- +334.
 15. Ford DM, Hepburn HR, Moseley FB, Rigby RJ (1961) Displacement sensors in the honeybee pollen basket. Journal of Insect Physiology 27: 339-&.
 16. Rachinsky A, Strambi G, Strambi A, Hartfielder K (1960) Caste and metamosphesic henohympi titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. Gen Comp Endocrinol 79: 31–38.

DLoS ONE | www.plosone.org

(FP6.87); C: merge. In blue: DAPI; in red: Ubx; Tar: tarsi; Btar: basitarsi. Original scale bars of confocal system. (TIF)

Table S1 List of the top 200 differentially expressed genes between workers and queens' hind legs at prepupal stage. (XLSX)

Table S2 Slope, R2 and efficiency values for each pair of primers used herein. (DOCX)

Acknowledgments

We thank Luiz Roberto Aguiar for technical assistance in the apiary of Ribeirão Preto; Marcela A.F.B. Laure for technical assistance during Ribeirão Prêto; Marcela A.F.B. Laure for technical assistance during dissections; José Augusto Maulin and Maria Dolores Seabra Ferreira for help with the scanning electron microscope; Dr. Rodrigo Panepucci for the Axon Genepix 4000B scanner; Lenaldo Branco Rocha for help with Laser Confocal Microscopy (facility at FMRP-USP (FAPESP grant number 2004/03868-0]]; Robert White for the FP6.87 antibody and Ricardo G. P. Ramos for secondary antibaction in the troop antibody and related 60.1. Ramos for secondary antibactions. We also thank Dr. Alexandre S. Cristino for his help with the Limma package for microarray analyses, and Dr. Klaus Hartfelder and anonymous reviewers for critical comments on an earlier version of this manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ADB ARB ZLPS. Performed the experiments: ADB LMM. Analyzed the data: ADB. Contributed reagents/ materials/analysis tools: ZLPS. Wrote the paper: ADB ARB ZLPS.

- Pepple KL, Atkins M, Venken K, Wellnitz K, Harding M, et al. (2006) Two-step selection of a single &B photoreceptor: a bitable loop between senseless and rough locks in R8 fat. Development T3:5: 4071 4079.
 Kojima T (2004) The mechanism of Drosophila leg development along the proximodiata axis. Development T3:0:4071 4079.
 Kojima T (2004) The mechanism of Drosophila leg development along the polyplutamine disease genes CA2 is a doage-sensitive regulator of actin filament formation. Genetics 162: 1687 1702.
 Hwes RS, Schaefer AM, Taghert PH (2000) The cryptocephal gene (ATF4) encodes multiple basic-leucine zipper proteins controlling molting and metamorphosis in Drosophila. Genetics 155: 1711 1723.
 Jouss C, Averous J, Bruhat A, Cararov V, Mordler S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochemical and Biophysical Research Communications 313: 447 452.
 Mardon G, Solomon NM, Ruhin GM (1994) Dachshund encodes a nuclear-protein required for normal eye and leg development in Drosophila. Developmental Biology 791: 278 230.
 Stern DL (1996) A role of Ultrabithorax in morphological differences between Drosophila apecies. Nature 364: 463 466.
 Keih R, Weinziel ROJ, Whit CRAH, Akam M (1994) Homeotic gene expression in the locust Schistocerca: an antibody that detects conserved pripores in Ultrabithorax and Abdominal-A proteins. Developmental Genetis 15: 19 31.
- epitopes in Ultrabilitorax and Abdominal-A proteins. Developmental Genetics 15: 19 31.
 Lees AD, Waddingon CH (1942) The development of the bristles in normal and some mutant types of Drosophila melanogaster. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 131: 87–110.
 Thurm U (1964) Mechanoreceptors in cuicle of honey bee fine structure + stimulus mechanism. Science 145: 1063 1065.
 McIver SB (1973) Structure of cuicinlar mechanoreceptors of Arthropods. Annual Review of Entomology 20: 381 307.
 Willingham AT, Keil T (2004) A tissue specific cytochrome P450 required for the structure and function of Drosophila melanogater, CVP4G15, expressed in the nervous system. Biochemical and Biophysical Research Communications 273: 1132 1137.
 Kawasaki H, Hirose S, Ueda H (2002) beta FTZ-F1 dependent and independent activation of Edg78E, a pupal cuicle gene, during the early metamorphic period

July 2012 | Volume 7 | Issue 7 | e40111

11

in Drosophila melanogaster. Development Growth & Differentiation 44: 419

- in Drosophila melanogaster. Development Growth & Differentiation 44: 419 425.
 Kayaahima Y, Hirore S, Ueda H (2005) Anterior epidermis-specific expression of the cuticle gene EDG84A is controlled by many cis-regulatory elements in Drosophila melanogaster. Development Genes and Evolution 215: 545 552.
 Reberg JE, Riddförd LM (1968) Structure and Expression of a Manduca-Sexta Larval Cuticle Gene Hornologous to Drosophila Cuticle Genes. Journal of Molecular Biology 203: 411 423.
 Willis JH (2010) Structural cuticular proteins from arthropods: Annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. Insect Biochemistry and Molecular Biology 40: 189 204.
 Andersen SO (2011) Are structural proteins in insect cuticles dominated by intrinsically disordered regions? Insect Biochemistry and Molecular Biology 41: 620 e627.
 Magkrioti CK, Spyropoulos IC, Iconomidou VA, Willis JH, Harnodrakas SJ (2004) cuticleDB: a relational database of Arthropod cuticular Biology 41: 620 e627.
 Magkrioti CK, Spyropoulos IV, Iconomidou VA, Cornama RS, Hamodrakas SJ, et al. (2007) Drosophila cuticular proteins with the R&R Consensus annotation and elassification with a new tool for discriminating R&I and R&-2 sequences. Insect Biochem Mol Biol 37: 754 760.
 McGinnis W, Krumlauf R (1992) Homeobox genes and axial patterning. Cell 66: 283 200.

- 283 302.
 Alonso CR (2000) Hox proteins: Sculpting body parts by activating localised cell death. Current Biology 12: R376-R378.
 Pearon JG, Leronso D, McGinnis W (2005) Modulating Hox gene functions during animal body patterning. Nature Reviews Genetics 6: 893 504.
 Lewis EB (1978) Gene complex controlling segmentation in Drosophila. Nature 276: 555 520.
- 276: 565 570.

- 276: 565 570.
 Holland PWH, Garcia/Fernandez J (1996) Hox genes and chordate evolution. Developmental Biology 173: 382 396.
 Galant R, Carroll SB (2002) Evolution of a transcriptional repression domain in an inset theor protein. Nature 415: 910-913.
 Ronshaugen M, McGinnis N, McGinnis W (2002) Hox protein mutation and macroevolution of the inset body plan. Nature 415: 910-913.
 Garaulet DL, Foronda D, Calleja M, Sanchez-Herrero E (2008) Polycomb-dependent Ultrabitorax Hox gene silencing induced by high Ultrabithorax levels in Drosophila. Development 133: 3219-3228.

- Crickmore MA, Ranade V, Mann RS (2009) Regulation of Ubx expression by epigenetic enhancer silencing in response to Ubx levels and genetic variation. PLoS Genet 5: e1000633.
 Ringrote L, Paro R (2004) Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. Annu. Rev Genet 38: 413-443.
 van der Knaap JA, Kumar BRP, Moshikur NM, Langenberg K, Krijgsveld J, et al. (2005) GMP synthetase stimulates histone H2B deubiquitylation by the epigenetic silencer USPY. Molecular Cell 17: 695-707.
 Abouheff E, Wray GA (2002) Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants. Science 297: 249-252.

- Abouheff E, Wray GA (2002) Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants. Science 297: 249 252.
 Barchuk AR, Bitondi MM, Simoes ZL (2002) Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupse of Apis mellifera. J Intect 50: 21.
 Michelette ERD, Soares AEE (1993) Characterization of preimaginal de-velopmental stages in a africanized honey-bee workers (Apis-mellifera L). Apidologis 24: 431 440.
 Rembold H, Kremer JP, Uhich GM (1980) Characterization of post-embryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, Apis-mellifera L Apidologis 11: 29 38.
 Berama A (2009) Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) Successes, Failures, Challenges. Thescientificworldjournal 9: 420 423.

- 423
- Johnson RM, Evans JD, Robinson GE, Berenbaum MR (2009) Changes in

- Johnson RM, Evans JD, Robinson GE, Berenkuum MR (2009) Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (Apis mellifera). Proc Natl Acad Sci U S A 166: 14790-14795.
 Lourenco AP, Mackert A, Cristino AD, Simoes ZLP (2008) Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, Apis mellifera, by quantitative real-time RT-PCR. Apidologie 39: 372-U333.
 Rutherford K, Parkhill J, Cocok J, Horsnell T, Rice P, et al. (2000) Artemis sequence visualization and annotation. Bioinformatics 16: 944-945.
 Asbhurner M, Ball CA, Blake JA, Bosterin D, Budler H, et al. (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. Nature Genetics 25: 25-29.
 Al-Shahurour F, Diaz-Uriter R, Dopaza J (2004) FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. Bioinformatics 20: 578-580.
 Patel NH (1994) Imaging neuronal subsets and other cell types in whole-mount Drosophila embryos and larvae using antibody probes. Methods Gcll Biol 44: 445 467.
 Walldorf U, Binner P, Freig R (2000) Hox genes in the honey bee Apis mellifera. Dev Genes Evol 210: 483-492.
- 445 487. Walldorf U, Binner P, Fleig R (2000) Hox genes in the honey bee Apis mellifera. Dev Genes Evol 210: 483 492.

DLoS ONE | www.plosone.org

12

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

ANA DURVALINA BOMTORIN

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO RIBEIRÃO PRETO AV. BANDEIRANTES, 3900 CEP 14049-900 EMAIL: anadurvalina@usp.br