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

**Identificação e validação das interações miRNA-mRNA durante a fase de
desenvolvimento pré-imaginal de *Apis mellifera***

THIAGO DA SILVA DEPINTOR

**Ribeirão Preto
2018**

THIAGO DA SILVA DEPINTOR

Identificação e validação das interações miRNA-mRNA durante a fase de desenvolvimento pré-imaginal de *Apis mellifera*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: GENÉTICA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Zilá Luz Paulino Simões

Ribeirão Preto

2018

Apoio Financeiro:

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do projeto inscrito sob processo número: 2016/06657-0, além de bolsa concedida ao candidato (Proc. Nº: 2016/13854-6).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Thiago da Silva Depintor

Título da Dissertação: Identificação e validação das interações miRNA-mRNA durante a fase de desenvolvimento pré-imaginal de *Apis mellifera*

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

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Dra. Zilá Luz Paulino Simões por ter me concedido essa oportunidade de trabalhar com ela e com as abelhas, uma área fascinante.

Também sou muito grato à Dra. Flávia Cristina de Paula Freitas, teria sido muito diferente se não tivesse sua ajuda, tanto na aprovação do projeto quanto no desenvolvimento e também finalização do mesmo.

À Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi, que também sempre esteve disposta a tirar dúvidas relacionadas a metamorfose. Também agradeço sua orientação com os tratamentos hormonais realizados.

Sou muito grato à equipe do **LBDA** em geral, a Dra. Vera e em especial Profa. Dra. Anete, sempre solícita a ajudar resolver problemas com experimentação principalmente relacionados a qPCR. Também aos amigos que aqui trabalham: Joseana, Danielle, Francience, Lucas, Leonardo, Nicole e Fernanda. Sou muito grato a esse laboratório, pela estrutura tanto física quanto intelectual que aqui eu encontrei.

Deixo meus agradecimentos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pela bolsa concedida (Proc. 2016/13854-6) e também pelo projeto concedido (Proc. 2016/06657-0).

Também agradeço ao Serviço de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP pela concessão de auxílio para eventos no exterior, em especial a chefe administrativo Ana Paula Barros Zana, que pacientemente atendeu todos os meus questionamentos.

Agradeço à Universidade de São Paulo, pela estrutura física concedida, também a coordenação do programa de Pós-Graduação em Genética (Profa. Dra. Ester Silveira Ramos) e à chefia do Departamento de genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões), pelo apoio concedido para realização deste trabalho.

Agradeço também a todos os funcionários que trabalham no Depto. garantindo desde segurança até limpeza para o bom andamento de nossos projetos de pesquisa. Em especial a secretaria do departamento, Susie, que cuida de toda a parte burocrática envolvida.

Agradeço também aos amigos que fiz em Ribeirão, tanto na igreja Adventista do Sétimo Dia, quanto na Universidade de São Paulo. Em especial aos amigos mais chegados: Fábio, Flávia, Luana, Fabiano, Robertinho e Prof. Dr. Aguinaldo Simões que me fez e faz acreditar cada dia mais que meu time nunca vai chegar a lugar algum!!!

Agradeço também a minha família, minha mãe e meu pai em especial que sempre estiveram ali segurando as pontas e dando o alicerce para o desenvolvimento dessa dissertação. Não menos importante a minha irmã que sempre me amou incondicionalmente, além da melhor tia do mundo (Tia Sandra) que sempre esteve ali para garantir que nenhum problema (\$) me atrapalhasse.

Finalmente, à Deus, por prover tudo que sempre precisei.

“Nada é tão perigoso quanto a certeza de ter razão...”

François Jacob (Geneticista), Nobel de Fisiologia ou Medicina (1965).

Sumário

1 - INTRODUÇÃO	12
1.1 O desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i> : Transição entre os diferentes estágios....	12
1.2 As abelhas <i>A. mellifera</i> como modelo de estudo.....	13
1.3 O papel dos hormônios morfogenéticos no desenvolvimento dos insetos: Hormônio Juvenil e Ecdisona	14
1.4 O papel dos microRNAs no desenvolvimento dos insetos.....	19
2 - OBJETIVO	22
2.1 Objetivos específicos	22
3 - MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Análise do perfil de expressão de genes responsivos aos hormônios morfogenéticos ao longo do desenvolvimento pré-imaginal.....	23
3.1.1 Padronização do horário de coleta do material biológico	23
3.1.2 Anotação gênica e <i>primers</i> utilizados	26
3.1.3 Extração de RNA.....	27
3.1.4 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	28
3.1.5 PCR quantitativa	29
3.1.6 Normalização e análise dos dados de expressão dos genes candidatos	29
3.2 Efeitos do tratamento hormonal sobre genes e miRNAs em pupas (<i>Pw/Pb</i>).....	30
3.2.1 Tratamento com hormônio juvenil	30
3.2.2 Tratamento com ecdisona	31
3.2.3 Síntese de cDNA dos miRNAs.....	32
3.2.4 Normalização e análise dos dados de expressão dos miRNAs.....	33
3.2.5 Análise estatística.....	33
3.3 Investigação <i>in silico</i> do papel regulador dos miRNAs sobre os genes do desenvolvimento.....	34

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Expressão dos genes <i>Usp</i>, <i>EcR</i>, <i>gce</i>, <i>inr2</i>, <i>ftz-f1</i>, <i>Kr-h1</i>, <i>chd64</i> durante o desenvolvimento pré-imaginal de <i>A. mellifera</i>	35
4.1.1 Escolha do gene Normalizador.....	35
4.1.2 Estrutura dos genes do desenvolvimento.....	35
4.1.3 Perfil de expressão dos genes do desenvolvimento	37
4.2 Efeito temporal do tratamento com hormônios HJ III e 20E sobre genes de resposta	46
4.2.1 Validação do tratamento hormonal através do fenótipo	46
4.2.2 Efeito dos tratamentos hormonais sobre a expressão relativa dos genes <i>Usp</i> , <i>Ecr</i> , <i>inr2</i> , <i>ftz-f1</i> , <i>Kr-h1</i> , <i>chd64</i> e <i>gce</i>	49
4.3 Efeito do tratamento hormonal sobre a expressão relativa dos miR-252a, miR-252b, miR-281 e miR-34	56
4.3.1 Predição de sítios de interação entre os miRNAs: miR-34, miR-281, miR-252a e miR-252b e os genes <i>Usp</i> , <i>EcR</i> , <i>inr2</i> , <i>ftz-f1</i> , <i>Kr-h1</i> , <i>chd64</i> e <i>gce</i>	57
4.3.2 Expressão relativa do miR-34, miR-281, miR-252b e miR-252a perante tratamento com hormônios HJ III e 20E	58
5 - CONCLUSÃO	64
6 - REFERENCIAS	65
ANEXO I	77

RESUMO

DEPINTOR, T. S. **Identificação e validação das interações miRNA-mRNA durante a fase de desenvolvimento pré-imaginal de *Apis mellifera***. 2018. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O desenvolvimento em insetos é coordenado majoritariamente pela ação de dois grandes hormônios: HJ e 20E. Esses hormônios desencadeiam cascatas gênicas resultando em mudanças fenotípicas, fisiológicas e comportamentais. Além dos hormônios, os miRNAs também atuam sobre a expressão desses genes componentes das cascatas de resposta aos hormônios durante o desenvolvimento nos insetos. Neste estudo objetivamos analisar a relação entre hormônios e genes, hormônios e miRNAs e genes e miRNAs, em estágios finais do desenvolvimento de *Apis mellifera*. O perfil de expressão dos fatores de transcrição *Usp*, *ftz-f1*, *EcR*, *chd64*, *inr2*, *Kr-h1*, *gce* e os regulares putativos miR-34, miR-281 e miR-252b foram avaliados a partir do 5 estágio larval até adultos recém emergidos, por meio de RT-qPCR. Também avaliamos o efeito de doses exógenas de HJ III e 20E sobre o desenvolvimento pupal (Pw e Pb). A maioria dos genes testados mostraram responder as variações hormonais nos estágios pupais tal qual respondem em estágios larvais. Contudo, *gce* e *chd64* mostraram responder diferente as variações hormonais em estágios pupais, sugerindo assim, que estes podem desempenhar papel diferente nos estágios finais do desenvolvimento. O *gce* que é um receptor nuclear de HJ em insetos, mostrou rápida resposta ao tratamento com 20E e não respondeu ao tratamento com HJ, semelhantemente o *chd64* também não respondeu aos tratamentos com HJ. Nossos dados ainda apontam *Usp* como um gene de resposta imediata (*early gene*). O miR-34 e o miR-281 são fortes candidatos a reguladores chave na metamorfose, uma vez que estes apresentam interações (*in silico*) com a maioria dos genes aqui estudados, além de responderem ao tratamento hormonal para ambos os hormônios. Este estudo caracteriza componentes da rede regulatória do desenvolvimento pupal em abelhas melíferas.

Palavras-chave: miRNA, desenvolvimento, metamorfose, expressão genica, *Apis mellifera*.

ABSTRACT

DEPINTOR, T. S. **Identification and validation of miRNA-mRNA Interactions during pre-imaginal phases of *Apis mellifera***. 2018. 77 f. Master's thesis – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The development in honeybees is mainly controlled by the action of two major hormones, juvenile hormone (JH) and 20-hydroxyecdysone (20E). These hormones trigger gene cascades, which results in phenotypic, physiological and behavioral changes. Besides hormones, a class of non-coding RNAs, the microRNAs, regulates gene expression at a post-transcriptional level during insect development. In this study we aimed to analyze the relationship between developmental genes and morphogenetic hormones, in final stages of the development of *Apis mellifera*. The expression profile of the orphan nuclear receptor *Usp*, *ftz-f1*, *EcR*, *chd64*, *inr2*, *Kr-h1*), *gce*, *early-trypsin*, and their putative regulators miRNA-34, miRNA-281, miRNA-252a and miRNA-252b were assessed from 5^o instar larvae to newly emerged adults by qPCR. The effect of exogenous doses of both hormones applied on white eyed pupae (Pw) and brown eyed pupae (Pb) was also tested. Most of the genes seem to respond to hormonal variation in pupal stages as they do in larval stages. However, *gce* and *chd64* showed a different response to hormonal treatment in pupal states, thus suggesting they play different roles in final stages of development. Unexpectedly *gce*, which is a nuclear receptor of JH in insects, showed a quick response to 20E treatment and no response to JH in pupal stages of honeybees, as well as *chd64* which also responded only to the 20E treatment. In addition, we recognized *Usp* as an Immediate Early Gene, for it responded rapidly to hormonal treatments and quickly restored its level. In addition, we find the miR-34 and miR-281 as strong candidates of regulators since they presented many putative interactions in the 3'UTR of the candidate genes and showed to be affected by the hormonal treatment. This study describes new components to the regulatory network that regulates bee development.

Key words: miRNA, development, metamorphosis, gene expression, *Apis mellifera*.

1 - INTRODUÇÃO

Insetos holometábolos possuem metamorfose completa, sendo seu desenvolvimento marcado por fases como ovo, larva, pupa e imago (ou adulto). A transição entre essas fases do desenvolvimento é marcada por profundas alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais induzidas pela ação de hormônios morfogenéticos sobre complexas redes gênicas (Santos et al., 2001; Dubrovsky, 2005; Gilbert & Barresi, 2016). Sendo a metamorfose é um processo marcante nos insetos, em especial os insetos holometábolos, do qual faz parte nosso modelo *Apis mellifera*.

1.1 - O desenvolvimento das abelhas *Apis mellifera*: Transição entre os diferentes estágios.

Durante o desenvolvimento das abelhas melíferas o ovo eclode passa por 10 estágios larvais (L1 – L4, L5F1 – L5F3, L5S1 – L5S3), 3 fases pré-pupais (PP1 – PP3) e 7 fases pupais (Pw, Pp, Pdp, Pb, Pbl, Pbm e Pbd). A passagem de um estágio para outro é marcado pela muda, que consiste na síntese de uma nova cutícula logo abaixo da cutícula velha. A cutícula velha é digerida e as partes não reaproveitáveis serão eliminadas (Nijhout, 1994), para que haja a síntese de cutícula nova é necessário que antes de tudo ocorra a separação entre a cutícula e a epiderme gerando espaço para síntese da nova, processo denominado de apólise. Todo o evento da muda pode ser dividido em quatro etapas sequenciais: 1) apólise; 2) proliferação celular e rearranjo da camada epidérmica; 3) síntese da cutícula nova e digestão da anterior; 4) ecdise, que é a eliminação da cutícula antiga. No período compreendido entre a apólise e a ecdise o indivíduo é designado de farato (encoberto), fase em que uma nova forma se diferencia ainda envolta pela cutícula da forma anterior (Hinton, 1946), A transição entre os estágios larvais é chamada de muda larval; a transição de pré-pupa para pupa é chamada de muda metamórfica e da última fase pupal para a emergência do adulto é chamada de muda imaginal (Gilbert & Barresi, 2016).

A partir da muda metamórfica, externamente o indivíduo já possui a forma e todas as características do imago ou inseto adulto, faltando apenas esclerotização e pigmentação da

cutícula e o desdobramento das asas. Contudo, internamente muitas mudanças ainda estão por ocorrer, entre elas: reconstrução de musculaturas, desenvolvimento do sistema reprodutivo (Snodgrass 1984). Em outras palavras, internamente há uma reorganização dos sistemas que antes eram funcionais para uma larva, para agora compor um inseto adulto.

O nicho ecológico e o *habitat* que ocupam uma larva e um imago são completamente diferentes, sendo estas diferentes fases (Larva e imago) expostas a diferentes mecanismos epigenéticos. Isso nos leva a pensar que possam existir genes que se comportem diferentemente de acordo com os diferentes estágios do desenvolvimento nas abelhas melíferas.

1.2 - As abelhas *A. mellifera* como modelo de estudo

As abelhas da espécie *A. mellifera* (Linnaeus) classificadas dentro da classe Insecta, pertencem à ordem Hymenoptera (superfamília Apoidea) e fazem parte da família Apidae, tribo: Apinae (Culliney, 1983). Esses organismos formam colônias com um grau de organização elevado, de forma que há distribuição de tarefas entre os indivíduos que variam de acordo com a casta e com a idade que o organismo possui (Winston, 2003). A determinação do sexo nos himenópteros é de acordo com a ploidia do ovo gerado, os machos se originam de ovos não fecundados e fêmeas de ovos fecundados, sendo os machos haploides e fêmeas diploides. Em *A. mellifera*, o alimento é o fator determinante da casta, ou seja, as larvas destinadas a rainhas são alimentadas diferencialmente daquelas destinadas a serem operarias, resultando em drásticas alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais. Cada casta possui um período de desenvolvimento diferente, rainhas tem o período de desenvolvimento em torno de 16 dias, operarias em torno de 21 e machos por volta de 24 dias (Winston, 2003), dados aproximados que podem variar de acordo com a temperatura, umidade (Fukuda & Sakagami, 1968) e subespécie a qual pertence (Garófalo, 1977). No Brasil predomina um híbrido entre subespécies europeias e africanas altamente africanizada (Whitfield et al., 2006) o qual denominamos

“abelhas africanizadas”, que possui um período de desenvolvimento de aproximadamente 19 dias (Michelette & Soares, 1993).

Possuir a biologia bem compreendida favorece o uso das abelhas melíferas como organismo modelo, mas outros fatores também reforçam que indivíduos pertencentes a este grupo são ótimos modelos para experimentação laboratorial. Primeiramente, o período de desenvolvimento dessas abelhas é relativamente curto, aproximadamente 19 dias para operárias (Michelette & Soares, 1993), facilitando o processo de obtenção das amostras, além de possibilitar estudos que envolvam mais de uma geração. Outro ponto a favor, é que as diferentes fases do desenvolvimento pupal (objetivo deste trabalho) são bem marcadas e facilmente distinguíveis, o que significa que em qualquer coleta podemos determinar sem muita dificuldade a idade do indivíduo. *A. mellifera* também possui o genoma sequenciado (*Honeybee Genome Consortium*, 2006; Elsik et al., 2014) sendo este talvez, um dos maiores pontos a favor deste organismo como modelo de estudo, facilitando estudos de natureza molecular, seja para desenho de primers, identificação de sequências, localização de sequências no genoma, dentre outros.

Consequentemente, a literatura por trás do modelo *A. mellifera* é muito rica e diversa, sendo a subárea genética, muito bem explorada pelos diversos grupos de pesquisa espalhados pelo mundo; em especial, trabalhos envolvendo os dois principais hormônios que controlam o desenvolvimento em insetos, tema de interesse que será discutido ao longo deste estudo.

1.3 - O papel dos hormônios morfogenéticos no desenvolvimento dos insetos: Hormônio Juvenil e Ecdisona

Nos insetos, os principais hormônios responsáveis por induzir e controlar mudanças no desenvolvimento são o sesquiterpenoide hormônio juvenil (HJ) e o esteroide 20-hidroxiecdisona (20E) (revisto por Jindra et al., 2013; Henrich et al., 1999) que oscilam periodicamente (Areiza et al., 2015) e assim definem a transição entre as fases do desenvolvimento (Nijhout, 1998;

Dubrovsky, 2005). O HJ é produzido pelos *corpora allata*, um par de glândulas localizado no sistema retrocerebral dos insetos (Wigglesworth, 1940; Riddiford, 1994). O hormônio 20E é sintetizado pelas glândulas protorácicas em resposta ao hormônio protoracicotrópico (PTTH) que é sintetizado por um par de células neurosecretoras cerebrais e é armazenado e secretado pelas glândulas *corpora cardiaca* (Agui et al, 1979; Hartfelder, 1993; Gilbert & Barresi, 2016). O balanço entre os hormônios HJ e 20E é crucial para a definição das mudas nas diferentes fases do desenvolvimento determinando se a muda que deve ocorrer é larval, metamórfica ou imaginal (Gilbert & Barresi, 2016). Na fase larval, o HJ atua como hormônio juvenilizante, seus altos níveis garantem que as mudas que venham a ocorrer sejam larvais prevenindo a ocorrência da muda metamórfica. Próximo a penúltima fase do estágio larval (L5F), os títulos de HJ caem subitamente seguido por um pico na fase de pré-pupa, sinalizando junto com o 20E, o momento da muda metamórfica. Logo em seguida, o HJ cai a níveis próximos de zero, voltando a subir durante a vida adulta quando controla a reprodução (Jindra et al., 2013) e o comportamento (Fahrbach et al., 1996) nos insetos em geral. Os títulos periódicos de 20E são responsáveis pelas mudas larvais, muda metamórfica e muda imaginal, sendo o decaimento nos títulos deste hormônio o que dispara as cascatas de genes responsivos ao 20E (Truman et al., 1983; Kingan & Adams, 2000). Assim o 20E exerce um papel marcante durante o desenvolvimento (Thummel, 1995; Gilbert & Barresi, 2016), além de atuar como um fator de amadurecimento dos *corpora allata* (Areiza et al., 2015). Os perfis dos hormônios HJ e 20E ao longo do desenvolvimento das abelhas *A. mellifera* foram redesenhados a partir de dados publicados por Pinto et al (2002), Rachinsky et al. (1990) e Rembold (1987), os dois primeiros trabalhos foram base para representação dos títulos de 20E e o último para representação dos títulos de HJ na figura 1.

Figura 1. Esquema ilustrativo da variação nos títulos dos hormônios HJ e 20E no desenvolvimento pós-embriônico de *A. mellifera*. O esquema ilustra a ocorrência de quatro mudas larvais (L1-L2, L2-L3, L3-L4, L4-L5F), uma muda metamórfica (L5S-PP-Pw) e fase de adulto farato, moduladas pelo balanço entre 20E e hormônio juvenil (HJ). A amplitude dos picos hormonais não está em escala. Os picos de 20E representados de L1 – L5F não são dados experimentais, e sim preditos com base na função do hormônio. Imagem modificada de *Hernandes, 2016*, atualizada com base nas titulações hormonais obtidas por *Pinto et al., 2002; Rachinsky et al., 1990 e Rembold, 1987*.

Maiores concentrações de ecdisteroides são observadas entre as fases de pré-pupa e pupa de olho rosa seguido de uma queda brusca do hormônio; a queda do 20E induz a esclerotização e o amadurecimento da cutícula para consequente emergência do adulto caracterizando a muda imaginal (Elias-Neto et al., 2011).

A flutuação destes hormônios é o sinal que dispara as cascatas de genes responsáveis pelos eventos bioquímicos e morfológicos que caracterizam o desenvolvimento (Nijhout, 1994). Entre os diversos genes que respondem ao estímulo dos hormônios morfogenéticos, alguns se destacam por possuírem funções bem definidas.

Os genes *ultraspiracle* (*Usp*) e *ecdysone receptor* (*EcR*) codificam receptores nucleares para 20E que formam dímeros e em conjunto com outros fatores de transcrição promovem a transcrição de genes alvos desse hormônio. Além de atuar como receptor de 20E, USP também é um componente primário na via de sinalização do HJ (Yao et al., 1992; Fang et al., 2005; Ament et al., 2012). Quando USP está em sua forma fosforilada, responde à via de sinalização do 20E; quando não fosforilado, USP é deslocado para via de sinalização do HJ (Liu et al., 2011) sendo um forte candidato a formar dímero com a proteína codificada pelo gene *germ-cell expressed* (*gce*).

As proteínas codificadas pelos genes *gce* e *Methoprene-tolerant (Met)* (genes parálogos), agem como receptores nucleares de HJ em *Drosophila melanogaster* (Baumann et al., 2010; Jindra et al., 2015 a), formam dímeros com USP e dão continuidade à via de sinalização do HJ. Este tipo de interação parece ser conservada nos insetos, como observado em *Helicoverpa armigera* (Liu et al., 2011) e também em outras classes de insetos (revisto por Jindra et al., 2013). Em abelhas, apenas uma forma do gene é encontrada, aqui referida como *gce*, a forma ancestral do gene (Li et al., 2010). Estudos nas fases larvais de *A. mellifera* apontam para o GCE como o receptor de HJ (Hernandes, 2013), no entanto o papel deste gene não é totalmente compreendido nessas abelhas. Além de receptores nucleares e fatores de transcrição, o HJ também desencadeia a transcrição de genes alvo, um alvo primário do HJ é o gene *kruppel homolog 1 (Kr-h1)*, que inibe a metamorfose prematura (Lozano & Belles, 2011; Minakuchi et al., 2008). Outro gene que provavelmente tem papel na repressão da metamorfose em *A. mellifera* é o *Early-trypsin (ET)*, pois este tem efeito antimetamórfico em Diptera (*Aedes aegypti*) atuando como parceiro do *Kr-h1* (Jindra et al 2013; Li et al., 2011).

Além dos genes acima descritos, vale ressaltar a proteína MYOPHILIN que está envolvida no *crosstalk* entre esses dois hormônios. A proteína codificada pelo gene *myophilin* em *A. mellifera* é homologa a CHD64 de *D. melanogaster*, possuindo um alto grau de similaridade (100% de cobertura, 79% de identidade). Ao longo do trabalho convencionamos utilizar o nome *chd64*. CHD64 pertence à família das calponinas, possui um domínio Chd de ligação à actina presente no citoesqueleto e em outras proteínas sinalizadoras (Ferjani et al., 2010). Em *H. armigera*, CHD64 foi identificada como uma proteína chaperona presente tanto na via de sinalização de HJ quanto na de 20E. Tal qual USP, CHD64 será fosforilada (via PKC-epsilon, induzida por 20E) sinalizando que esta deverá desempenhar papel na via de sinalização do 20E. Quando não fosforilada (HJ reprime ação de uma proteína quinase C - PKC) deverá participar da via de resposta ao HJ, provavelmente ligada a USP durante o processo de transcrição induzido pelo hormônio HJ (Liu et al., 2011).

Outro gene envolvido nesse *crosstalk* é o *insulin-receptor 2 (inr2)*, que ativa a expressão da 3-hidroxi-3-metil-glutaril Co Enzima A Redutase, uma enzima diretamente envolvida com a biossíntese de HJ (Bellés et al., 2005; Belgacem & Martin, 2007). Juntamente com o 20E, a via da insulina também controla o crescimento larval, etapa fundamental para ocorrência da metamorfose (Orme & Leever., 2005). Por último, o fator de transcrição *fushi tarazu transcription factor 1 (ftz-f1)*, que codifica uma proteína identificada como ativadora da transcrição do gene *fushi tarazu (ftz)* em *D. melanogaster* (Ueda et al., 1990), e que funciona como fator de competência, sendo expresso ao final de cada muda em resposta ao pico de 20E (Broadus et al. 1999). Na figura 2 é proposto um modelo de regulação para *A. mellifera* pelos dois principais hormônios morfogenéticos, seus receptores, genes de resposta e microRNAs em um momento específico do desenvolvimento.

Figura 2. Cascatas desencadeadas por HJ e 20E na regulação da metamorfose em *A. mellifera*. Em seu estado fosforilado, chd64 fosforila USP, sinalizando que USP juntamente com EcR irão atuar como receptor nuclear de 20E que promove a metamorfose. Em seu estado não fosforilado, chd64 não fosforila USP que será deslocado para a via de HJ, onde USP juntamente com GCE atuarão como receptor nuclear de HJ, que ativa kr-h1 e possivelmente ET, bloqueando a metamorfose. O FTZ-F1 atua como fator de transcrição na via de ação tanto de 20E quanto de HJ, interagindo com os receptores de 20E e do HJ. Na imagem ainda são representados os miRNAs e seus prováveis alvos durante a metamorfose. Imagem baseada em dados de Hernandes, 2016; Liu et al. 2011; Jindra et al. 2013.

1.4 - O papel dos microRNAs no desenvolvimento dos insetos

Ainda que os hormônios afetem a expressão de genes que controlam o desenvolvimento, o nível de expressão de um gene não deve ser atribuído apenas às flutuações hormonais. Reguladores pós-transcricionais, como os microRNAs (miRNAs), podem também afetar a expressão gênica. Estas moléculas foram descobertas em 1993 (Lee et al., 1993; Wightman & Ruvkun., 1993) e começaram a ser sistematicamente estudadas a partir de 2000. Desde então muitos trabalhos têm sido publicados como mostrado por Almeida et al. (2011). Os miRNAs são pequenos RNAs não codificadores (21 a 23 nucleotídeos) transcritos pela RNA polimerase II (Kim, 2005). Os transcritos de miRNA primário são processados e dão origem às moléculas de miRNA precursores (pré-miRNA) que apresentam estrutura secundária semelhante a um grampo de cabelo, usualmente denominado "*hairpin*". Os pré-miRNAs são exportados para o citoplasma através de uma proteína transmembrana, a Exportina-5 (Morlando et al., 2008).

No citoplasma os pré-miRNAs serão processados pela enzima DICER1, que cliva o *loop* de uma das pontas do *hairpin* dando origem a um duplex de miRNAs maduros. As moléculas de miRNA maduro são denominadas miRNA-5p e miRNA-3p em referência aos braços de origem no pré-miRNA. Ambas as fitas (3p ou 5p) podem ser funcionais e servir de fita guia ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA Induced Silencing Complex*). RISC é um complexo multiproteico que incorpora as sequências dos miRNA, provendo assim a especificidade necessária para reconhecimento do gene alvo. O que determinará a complementariedade do RISC com a sequência alvo é uma região de aproximadamente 7 nucleotídeos denominada *seed*, que se encontra nas posições 2-8 partindo da extremidade 5' do miRNA (Zamore & Halley, 2005). Na maioria das interações conhecidas até o momento, a região *seed* parecia com sítios localizados na região 3' não traduzida (3'UTR, do inglês *Untranslated Region*) ou na região codificadora (CDS), em raríssimos casos na 5' UTR da molécula de mRNA. (Lucas & Raikhel, 2013; Behura, 2007; Asgari, 2013; Ambros, 2004). O complexo tem como função principal diminuir a expressão do gene por degradação do mRNA ou repressão da

tradução (Hammond et al., 2000) de acordo com a função canônica atribuída aos miRNAs (figura 3).

Figura 3. Biogênese e supressão pós-transcricional dos mRNAs. Os miRNAs são transcritos em pri-miRNA pela polimerase II, o pri-miRNA é processado ainda no núcleo por um complexo de enzimas composto primordialmente pela DGCR8 e DROSHA. Esse primeiro processamento remove a cauda poliA dando origem ao pré-miRNA. O pré-miRNA é transportado para o citoplasma por intermédio da exportina-5 e processado novamente pela DICER1. A DICER1 remove o loop de uma das pontas dando origem ao miRNA duplex ou simplesmente miRNAs maduros. Ambas as fitas (5p ou 3p) podem ser funcionais (fita guia). A fita guia será incorporada ao complexo RISC, que consiste em proteínas argonautas (AGO) e DICER1, o RISC por complementariedade de sequências irá suprimir a tradução dos mRNAs alvo. Figura retirada de Lin & Gregory (2015).

Em insetos, os miRNAs participam na regulação de diversos processos biológicos. Alguns estudos apontam miRNAs com funções durante a metamorfose tal qual observado por Gomez-Orte & Belles em 2009, que verificaram em *Blatella germanica*, que a depleção de DICER1 inibe a metamorfose. Rubio e colaboradores (2012) construíram uma biblioteca de miRNAs utilizando exemplares das duas últimas fases de ninfa (N5 e N6) de *B. germanica* e destacaram 61 miRNAs diferencialmente expressos entre os dois estágios. Dentre estes miRNAs, miR-34, miR-252a,

miR-252b e miR-281 respondem ao HJ em estágios iniciais do desenvolvimento em abelhas melíferas (Hernandes em 2016).

Em 2014 Lozano & Bellés verificaram que a expressão de *Met* em estágios finais do desenvolvimento de *B. germânica* respondia a estímulos diferentes aos de estágios iniciais, em insetos hemimetábolos. Porém em insetos holometábolos também há indícios dessa ocorrência, nos resultados de Minakuchi e colaboradores (2009) podemos ver altas nos níveis de expressão de *Met* em estágios finais do desenvolvimento de *Tribolium castaneum*, evidenciando que nesses estágios o *Met* não esteja respondendo aos títulos de HJ (que são nulos) e sim a outro estímulo, uma vez que no desenvolvimento inicial de *T. castaneum* a expressão de *Met* acompanha os títulos de HJ. Acreditamos que nas abelhas melíferas aconteça de maneira semelhante. Neste trabalho testamos a hipótese de que os eventos do desenvolvimento pré-imaginal (fases finais do desenvolvimento) sejam desencadeados por interações entre HJ e 20E, com os genes e miRNAs candidatos, e que essas interações não sejam exatamente iguais às que ocorrem em estágios iniciais (larvais) do desenvolvimento em *A. mellifera*. Investigamos os principais genes de resposta a estes hormônios que atuam como “maestros” durante o desenvolvimento, os genes: *ultraspiracle (Usp)*, *fushi tarazu transcription factor 1 (ftz-f1)*, *ecdysone receptor (EcR)*, *calponin (chd64)*, *insulin- receptor 2 (inr2)*, *Krüppel homolog 1 (Kr-h1)* e *germ-cell expressed (gce)*; bem como os miRNAs miR-34, miR-252a, miR-252b e miR-28; durante fases finais do desenvolvimento.

2 - OBJETIVO

Identificar e validar a modulação dos genes candidatos e os miRNAs, em resposta aos hormônios morfogenéticos no desenvolvimento pré-imaginal, a partir do 5º estagio larval, fase de tecelagem do casulo (*spinning*) até a emergência dos indivíduos adultos de *A. mellifera*.

2.1 - Objetivos específicos

- Comparar o perfil de expressão dos genes *chd64*, *kr-h1*, *EcR*, *ftz-f1*, *inr2*, *Usp*, e *gce* com os títulos dos hormônios HJ e 20E em fases finais do desenvolvimento;
- Testar os efeitos e o tempo de resposta dos genes *chd64*, *kr-h1*, *EcR*, *ftz-f1*, *inr2*, *Usp* e *gce* ao tratamento com os hormônios HJ III e 20E;
- Testar os efeitos e o tempo de resposta dos miRNAs: miR-34, miR-252a, miR-252b, miR-281 ao tratamento com os hormônios HJ III e 20E.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Análise do perfil de expressão de genes responsivos aos hormônios morfogenéticos ao longo do desenvolvimento pré-imaginal*

3.1.1 Padronização do horário de coleta do material biológico

Para testar a relação dos hormônios com o perfil de expressão dos genes candidatos, coletamos amostras biológicas correspondentes a cada fase do desenvolvimento de operárias da abelha africanizada *A. mellifera*, de acordo com classificação proposta por Michelette e Soares (1993), e quantificamos a expressão dos genes ao longo do desenvolvimento pré-imaginal. As abelhas foram mantidas no apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). As amostras, em triplicatas, foram coletadas nas fases escolhidas, a partir do 5º estágio larval (L5), na fase de tecelagem do casulo (*spinning*): (L5S1, L5S2, L5S3), as três fases pré pupais (PP1, PP2, PP3), pupa de olho branco (Pw), pupa de olho rosa (Pp), pupa de olho rosa escuro (Pdp), pupa de olho marrom (Pb), pupa de olho marrom com pigmentação leve no tórax (Pbl), pupa de olho marrom com pigmentação média no torax (Pbm), pupa de olho marrom com pigmentação forte no tórax (Pbd) e adultos recém emergidos (Ne).

Abelhas das fases compreendidas entre L5S1 e Ne foram coletadas em triplicatas. Padronizamos todas as coletas para ocorrerem às 10:00 da manhã com o objetivo de preservar as amostras das variações causadas ao longo do dia por conta dos ritmos circadianos (Di Cara, F., & King-Jones, K., 2013), respeitando sempre a mesma posição do sol para todas as fases. Para isso, foi feito um cálculo retrógrado para determinar o horário de postura de cada fase (figura 4). O cálculo consistiu em somar: (1) o número total de horas necessárias para que a operária atingisse a fase em questão, de acordo com a descrição de Michelette & Soares (1993); (2) o período de confinamento da rainha para realização da postura dos ovos (6 horas) dividido por dois; (3) o intervalo em horas da fase em questão dividido por dois (Fórmula 1). O tempo de postura foi dividido por dois porque não é possível estimar quando a rainha fez a postura do ovo

durante o período de confinamento, logo, usamos como padrão um ponto no meio desse período de 6 horas. E o intervalo da fase também foi dividido por dois para garantir que as larvas/pupas estivessem compreendidas dentro da fase desejada, ou seja, se a larva/pupa estiver atrasada ou adiantada ainda assim estará dentro do estágio de desenvolvimento desejado.

Todos os cálculos foram baseados no período médio de 20 ± 1 dias correspondente ao desenvolvimento das operárias de *A. mellifera* (Michelette & Soares, 1993).

Figura 3. Representação gráfica do tempo necessário para que operárias em desenvolvimento atinjam cada fase do desenvolvimento entre L5S1 e NE. À esquerda o respectivo horário em que cada postura foi realizada ao longo de 24 horas, de modo que as abelhas atinxissem a fase desejada para coleta sempre às 10h da manhã (direita). As linhas pontilhadas indicam o horário da postura e as flechas o momento da coleta.

Fórmula 1. Cálculo do período total necessário para obtenção de fase "x".

$$X = \text{HN} + \frac{1}{2} (\text{IF}) + 3$$

Diagrama explicativo da fórmula:

- X**: Período total da fase "x"
- HN**: Número de horas necessárias até larva/pupa atingir determinada fase.
- IF**: Intervalo de cada fase individual.
- 3**: Período de confinamento da Rainha ÷ 2 (em horas).

O resultado do cálculo do período necessário para cada fase é mostrado na Tabela I. Para obtenção dos indivíduos com idade controlada, a rainha era confinada em uma região do quadro livre de ovos, porém com uma certa quantidade de mel e pólen. Utilizamos uma tela excludora para confinamento da rainha com vãos que permitem apenas a passagem de operárias, que se incumbem da alimentação da rainha durante a oviposição na região limitada pela tela. Para as posturas noturnas (quando as temperaturas são normalmente mais baixas) os quadros eram retirados das colmeias durante o dia e mantidos em estufa (34°C e umidade controlada) para que estivessem na temperatura ideal no momento da postura.

Tabela I. Tabela com resultados das somas individuais para cada fase com coleta programada para 10:00 da manhã (d= dia, h= hora). As cores vermelha, azul e verde remetem às variáveis indicadas pela mesma cor na fórmula 1.

FASE	CÁLCULO DOS PERÍODOS	HORA DA POSTURA
L5S1	7d + 18,9h + 7,5h + 3h = 8d + 5,4h	04:36
L5S2	8d + 9,8h + 3,5h + 3h = 8d + 16,3h	17:42
L5S3	8d + 16,8h + 3,5h + 3h = 8d + 23,3h	10:42
PP1	9d + 0,9h + 7,5h + 3h = 9d + 11,4h	22:36
PP2	9d + 15,8h + 10h + 3h = 10d + 4,8h	05:12
PP3	10d + 12h + 5h + 3h = 10d + 20h	14:00
PW	10d + 21,6h + 20h + 3h = 11d + 20,6h	13:24
PP	12d + 13,9h + 10h + 3h = 13d + 2,9h	07:06
PDP	13d + 9,6h + 7,5h + 3h = 13d + 20,1h	13:54
PB	14d + 0,9h + 20h + 3h = 14d + 23,9h	10:06
PBL	15d + 16,8h + 12,5h + 3h = 16d + 8,3h	01:42
PBM	16d + 16,8h + 20h + 3h = 17d + 15,8h	18:12
PBD	18d + 9h + 10h + 3h = 18d + 22h	12:00
NE	19d + 4,8h + 3h = 19d + 7,8h	02:12

3.1.2 Anotação gênica e *primers* utilizados

Para anotação dos genes deste trabalho utilizamos duas bases de dados: *BeeBase* [(Elsik et al., 2015) hymenopteragenome.org/beebase/] e *National Center for Biotechnology Information* - *NCBI* (ncbi.nlm.nih.gov). Primeiramente, resgatamos a sequência dos aminoácidos (AA) correspondente ao gene de interesse do NCBI, no formato FASTA. Através da sequência de AA obtida, fizemos um **TBLASTN** no *BeeBase* contra o conjunto de dados *Amel_4.5* (*GCF_000002195.4*) *chromosome assembly*. O resultado desse alinhamento retornava as posições dos exons dentro do grupo cromossômico, e o arquivo FASTA da sequência completa do grupo cromossômico em que o gene se encontrava. recuperamos a sequência FASTA do grupo cromossômico e por intermédio da plataforma *Artemis Release 15.0.0* (Rutherford et al., 2000) fizemos o mapeamento das CDS no cromossomo em questão, baseado no resultado do alinhamento citado anteriormente. A posição dos exons obtida através do alinhamento não era exata, ajustes de fronteiras (GT .. AG) entre os exons sempre eram necessários devido a erros do BLAST, esses ajustes eram feitos com base no alinhamento da sequência que estava sendo anotada com a sequência da proteína já curada (BLASTP) existente no NCBI. Ao final realizávamos um **BLASTN** para confirmar também todas as bases.

A Tabela II a seguir, resume as sequências dos *primers* utilizados para amplificação e quantificação dos genes candidatos, os números de acesso que foram obtidos na base de dados *BeeBase* e o tamanho dos fragmentos gerados, estes obtidos a partir da anotação realizada. A maioria dos genes de nosso estudo possuem diversas isoformas, procuramos anotar sempre a isoforma que tivesse a sequência validada no NCBI, ou seja, procuramos evitar predições de genes. Em casos de genes não validados, escolhemos sempre a maior das isoformas. A temperatura de anelamento utilizada para todos os *primers* foi de 60°.

Tabela II. Relação dos genes e respectivos primers utilizados para amplificação quantitativa (qPCR) de amostras coletadas durante o desenvolvimento pré-imaginal de *Apis mellifera*. Todos os primers utilizados neste trabalho foram desenhados a temperatura de 60°.

Gene	Sequência 5' – 3'	Tamanho do fragmento	Nº de acesso
Kr-h1	F: 5' GGAAAAACCATATACTTGCGACA 3' R: 5' TCCATTGTTTTCTTTGAACCAA 3'	144 pb	NP_001229399.1
chd64	F: 5' GACAAAATCTCAATTCAGTC 3' R: 5' CTAATTACACCCTGTCCAGC 3'	151 pb	XP_392114.1
ftz-f1	F: 5' GACTGGGCAAGGAATTCTGT 3' R: 5' CCATTATGAAGCGTAGTCTCA 3'	152 pb	XP_006557455.1
Usp	F: 5' CTCATCAACCCCGAAACT 3' R: 5' ACTTCCGGAGAGAGGGTGGT 3'	181 pb	NP_001011634.1
inr2	F: 5' GGGAAGAACATCGTGAAGGA 3' R: 5' CATCACGAGCAGCGTGTACT 3'	171 pb	NP_001233596.1
EcR	F: 5' CCAACAGCAACAACGGCTAC 3' R: 5' AAAGAGCCAGGCTGCGACAA 3'	118 pb	NP_001091685.2
gce	F: 5' GGAGAACCCATTTATCTACG 3' R: 5' TTGTATTATGGCTCTCATGG 3'	140 pb	XP_395005.4

3.1.3 Extração de RNA

Coletamos as amostras e estocamos cada indivíduo em 500 µL de reagente Trizol® (Invitrogen) a -80°C até o momento da extração do RNA total. Posteriormente, descongelamos (10 minutos a temperatura ambiente) e centrifugamos por 10 minutos à 4°C e 12.000 rpm. Os procedimentos de extração de RNA total seguiram as instruções do fabricante Trizol® (Invitrogen). Adicionamos 100 µL de clorofórmio (MERCK) em cada amostra, agitamos vigorosamente os tubos por 15 segundos e deixamos 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida centrifugamos a 12.000 rpm (4°C) por 15 minutos. Ao final da centrifugação as amostras estavam trifásicas (fase rósea contendo os solventes orgânicos, fase branca contendo proteínas e outros componentes celulares e uma fase incolor contendo os RNAs) a fase incolor foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados mais 100 µL de clorofórmio; repetimos essa etapa pois o corpo das abelhas nas fases estudadas contém muita gordura. Novamente centrifugamos a 12.000 rpm (4°C) por 15 minutos. Nessa etapa após centrifugação as amostras apresentaram duas fases incolores. As moléculas de RNA se encontram na fase aquosa, superior, e o clorofórmio, na fase inferior. A fase superior foi transferida para um novo tubo

contendo 250 µL de 2-propanol (MERCK) seguido de 10 segundos no *vortex* e 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugamos a 12.000 rpm por 20 minutos. (4°C), o 2-propanol foi descartado e os tubos foram invertidos sobre papel filtro para secagem. Adicionamos 1 mL de etanol 75% e colocamos no *vortex* apenas até o *pellet* desprender do fundo. A seguir centrifugamos a 7.500 rpm por 5 minutos (4°C). Retiramos o etanol vertendo o tubo manualmente no frasco de descarte com cuidado para não perder o *pellet*. O restante do álcool foi evaporado no termobloco (58 °C) com a tampa aberta por não mais que 4 minutos. Os *pellets* de RNA obtidos foram ressuspensos em 200 µL água deionizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma) 0,1% (v/v). A concentração e pureza das amostras foi verificada em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000, NanoDrop Technologies).

3.1.4 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para síntese do cDNA, quantificamos as amostras geradas na extração de RNA total citada no passo anterior, e através de cálculos de concentração comum de soluções ($C=M/V$) preparamos soluções a 3µg de RNA em 8µl de água DEPC 0,1%. Nesses 8µl, adicionamos 1 µL 10x *DNase I Reaction Buffer* (Invitrogen), 0,5 de água deionizada autoclavada e 0,5 µL de *DNase I* (Invitrogen) para remoção de possível contaminação por DNA genômico. Incubamos as amostras por 15 minutos a temperatura ambiente. A seguir, adicionamos 1 µL de 25mM EDTA incubando-se em termociclador *Veriti™ 96-Well* (*Applied Biosystems*) a 65°C, por 10 minutos para inativação da enzima do passo anterior. O RNA total tratado com *DNase* foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA, em volume final de 21 µL; utilizamos por amostra o seguinte protocolo: 1 µL de oligo(dT)12-18 (500 ng/mL), 1 µL de uma mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs, 10 mM), com incubação em termociclador a 65°C por 5 minutos; 4 µL de tampão 5x *First Strand Buffer* (Invitrogen), 2 µL de ditriitol 0,1 M (DDT, Invitrogen), 1 µL de inibidor de RNase (*RNase OUT™*, 40 U/ µL, Invitrogen), com incubação a 42°C por 2 minutos; 0,5 µL de água DEPC 0,1% e 0,5 µL da enzima *SuperScript™ II* (*SSII*) *Reverse Transcriptase* (200 U/mL, Invitrogen), com incubação a 42°C por 50 minutos, com

posterior ciclo de 70°C por 15 minutos para inativação da enzima. Como controle da ação da enzima *SSII*, preparamos amostras sem a enzima, sendo assim nosso controle negativo.

3.1.5 PCR quantitativa

Para amplificação por qPCR utilizamos o protocolo do reagente *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems)*. Cada reação final consistiu em 20 µl: 10 µl de solução *PowerUp™*, 6,4 µl de água deionizada autoclavada, 0,8 µl de cada um dos *primers* indicados na tabela II (10nmol/µl) e 2µl da solução de cDNA (diluição 1:10). As reações foram montadas em triplicatas técnicas e processadas em termociclador *StepOnePlus™ Real-Time System (Applied Biosystems)*. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C a 2 minutos (ativação da UDG) e 95°C a 2 minutos para ativação da enzima *HotStart*, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O ciclo de dissociação para todos os *primers* foi de 95°C a 60°C (15 segundos em cada grau), 60°C (1 minuto), de 60°C a 95°C (15 segundos em cada grau).

3.1.6 Normalização e análise dos dados de expressão dos genes candidatos

A análise da expressão relativa dos genes seguiu modelo proposto por Livak and Schmittgen (2001; método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) que leva em consideração a expressão de um gene constitutivo como referência (*housekeeping gene*). Para as fases estudadas nós fizemos um teste com o gene codificador da Actina e o gene codificador da proteína Ribossomal L32 (RPL32), genes apontados como potenciais normalizadores por Lourenço *et al* em 2008. Todos os passos tomados neste trabalho estão de acordo com o guia proposto em 2009 por Bustin e colaboradores para publicações com experimentos que incluem PCR em tempo real (MIQE).

3.2 Efeitos do tratamento hormonal sobre os genes e miRNAs em pupas (Pw/Pb).

Para testar o efeito dos hormônios sobre a expressão dos genes candidatos, realizamos tratamentos com um sintético do hormônio juvenil (Hormônio Juvenil III, Sigma-Aldrich) e da ecdisona (20-hidroxicdisona, Sigma-Aldrich). As abelhas tratadas e os controles foram coletados 1 hora, 1:30 horas e 24 horas após o tratamento. Para definir a fase do desenvolvimento em que o tratamento seria feito, seguimos a curva de hormônio juvenil proposta para *A. mellifera* durante o desenvolvimento (Rembold, H. .1987; Elekonich et al ,2003). O objetivo foi manter altos os níveis de hormônio circulante. Assim, para o hormônio juvenil III, o tratamento foi realizado durante a fase de pupa de olho branco (Pw), fazendo assim com que os níveis de HJ na hemolinfa não descaíssem. Para os ecdisteróides, o tratamento foi realizado instantes após do declínio do segundo pico de 20E, entre Pp e Pb, usamos como referência um trabalho realizado em 2002 por Pinto e colaboradores, onde, através radioimunoensaio os títulos de ecdisteróides foram determinados a partir de Pw até Pbd em *A. mellifera*. Administramos o hormônio na fase de melanização da cutícula, em pupa de olho marrom (Pb-), com objetivo de não deixar os níveis do hormônio caírem, reprimindo assim a ativação dos genes que possivelmente seriam disparados com o decaimento dos níveis de HJ (Hiruma & Riddiford, 1993). Novamente fizemos posturas controladas (segundo cálculos citados na seção 3.1.1), contudo diminuimos o período de confinamento para 2 horas com objetivo de diminuir a variação da idade entre as réplicas biológicas.

3.2.1 Tratamento com Hormônio Juvenil

As aplicações foram realizadas utilizando-se uma concentração final de 10µg/µl de HJ III em acetona. Utilizamos o hormônio juvenil III (Sigma-Aldrich) pois esta é a forma encontrada em abelhas (Robinson et al., 1987); preparamos a solução de estoque de maneira que esta ficasse a uma concentração final de 10mg/ml em acetona (PA, Merck). Desta solução preparamos a solução de trabalho, que consistia em uma solução 1/10 da solução de estoque, novamente

utilizamos acetona para diluir a solução estoque, que no final foi de 10µg/µl. Da solução de trabalho nós fizemos aplicações tópicas de 1µl diretamente sobre o tórax das pupas. Ao todo 50 pupas foram utilizadas, divididas em dois grupos: tratadas e controle. O grupo controle recebeu 1µl de acetona pura. Cinco abelhas foram coletas de ambos os grupos (tratado e controle), com 1 hora, 1h30 e 24 horas após o tratamento, o restante das pupas tratadas e controle foram utilizadas para verificação do fenótipo como forma de validação do nosso tratamento. Todo o processo foi conduzido dentro de uma capela com umidade relativa alta (umidificador de ar) e com a solução de trabalho sendo mantida sobre gelo, uma vez que a acetona é extremamente volátil.

Finalmente ambos os grupos, tratados e controle, foram mantidos em estufa a 34°C com umidade relativa em torno de 70%. O desenvolvimento foi registrado em imagens, em intervalos de aproximadamente 24 horas, através do uso de um microscópio estereoscópico *ZEISS Stereo Discovery.V12*, até a emergência da imago, pelo menos do grupo controle. Os efeitos causados pelo tratamento do HJ III foram investigados observando-se a morfologia e a expressão de genes e miRNAs.

A extração de RNA total dos indivíduos após tratamento hormonal e a síntese de cDNA dos genes que participam da via de sinalização do desenvolvimento, foram realizadas seguindo mesmo protocolo anteriormente descrito nas seções 3.1.3 e 3.1.4 respectivamente.

3.2.2 Tratamento com Ecdisona

Para o tratamento com 20E seguimos um outro protocolo. A ecdisona não é absorvida através da cutícula, assim, fizemos micro injeções do hormônio diretamente na cavidade abdominal das pupas. Inicialmente diluímos 2,5mg em 125µl de etanol (Merck), sendo assim, nossa solução estoque foi de 20µg/µl. Preparamos nossa solução de trabalho adicionando 1,5µl (solução estoque) em 8,5µl de salina 0,9% autoclavada, reduzindo assim a concentração de álcool a níveis não significantes, resultando em uma solução final de 3µg/µl de 20E em salina.

As injeções de hormônio 20E foram realizadas com seringas do tipo Hamilton (10µl); 1µl foi injetado entre o terceiro e quarto tergito abdominal das pupas sob microscópio estereoscópico. Ao todo 60 pupas foram injetadas, 30 para os tratamentos e 30 para realização dos controles, o grupo controle foi tratado com 1µl de salina 0,9%. Como no experimento anterior, realizamos cinco coletas: 1 hora, 1:30 hora e 24 horas após o tratamento (controle e tratado).

Finalmente ambos os grupos, tratado e controle, foram mantidos em estufa a 34°C com umidade relativa em torno de 70%. O desenvolvimento foi registrado com fotos tal qual descrito anteriormente na seção 3.2.1. Os efeitos causados pelo tratamento do 20E, também foram investigados em termos de morfologia e expressão dos genes candidatos e dos miRNAs

A extração de RNA total dos indivíduos após tratamento hormonal, a síntese de cDNA, e a qPCR dos genes que participam da via de sinalização do desenvolvimento foram realizadas seguindo mesmo protocolo anteriormente descrito nas seções 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5 respectivamente.

3.2.3 Síntese de cDNA dos miRNAs

Com a finalidade de avaliar os efeitos dos tratamentos com os hormônios HJ III e 20E na expressão dos miRNAs, utilizamos o módulo *NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)* para a síntese de cDNA dos miRNAs a partir de 2,5 ug de RNA total. O processo para síntese de cDNA de miRNAs é dividido em duas etapas: adição da cauda poliA e transcrição reversa dos transcritos de miRNA. As amostras foram primeiramente quantificadas, e separamos 2,5 µg de RNA em volumes de 15,5 µl de água DEPC 0,1%. A essa solução com 2,5 µg de RNA adicionamos 5 µl de 5x *miRNA Reaction Buffer*, 2,5 µl de $MnCl_2$ (25mM), 1 µl de 10mM ATP (diluído previamente 1:2 em tampão Tris pH 8,0), e 1µl de *Poly A Polymerase* que também foi diluída previamente em água DEPC (1:1) para evitar pipetagem de volumes muito pequenos. Incubamos a 37°C por 15 minutos. Em um novo tubo de 0,2 ml pipetamos 4 µl dessa solução de RNA poliadenilado, 1 µl de *Annealing Buffer* e 3 µl de *Universal RT Primer* (25 µM), levamos ao

termociclador por 5 minutos a 65°C. Assim que retiramos do termociclador levamos ao gelo por 1 minuto e partimos para a transcrição reversa, que consistiu em adição de 10 ul de 2x *First-Strand Reaction Mix*, e 2 ul de *Superscript® III RT/RNaseOUT™ Enzyme Mix*, seguido de 50 minutos a 50°C e 5 minutos a 85°C. As amostras foram estocadas em freezer -20°C.

A PCR em tempo real para quantificação dos miRNAs foi realizada seguindo mesmo protocolo anteriormente citado na seção 3.1.5.

3.2.4 Normalização e análise dos dados de expressão dos miRNAs

A análise da expressão relativa dos miRNAs seguiu modelo proposto por Livak and Schmittgen (2001; método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) tal qual descrito anteriormente para os genes alvo deste estudo, porém o gene de referência utilizado foi diferente. Fizemos a amplificação quantificada de todos os miRNAs e dentre esses utilizamos o miR-252a para normalizar os dados dos experimentos com 20E e HJ III. Utilizamos esse miRNA pois foi o que apresentou menor variação entre todas as amostras considerando cada um dos experimentos com HJ III e com 20E.

3.2.5 Análise Estatística

Utilizamos o *QuickCalcs* do *GraphPad Software* para determinação de *outliers*. Quando necessário excluimos *outliers* observando sempre o limite mínimo de três amostras para realização dos testes estatísticos. Para análise da diferença entre a expressão gênica relativa dos grupos tratado e controle realizados por qPCR, fizemos um teste estatístico *T de student*. O teste foi realizado no *software Excel* proveniente do pacote *Office 2016*. Utilizamos como parâmetro um teste unicaudal e variância homogênea entre as amostras. Consideramos diferencialmente expresso aqueles genes em que os valores de expressão apresentassem valor de **p** menor que 0,05, ou seja, resultados que tivessem confiança de 95%.

3.3 Investigação *in silico* do papel regulador dos miRNAs sobre os genes do desenvolvimento

Para predição dos sítios de ligação dos miRNAs, as sequências das 3'UTR (1000 nt após o códon de parada) dos genes candidatos foram resgatadas da base de dados *Beebase* (AMEL 4.5; Elsik et al., 2014) e os miRNAs da base de dados do miRBase (Release 21; Kozomara & Griffiths-Jones, 2014). O software *RNAhybrid* (Kruger & Rehmsmeier, 2006) foi usado para buscar por elementos de regulação (ou sítios de ligação) para miRNAs nas 3'UTR dos genes candidatos. Foram considerados interações entre miRNA-alvo com energia livre de ligação < -20 kcal/mol, regiões *seed* canônicas e não canônicas (com sítios suplementares e/ou complementares). Finalmente, uma rede de interações miRNA-alvo foi construída através do programa *Cytoscape* (Shannon et al., 2003).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Expressão dos genes *Usp*, *EcR*, *gce*, *inr2*, *ftz-f1*, *Kr-h1* e *chd64* durante o desenvolvimento pré-imaginal de *A. mellifera*

4.1.1 - Escolha do gene normalizador

Com base nos estudos de Lourenço e colaboradores (2008) nós fizemos um teste para as fases que seriam estudadas, com dois dos genes propostos pelos autores (Rpl32 e Actina) para normalização de reações de PCR em tempo real, utilizando *A. mellifera* como modelo. Utilizamos as fases L5S1, L5S3, Pbd e Ne em triplicatas biológicas. A figura 5 mostra a variação dos genes ao longo das fases. Os dados de expressão dos genes estudados foram normalizados pela expressão do gene codificador da proteína ribossomal L32 (Rpl32), pois este apresentou menor variação nas fases em questão, com desvio padrão (SD) entre todos os pontos amostrados de 0,29 contra 0,55 do gene codificador da actina.

Figura 5. Teste de variação ao longo das fases L5S1 I, L5S1 II, L5S1 III, L5S3 I, L5S3 II, L5S3 III, Pbd I, Pbd II, Pbd III, Ne I, Ne II e Ne III, para os genes RPL32 e Actina. O desvio padrão (SD) entre os pontos de cada gene é representado logo acima do perfil de cada normalizador.

4.1.2 - Estrutura dos genes do desenvolvimento

Os genes aqui estudados, tiveram sua estrutura e organização anotadas, etapa que facilita e otimiza o desenho dos *primers*. Os resultados obtidos são mostrados na figura 6, os retângulos correspondem a éxons e as linhas íntrons; a posição dos *primers* e o tamanho do fragmento são indicados pelas regiões em amarelo. Os tamanhos são proporcionais e estão em escala.

Figura 6. Representação da organização estrutural da região codificadora (CDS) dos genes estudados. Os retângulos brancos correspondem às regiões de exons, já as linhas pretas correspondem a regiões intrônicas. Em amarelo está representada a região amplificada para determinação da expressão de cada gene (qPCR). Alguns íntrons por serem grandes demais foram abreviados pelas duas barras paralelas (diagonais). Todos os genes foram representados no sentido 5' – 3'.

Os resultados para *ftz-f1* estão de acordo com a tese de doutorado de Mello (2012), onde o papel deste gene foi estudado. Os genes *Kr-h1* e *gce* diferem um pouco das anotações realizadas por Hernandez (2013), mas provavelmente devido a existência de isoformas; já o *chd64* está correspondente a anotação de Hernandez (2013). Ambos trabalhos realizados com *A. mellifera*.

4.1.3 - Perfil de expressão dos genes do desenvolvimento

Para avaliar se os genes *Usp*, *EcR*, *gce*, *inr2*, *ftz-f1*, *Kr-h1* e *chd64* são modulados pelos hormônios HJ e 20E, quantificamos seus níveis de expressão nas fases pré-imaginais de *A. mellifera* e comparamos aos títulos hormonais de ambos os hormônios já descritos na literatura (Rembold, 1987; Rachinsky et al., 1990; Pinto et al., 2002).

Neste trabalho, observamos uma relação positiva entre o perfil de expressão do gene *Kr-h1* e os títulos do HJ, ou seja, quando os níveis de HJ estão altos na hemolinfa das abelhas (L5S1 - PP3), a expressão relativa do *Kr-h1* também é alta; quando os níveis de HJ estão baixos (PP3 - Pbd), a expressão de *Kr-h1* também é baixa, voltando a subir próximo à emergência do adulto (figura 7), assim, os níveis de expressão de *Kr-h1* variam de acordo com os níveis de HJ.

Figura 7. Perfil de expressão do gene Krueppel homolog 1 (*Kr-h1*). Perfil obtido através de PCR quantitativa durante fases finais do desenvolvimento de *Apis mellifera*. Para cada ponto o erro padrão foi calculado e plotado junto a cada fase.

As flutuações nos níveis de transcritos coincidentes com as do HJ confirmam que a transcrição de *Kr-h1* é dependente do HJ. Essa relação positiva entre a ativação deste gene e os níveis de hormônio também foi observada em outras espécies de insetos como *D. melanogaster* (Minakuchi et al., 2008), *Bombyx mori* (Kayukawa et al., 2012) e *B. germanica* (Lozano & Belles, 2011), o que indica que a relação entre *Kr-h1* e HJ é conservada entre os insetos holometábolos e hemimetábolos, seja em fases iniciais do desenvolvimento ou fases finais, sendo a expressão deste ausente em estágios de pupa tal qual observado também em *Tribolium castaneum* (Minakuchi et al., 2009).

O perfil de expressão do gene *Usp* sugere modulação pelos títulos de ambos os hormônios HJ e 20E considerando as curvas propostas por Heinz Rembold (1987), Rachinsky et al., (1990) e Pinto et al. (2002). A curva de expressão de *Usp* observada entre L5S1 e PP2 (figura 4A) coincide com a curva do HJ nesta mesma fase, onde vemos um pulso de HJ começando em L5S1 e decaindo logo no meio da fase pré-pupal (~PP2). Já os picos de expressão de *Usp* em PP3 e Pbm (figura 4A) sucedem os pulsos de 20E em PP2 e Pp/Pdp (Rachinsky et al., 1990; Pinto et al., 2002). Em 1999 Hiruma & Ridiford mostraram que *Usp* possui duas isoformas em *Manduca sexta* (*Usp-1* e *Usp-2*) cada uma mais relacionada a uma fase do desenvolvimento, respondendo diferentemente às concentrações de 20E e HJ. Em abelhas existem várias isoformas descritas para este gene que diferem predominantemente nas regiões não-traduzidas e que codificam duas proteínas diferentes. Os resultados apresentados neste trabalho representam o perfil de expressão de todas as isoformas, uma vez que o par de *primers* utilizados ancoram nas regiões em comum a elas. Como mostra a figura 8 o gene *Usp* é modulado pelos títulos de ambos os hormônios HJ e 20E considerando as curvas propostas por Heinz Rembold (1987), Rachinsky et al., (1990) e Pinto et al. (2002).

Figura 8. Perfil de expressão do gene *Ultraspiracle (Usp)*. Perfil obtido através de PCR quantitativa durante fases finais do desenvolvimento de *Apis mellifera*. Para cada ponto o erro padrão foi calculado e plotado junto a cada fase.

Os nossos resultados indicam que *Usp* responde rapidamente aos títulos de HJ considerando a variação deste hormônio no intervalo L5S1 – PP2. Em 2004, Barchuk e colaboradores mostraram por experimentos de tratamentos hormonais que a expressão de *Usp* é aumentada com o aumento dos títulos de HJ reforçando a hipótese de USP ser receptor deste hormônio também em abelhas, como sugerido por Jones & Sharp (1997) usando *D. melanogaster* como organismo modelo. Nossos resultados sugerem também que *Usp* possa ser reprimido por altas concentrações de 20E uma vez que a expressão do gene é próxima a zero quando os níveis de 20E são bem altos (Pdp – Pb). Essa observação sugere que *Usp* responda tardiamente aos pulsos de 20E. Esta resposta tardia de *Usp* aos pulsos de 20E pode ser explicada pelo fato de que as cascatas de genes responsivos ao 20E são disparadas após o decaimento nos títulos deste hormônio (Kingan & Adams, 2000; Trumam et al., 1983) reforçando assim, que altas concentrações do hormônio 20E inibem a expressão de *Usp*.

Observamos picos de expressão de *ftz-f1* em PP3 e Pbd que sucedem os pulsos de 20E em PP2 e Pp/Pdp (figura 9). Assim como *Usp*, o gene *ftz-f1* parece ser ativado após a queda dos níveis de 20E.

Figura 9. Perfil de expressão do gene fushi tarazu transcription factor 1 (*ftz-f1*). Perfil obtido através de PCR quantitativa durante fases finais do desenvolvimento de *Apis mellifera*. Para cada ponto o erro padrão foi calculado e plotado junto a cada fase.

Em 1999 Broadus e colaboradores mostraram que em *D. melanogaster* β FTZ-F1 é requerido para que aconteça a transição pré-pupa – pupa. Os autores mostraram que mutantes para β FTZ-F1 não avançavam com pupação, ou seja, não respondiam ao pulso de 20E. Nossos resultados também mostram que *ftz-f1* possui um aumento na expressão logo após decaimento dos títulos de 20E em PP3 e Pbd (figura 9). Mello (2012) e Bond et al. (2011) também observaram que os níveis de *ftz-f1* respondem tardiamente aos títulos de 20E. Além disso, os autores concluíram que altos níveis do hormônio 20E inibem a expressão do *ftz-f1*. Em 2013 Hernandez observou em fases iniciais do desenvolvimento de *A. mellifera*, uma co-expressão do gene *ftz-f1* e do gene *gce*. No entanto, nós não observamos essa expressão simultânea nas fases finais do desenvolvimento. Concluimos que em abelhas o perfil de expressão de *ftz-f1* pode ser um ótimo marcador do momento de ocorrência de cada muda (metamórfica em PP3 e imaginal em Pbd),

uma vez que este gene é um fator de competência expresso ao final de cada muda (Broadus et al., 1999).

Níveis elevados de transcritos do gene *gce* foram observados na fase de PP1 e nas fases Pdp e Pb (figura 10). Em PP1, a expressão de *gce* deve ocorrer em resposta ao pico de HJ. No entanto, os altos níveis de *gce* em Pdp e Pb parecerem ocorrer independentemente do HJ, pois os níveis de HJ são basais nessa fase do desenvolvimento.

Figura 10. Perfil de expressão do gene *germ-cell expressed (gce)*. Perfil obtido através de PCR quantitativa durante fases finais do desenvolvimento de *Apis mellifera*. Para cada ponto o erro padrão foi calculado e plotado junto a cada fase.

O GCE foi sugerido como um ligante de HJ em *D. melanogaster* (Baumann et al., 2010; Jindra et al., 2015). Em *A. mellifera*, a interação entre GCE e HJ foi sugerida por predição computacional (Hernandes, 2013) além de termos verificado em um experimento piloto que em fases iniciais do desenvolvimento (Larva L3) o *gce* apresenta uma tendência a responder ao tratamento com HJ III (Anexo I). A hipótese de que GCE possa atuar como um ligante de HJ em *A. mellifera* foi reforçada pela correlação positiva entre os perfis de expressão do *gce* e os títulos de HJ no desenvolvimento larval (Hernandes, 2013). Neste trabalho, sugerimos que o pico de expressão de *gce* na fase PP1 ocorra em resposta ao pico de HJ neste ponto do desenvolvimento, reforçando a hipótese de interação entre estas moléculas no desenvolvimento pré-pupal. No entanto, os níveis de expressão de *gce* no desenvolvimento pupal (Pdp e Pb) não

acompanham os títulos de HJ. Esse resultado sugere que o GCE assuma outras funções durante o desenvolvimento pupal de abelhas, que não a interação com o HJ. Conclusão semelhante foi obtida para insetos hemimetábolos (Lozano & Belles, 2014), onde a expressão de *Met* (parálogo ao *gce*) foi constatada durante o último estágio de ninfa (N6) de *B. germanica*, quando os títulos de HJ são muito baixos, e também para insetos holometábolos (*T. castaneum*), onde a expressão de *Met* foi igualmente detectada durante fases em que o HJ possui níveis praticamente nulos (Minakuchi et al., 2009). Em *D. melanogaster*, foi proposto que os genes *Met* e *gce* estejam envolvidos na sinalização de HJ e 20E, sendo mais críticos para a ação de HJ no desenvolvimento larval e mais importante para a ação de 20E na transição larva-pupa (Abdou et al., 2011). Além disso, em *A. mellifera*, os picos de expressão de *gce* em Pdp e Pb sucedem o pulso de 20E entre as fases Pp e Pdp (Rachinsky et al., 1990; Pinto et al., 2002) e precede o pico de expressão de *ftz-f1* em Pbd, reforçando a que o GCE atue na via de sinalização de 20E durante o desenvolvimento pupal em abelhas.

O perfil de expressão do *EcR* apresentou apenas uma alta na expressão coincidente com o aumento do hormônio 20E, na fase de Pp (figura 11). Em contraste, nas fases de PP1 – PP3 a expressão do receptor foi bem baixa. Os picos de expressão de *EcR* em Pp e Pbm são coincidentes com observados em *Usp* (figura 8).

Figura 11. Perfil de expressão do gene *Ecdysone receptor (EcR)*. Perfil obtido através de PCR quantitativa durante fases finais do desenvolvimento de *Apis mellifera*. Para cada ponto o erro padrão foi calculado e plotado junto a cada fase.

Nas fases de PP1 – PP3 enquanto o 20E aumenta na hemolinfa, a expressão do *EcR* foi mínima, indicando assim que neste ponto possivelmente as concentrações elevadas do 20E inibem a expressão do *EcR*, tal qual proposto por Mello et al., (2014), onde os autores concluíram que altas concentrações do hormônio 20E pudesse inibir a expressão de seu próprio receptor. É possível notar também, de Pw em diante, quando os níveis de HJ são baixos (genes teoricamente sofrem influência apenas do 20E), que os genes *Usp* e *EcR* possuem expressão alta em pontos iguais (Pp e Pbm). Esse aumento na expressão de *Usp* e *EcR* em momentos semelhantes reforça o que foi demonstrado por Fang e colaboradores em 2005, *Usp* e *EcR* formam dímeros que atuam como receptores nucleares de 20E; os autores ainda mostraram que a resposta ao 20E é desencadeada apenas quando o heterodímero (*EcR/Usp*) está presente, nenhum dos dois receptores (*Usp* ou *EcR*) responde ao hormônio 20E quando separados um do outro. Neste trabalho, analisamos o *EcR-A*, baseado em dados publicados por Mello et al (2014), porem sugerimos análises futuras com a outra isoforma deste mesmo receptor (*EcR-B*), em ordem a testa-lo como marcador de 20E.

O perfil de expressão do gene *inr2* em geral apresentou baixos níveis durante as primeiras fases analisadas (L5S1 – PP2) e a partir de PP2 apresentou variações mais altas, com picos em PP3, Pp e Pbm (figura 12).

Figura 12. Perfil de expressão do gene *insulin receptor 2 (inr2)*. Perfil obtido através de PCR quantitativa durante fases finais do desenvolvimento de *Apis mellifera*. Para cada ponto o erro padrão foi calculado e plotado junto a cada fase.

Essa baixa expressão observada de L5S1 até PP2 atribuímos aos títulos de HJ. Sugerimos então, um padrão de modulação negativo em relação aos níveis do hormônio HJ uma vez que em PP2 começa o declínio nos títulos de HJ (Rembold, 1987; Rachinsky et al., 1990) e o gene *inr2* passa a ter picos de expressão. Uma relação antagônica entre os títulos de HJ e os genes da via da insulina também foi observada nas fases larvais de *A. mellifera* (de Azevedo & Hartfelder, 2008). Outro ponto a ser levado em conta é que nessas fases do desenvolvimento pupal não há mais crescimento do indivíduo, mas internamente ocorre intensa diferenciação e síntese de novos tecidos e órgãos (Snodgrass, 1984), o que pode estar relacionado às altas na expressão deste receptor nas fases finais do desenvolvimento.

Os níveis de expressão de *chd64* foram baixos durante a maior parte do desenvolvimento, contudo observamos uma alta na expressão de *chd64* na fase de PP3, e em Pbm com decaimento lento até Ne (figura 13).

Figura 13. Perfil de expressão do gene *chd64*. Perfil obtido através de PCR quantitativa durante fases finais do desenvolvimento de *Apis mellifera*. Para cada ponto o erro padrão foi calculado e plotado junto a cada fase.

O perfil de expressão de *chd64* parece responder aos pulsos de 20E nas fases PP2 e Pp/Pdp, já que níveis mais altos dos transcritos de *chd64* foram encontrados nas fases PP3 e Pbm (figura 13) respectivamente. Embora a CHD64 seja importante nas vias de sinalização de ambos os hormônios, *chd64* parece não responder às variações dos títulos de HJ de L5S1 – PP2. A relação positiva entre os picos de expressão de *chd64* e de *Usp* nas fases PP3 e Pbm reforça a ação conjunta descrita para estes genes em *H. armigera* (Liu et al., 2011).

Os nossos resultados caracterizam os perfis de expressão de genes importantes no processo de metamorfose durante os estágios finais do desenvolvimento em *A. mellifera*. Como este processo é coordenado pela ação dos hormônios HJ e 20E, buscamos por relações entre os perfis de expressão gênica e os pulsos destes hormônios, apesar de não conseguirmos explicar 100% do perfil dos genes apenas pela variação hormonal. De uma forma geral, os perfis dos genes *Usp*, *Kr-h1*, *EcR*, *ftz-f1*, *chd64* e *inr2* apresentaram altos níveis de transcritos nas fases finais do desenvolvimento pupal. Esses picos surgem logo após a queda dos títulos de

20E, o que sugere que estes genes estejam relacionados com o processo de maturação da pupa e sua emergência como adulto. Nossos resultados também sugerem que o *gce* desempenhe um papel diferente durante o desenvolvimento pupal de abelhas, e que o *chd64* não responde à variação de HJ no final do período larval.

4.2 - Efeito temporal do tratamento com hormônios HJ III e 20E sobre genes de resposta

4.2.1 - Validação do tratamento hormonal através do fenótipo

Para validação do nosso tratamento hormonal, mantivemos os grupos de pupas tratadas e controle até a emergência do adulto, pelo menos do grupo controle. Fizemos registros que mostram alterações fenotípicas ao longo do desenvolvimento das pupas após tratamento com ambos hormônios HJ e 20E. Os dados fenotípicos mostram o efeito do tratamento hormonal (figura 14). Contrapondo o efeito que este tem na fase larval, o HJ acelerou o processo de desenvolvimento, quando utilizado em pupas de olho branco (Pw); como pode ser observado em 53 horas (figura 14) a pupa tratada já encontrava-se em Pbl enquanto o grupo controle ainda encontrava-se em Pdp. Em 73 horas o grupo tratado já se encontrava em estágios avançados de Pbm, chegando em Pbd em torno de 100 horas, tendo como resultado final a não emergência do adulto, que viria a emergir no grupo controle aproximadamente 4 dias depois.

Figura 14. Registros fotográficos mostrando desenvolvimento precoce (diagrama superior) causado pelo tratamento tópico realizado no tórax de pupas de olho branco (Pw) com $1\mu\text{g}$ de Hormônio Juvenil III. No diagrama inferior, é mostrado o atraso no desenvolvimento causado pela injeção de $3\mu\text{g}$ de 20-hidroxiecdisona na região abdominal de pupas de olho marrom (Pb). Em ambos tratamentos a emergência do adulto foi bloqueada pelo tratamento hormonal.

Em oposição ao padrão encontrado para o tratamento com HJ, o tratamento com 20E retardou o processo de desenvolvimento das pupas em relação ao grupo controle (figura 14), reforçando que estes dois hormônios possuem efeitos majoritariamente antagônicos (Areiza et al., 2015). E mais uma vez o tratamento artificial opondo-se ao que comumente é observado no processo de desenvolvimento, uma vez que um pico de ecdisteroides estimula o avanço para próxima fase, provocando a ecdise ou muda (Thummel, 1995). Como se observa na figura 14, o grupo tratado com 20E teve o seu desenvolvimento atrasado. O grupo controle emergiu com 118 horas de incubação. Acompanhamos o grupo tratado por 240 horas e mesmo ao final deste período, as pupas tratadas com 20E não conseguiram emergir.

Essas alterações na morfologia e no *timing* do desenvolvimento confirmam os dados obtidos por Zufelato et al. (2000) e Santos et al. (2001) que realizaram experimentos semelhantes estudando os efeitos destes hormônios sobre o progresso da pigmentação das pupas. Adicionalmente, nos tratamentos com HJ III e 20E foram constatadas alterações no fenótipo. Nos indivíduos tratados com HJ III (fase de PW quando os níveis de HJ ainda são altos na hemolinfa), um padrão de pigmentação do tórax em forma de “lira” foi observado, especificamente em pupas Pbm (figura 15), padrão também observado por Bitondi e colaboradores em 1998. Neste trabalho, aplicações tópicas de *pyriproxyfen* (análogo de HJ) foram utilizadas e observou-se uma mudança no padrão de pigmentação do tórax e do olho em operárias de abelhas melíferas (*A. mellifera*), proveniente da ação antecipada da enzima fenoloxidase.

De mesma maneira, notamos um padrão fenotípico característico nos indivíduos tratados com 20E (figura 16 - direita). Os indivíduos tratados possuíam uma pigmentação acentuada do abdômen, padrão não observado nos indivíduos de mesmo estágio, coletados diretamente da colmeia (figura 16 - esquerda). Observamos que cabeça e tórax pigmentavam menos quando comparado a um indivíduo de mesmo estágio de desenvolvimento coletado diretamente da colmeia, constatamos que o padrão comum é o tórax e cabeça pigmentarem antes do abdômen.

Condições naturais

Tratamento com 20E

Figura 16. Padrão observado em indivíduos tratados com 20E (direita). Naturalmente ocorre em ordem, a pigmentação de cabeça e tórax, seguido por abdômen (esquerda). Nos indivíduos tratados observamos que tórax e cabeça não pigmentaram, resultando em um fenótipo diferente.

4.2.2 - Efeito dos tratamentos hormonais sobre a expressão relativa dos genes *Usp*, *EcR*, *inr2*, *ftz-f1*, *Kr-h1*, *chd64*, *gce* e *ET*.

Para avaliar se as flutuações dos perfis de expressão dos genes acontecem em resposta aos títulos dos hormônios juvenil e 20E conforme atribuímos na seção anterior, testamos os efeitos da alteração dos títulos destes hormônios sobre a expressão dos genes *Usp*, *Kr-h1*, *EcR*, *ftz-f1*, *chd64* e *inr2*. Para impedir a queda do HJ, tratamos pupas Pw com hormônio juvenil III (HJ III). E para manter altos os níveis de 20E, tratamos pupas Pb com a 20-hidroxiecdisona (20E). Os efeitos destes tratamentos sobre a expressão dos genes foram avaliados 1h, 1h30 e 24 horas depois do tratamento.

Observamos um aumento dos transcritos de *Usp* 1h após o tratamento com HJ III, contudo, os níveis já estavam reestabelecidos 1:30 h após o tratamento (figura 17A). Os níveis de expressão do grupo tratado e o controle também não apresentaram diferença em 24 h ($p > 0,05$). Nos grupos tratados com 20E a expressão de *Usp* foi reprimida e manteve diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os tempos testados: 1, 1:30 e 24 horas (figura 17).

Figura 17. Expressão relativa de *Ultraspiracle (Usp)* perante tratamentos hormonais (HJ III / 20E) realizados com 1 hora, 1:30 hora e 24 horas. A= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 1µg/µl de HJ III, e controle com 1µl de acetona pura em fase de pupa de olho branco (Pw). B= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 3µg/µl de 20E, e controle com 1µl de solução salina 0,9% em fase de pupa de olho marrom (Pb). O asterisco representa p valor menor que 0,05 no teste t realizado.

Nossos resultados mostram que *Usp* é um gene que responde rapidamente aos títulos de HJ, sugerindo que codifique uma proteína primária de ligação ao HJ. A rápida resposta do gene *Usp* aos títulos de HJ sugerem que *Usp* seja um “gene de resposta imediata” (do inglês, *Immediate early gene*), de acordo com a definição proposta por Bahrami & Drabløs (2016). Barchuk et al. (2004) também observaram uma resposta rápida do *Usp* ao tratamento com HJ III. No entanto, os níveis de *Usp* não haviam sido reestabelecidos, mesmo 4h30 após o tratamento. Provavelmente porque os autores utilizaram uma concentração de HJ III 3,3 vezes maior (10 µg/abelha) do que a utilizada neste trabalho (3 µg/abelha). Nosso resultado nos permite concluir que HJ estimula a expressão de *Usp* e altas concentrações de 20E inibem a expressão de *Usp*, confirmando o que sugere o perfil de expressão de *Usp* (figura 8) uma vez que a amplitude de variação é menor em fases que 20E está alto (de PP3 em diante).

De mesma maneira, *Kr-h1* (figura 18A) mostrou ser um gene de resposta rápida ao tratamento com HJ III. Mas, diferentemente de *Usp*, *Kr-h1* não recobrou os títulos originais de expressão mesmo 24 horas após o tratamento, mantendo diferença significativa entre os grupos tratado e controle. No tratamento com 20E o *Kr-h1* apresentou diferença estatisticamente significativa apenas 1:30 hora após o tratamento (figura 18B).

Figura 18. Expressão relativa de *kruppel homologous 1* (*Kr-h1*) perante tratamentos hormonais (HJ III / 20E) realizados com 1 hora, 1:30 hora e 24 horas. A= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 1µg/µl de HJ III, e controle com 1µl de acetona pura em fase de pupa de olho branco (Pw). B= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 3µg/µl de 20E, e controle com 1µl de solução salina 0,9% em fase de pupa de olho marrom (Pb). O asterisco representa p valor menor que 0,05 no teste t realizado.

Em contraste com *Usp* podemos notar que *Kr-h1* mantém níveis altos por bastante tempo (até 24 horas após tratamento) á o tratamento com 20E, inesperadamente estimulou o *Kr-h1* que é um gene que responde apenas ao HJ (Jindra, 2015). Indivíduos de *B. mori* submetidos a uma dieta suplementada com 20E (aplicado nas folhas das quais a larva se alimenta) apresentaram aumento na expressão do gene *Kr-h1* (Wang e colaboradores 2012). Os autores atribuíram essa expressão elevada nos grupos tratados ao estímulo que o 20E exerceu sobre as glândulas *corpora allata*, que uma vez estimuladas, liberaram HJ na hemolinfa. Assim, os altos títulos de HJ levaram ao aumento na expressão de *Kr-h1*. Em nossos resultados é provável que o mesmo ocorra uma vez que os tratamentos com HJ apresentaram diferença significativa já na primeira hora após o tratamento, e o tratamento com 20E resulta em diferenças significantes apenas a partir do segundo ponto de amostragem (1:30 hora após tratamento). Portanto é possível sugerir que o 20E estimularia o *Kr-h1* indiretamente (figura 18B). Esses dados também evidenciam a relação existente entre os hormônios, sendo que não podemos olhar isoladamente para o hormônio utilizado no tratamento uma vez que os dois funcionam em sincronia e um tem influência sobre o outro.

O gene *gce* (figura 19A) não respondeu ao tratamento com HJ III no estágio estudado (Pw) sendo as diferenças entre a expressão do grupo controle e tratado não significantes ($p > 0,05$) como mostra a figura 19A. Porém no tratamento com 20E as diferenças entre o grupo tratado e

o controle foram significantes ($p < 0,05$) para todos os momentos de coleta (1, 1:30 e 24 horas) sendo que o tratamento com 20E reprimiu a expressão do receptor nuclear *gce* (figura 19B).

Figura 19. Expressão relativa de *Germ Cell-expressed (gce)* perante tratamentos hormonais (HJ III / 20E) realizados com 1 hora, 1:30 hora e 24 horas. A= Dados de expressão relativa em grupos tratados com $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de HJ III, e controle com $1\mu\text{l}$ de acetona pura em fase de pupa de olho branco (Pw). B= Dados de expressão relativa em grupos tratados com $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de 20E, e controle com $1\mu\text{l}$ de solução salina 0,9% em fase de pupa de olho marrom (Pb). O asterisco representa p valor menor que 0,05 no teste t realizado.

Nossos resultados confirmam a hipótese de que *gce* não responda às variações de HJ (figura 19A) durante o desenvolvimento pupal em abelhas (perfil de expressão de *gce* mostrado na figura 10) e suportam a hipótese de que *gce* tenha papel na via de resposta ao 20E (figura 19B). Diferente do que pode ocorrer em fases iniciais do desenvolvimento de *A. mellifera*. Propomos assim que o *gce* possa assumir funções diferentes no desenvolvimento inicial e tardio de abelhas, tal como foi sugerido para *B. germanica* (Lozano e Belles, 2014), onde foi verificado expressão do gene *Met* durante estágios iniciais onde os títulos de HJ são altos e também em estágios finais do desenvolvimento onde praticamente não há síntese de HJ.

O gene *chd64* não respondeu ao tratamento com HJ III sendo os grupos tratado e controle, não diferentes de acordo com o teste estatístico utilizado (T de *student*). Já no tratamento realizado com 20E o gene *chd64* respondeu prontamente e manteve diferença significativa ($p < 0,05$) em até 24 horas após o tratamento (figura 20B).

Figura 20. Expressão relativa de *chd64* perante tratamentos hormonais (HJ III / 20E) realizados com 1 hora, 1:30 hora e 24 horas. A= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 1µg/µl de HJ III, e controle com 1µl de acetona pura em fase de pupa de olho branco (Pw). B= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 3µg/µl de 20E, e controle com 1µl de solução salina 0,9% em fase de pupa de olho marrom (Pb). O asterisco representa p valor menor que 0,05 no teste t realizado.

Esperávamos resposta do *chd64* em ambos os tratamentos pois esta proteína foi descrita estar presente na via de sinalização de ambos hormônios HJ e 20E em *H. armígera* (Liu et al., 2011). Porém, não observamos resposta no tratamento com HJ III. Em 2011 Liu e colaboradores trataram larvas de *H. armigera* com os mesmos hormônios utilizados e constataram aumento na expressão do gene em ambos os tratamentos. Os nossos resultados sugerem que *chd64* aja diferentemente em períodos finais do desenvolvimento (Pb) em abelhas melíferas. Sendo assim nossos tratamentos hormonais reforçam o que foi dito anteriormente com base no apenas no perfil de expressão do gene *chd64* (figura 13).

O fator de transcrição *ftz-f1* não respondeu aos tratamentos com HJ III, apresentando valor de *p* maior que 0,05 em todos os pontos amostrados, contrário do observado para o tratamento com 20E, onde todos os pontos de coleta apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e tratado (figura 21).

Figura 21. Expressão relativa de *fushi tarazu transcription factor 1 (ftz-f1)* perante tratamentos hormonais (HJ III / 20E) realizados com 1 hora, 1:30 hora e 24 horas. A= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 1µg/µl de HJ III, e controle com 1µl de acetona pura em fase de pupa de olho branco (Pw). B= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 3µg/µl de 20E, e controle com 1µl de solução salina 0,9% em fase de pupa de olho marrom (Pb). O asterisco representa p valor menor que 0,05 no teste t realizado.

Assim, *ftz-f1* respondeu negativamente ao tratamento com 20E. Esse resultado confirma o observado quanto ao perfil de expressão do *ftz-f1* (figura 9) e com os achados de Mello et al (2012), de que altas concentrações de 20E inibem fatores de transcrição induzidos por 20E, sendo que o grupo tratado teve a expressão inibida de *ftz-f1*. Resultados semelhantes foram observados em *D. melanogaster*, onde a expressão de *βFT-F1* foi aumentada em baixos níveis do hormônio esteroide ecdisona (Broadus et al., 1999).

O gene codificador do receptor da insulina 2 (*inr2*) respondeu ao tratamento com HJ III, 1 hora e 1:30 hora após (figura 22A). No tratamento com 20E o mesmo cenário foi observado, estatística significativa ($p < 0,05$) nos dois primeiros pontos amostrados.

Figura 22. Expressão relativa de insulín-reptor 2 (*inr2*) perante tratamentos hormonais (HJ III / 20E) realizados com 1 hora, 1:30 hora e 24 horas. A= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 1µg/µl de HJ III, e controle com 1µl de acetona pura em fase de pupa de olho branco (Pw). B= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 3µg/µl de 20E, e controle com 1µl de solução salina 0,9% em fase de pupa de olho marrom (Pb). O asterisco representa p valor menor que 0,05 no teste t realizado.

Nossos dados reforçam o papel deste receptor (*inr2*) em ambas as vias de resposta, tanto a do HJ quanto a do 20E. Os gráficos nos permitem inferir também que a princípio os tratamentos com ambos hormônios aumentam significativamente os níveis do gene *inr2* no grupo tratado, havendo uma tendência de os níveis serem recobrados gradativamente com o passar do tempo. Essa relação positiva entre os títulos de ecdisteroides e a via da insulina foi também apontado em *D. melanogaster* por Orme & Leever (2005).

O tratamento com HJ III, num primeiro momento inibiu a expressão do receptor nuclear para ecdisona (*EcR*) e num segundo momento fez com que este tivesse sua expressão aumentada além do grupo controle, recuperando seus níveis originais com 24 horas (figura 23). Já no experimento com 20E há diferença estatisticamente significativa apenas 24 horas após tratamento.

Figura 23. Expressão relativa de Ecdysone receptor (*EcR*) perante tratamentos hormonais (HJ III / 20E) realizados com 1 hora, 1:30 hora e 24 horas. A= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 1 μ g/ μ l de HJ III, e controle com 1 μ l de acetona pura em fase de pupa de olho branco (Pw). B= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 3 μ g/ μ l de 20E, e controle com 1 μ l de solução salina 0,9% em fase de pupa de olho marrom (Pb). O asterisco representa p valor menor que 0,05 no teste t realizado.

A expressão de *EcR* no grupo tratado com 20E confirma que o receptor nuclear deste hormônio responde tardiamente, apresentando significância estatística entre a diferença do grupo controle e tratado com 24 horas apenas, dando indícios que os efeitos diretos do tratamento com 20E não sejam instantâneos, tal qual proposto em 1983 por Truman e colaboradores.

4.3 - Efeito do tratamento hormonal sobre a expressão relativa dos *miR-252a*, *miR-252b*, *miR-281* e *miR-34*.

Como citado anteriormente, a variação da expressão dos genes ao longo do desenvolvimento não é explicada apenas pelas variações hormonais. Assim, também exploramos o papel regulador dos miRNAs na modulação dos perfis dos genes *Usp*, *Kr-h1*, *EcR*, *ftz-f1*, *chd64*, *gce* e *inr2*.

4.3.1 - Predição de sítios de interação entre os micros: miR-34, miR-281, miR-252a e miR-252b e os genes *Usp*, *EcR*, *inr2*, *ftz-f1*, *Kr-h1*, *chd64*, *gce* e *ET*.

Para explorar o papel dos miRNAs na regulação dos genes do desenvolvimento, buscamos por sítios de ligação para alguns miRNAs nas regiões 3'UTR dos genes *Usp*, *EcR*, *inr2*, *ftz-f1*, *Kr-h1*, *chd64*, *gce* e *ET*. Encontramos regiões com alta probabilidade de interação entre os miRNAs (miR-34, miR-281, miR-252a e miR-252b) e a 3'UTR dos genes alvo. A partir da predição desses sítios, foi construída uma rede de interações entre os miRNAs e os genes de resposta aos hormônios alvo deste estudo (figura 24).

Figura 24. Rede de interações miRNA-mRNAs preditas para *Apis mellifera*. As setas azuis indicam interações já validadas pelo nosso grupo (Hernandes, 2016). As setas cinzas representam interações putativas que serão validadas em ensaios futuros. Os círculos representam genes recentemente adicionados a rede. Os retângulos centrais (com borda cinza escura) representam os genes, e os com borda cinza claro (extremidades) são os miRNAs.

Os miRNAs com maiores números de interações preditas são o miR-34 e o miR-252b, que interagem com sete dos oito genes estudados. Apontamos o miR-34 e o miR-252b como reguladores chave do desenvolvimento em *A. mellifera* com base na predição de interação miRNA – alvo; o miR-252 foi apontado também como regulador chave do desenvolvimento de *B. germânica* (Rubio et al., 2012). Em 2013, Jiang e colaboradores mostraram que o miR-281 possui sequência conservada entre *D. melanogaster*, *T. castaneum*, *B. mori*, e *Caenorhabditis elegans*, contudo a 3'UTR do gene *EcR* nestes mesmos organismos não apresentava o mesmo grau de

conservação, sendo assim proposto que esse miRNA tenha sítios de interação diferentes de acordo com a espécie. Em abelhas este miRNA já foi validado através de ensaio do gene repórter (Luciferase) possuir interação com a 3'UTR do gene *EcR* (Hernandes, 2016). Na figura 24 as setas azuis indicam as relações previamente validadas por Hernandez em 2016.

4.3.2 - Expressão relativa do miR-34, miR-281, miR-252b e miR-252a perante tratamento com os hormônios HJ III e 20E.

Para testar se os hormônios morfogenéticos HJ e 20E interferem na expressão dos miRNAs, nós quantificamos a expressão dos miRNAs: miR-34, miR-281, miR252b e miR252a após tratamento com os hormônios HJ III e 20E. Dentre os microRNAs testados, o miR-252a apresentou variação muito pequena entre os grupos tratados e controle para ambos os hormônios HJ III ($\cong 0,149$ Ct) e 20E ($\cong 0,145$ Ct), sendo este, eleito a normalizador das curvas de expressão dos miRNAs aqui estudados.

A expressão do miR-34 sob tratamento com HJ III foi alterada em dois dos três pontos de coleta (figura 26A), os com 1:30 e 24 horas após o tratamento, sendo que o miR-34 teve sua expressão significativamente aumentada em relação ao grupo controle. Já nos tratamentos com 20E o miR-34 respondeu apenas após 24 horas de tratamento, tendo sua expressão diminuída em relação ao grupo controle (figura 26B).

Figura 25. Expressão relativa do miR-34 perante tratamentos hormonais (HJ III / 20E) realizados com 1 hora, 1:30 hora e 24 horas. A= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 1 μ g/ μ l de HJ III, e controle com 1 μ l de acetona pura em fase de pupa de olho branco (Pw). B= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 3 μ g/ μ l de 20E, e controle com 1 μ l de solução salina 0,9% em fase de pupa de olho marrom (Pb). O asterisco representa p valor menor que 0,05 no teste t realizado.

O miR-34 teve sua expressão afetada negativamente, apenas 24 horas após tratamento com 20E, sugerimos então que este miRNA seja modulado com a queda dos títulos de 20E, que acontece em um período que seja superior a 1:30 hora após tratamento com 20E. Assim como os genes que entram em ação após queda do hormônio desencadeando os mecanismos de resposta ao 20E (Truman, 1983), este miR-34 também seria ativado somente após a queda nos níveis do hormônio em abelhas, fato observado neste trabalho, uma vez que os níveis entre o grupo tratado e controle foram estatisticamente significantes apenas 24 horas após tratamento hormonal. Observamos ainda que a modulação exercida pelo 20E sobre a expressão do miR-34, foi negativa. Sempere et al em 2003 constataram que durante o estágio de pupa em *D. melanogaster*, o miR-34 teve expressão diminuída (dados de PCR-semiquantitativa) em resposta as altas concentrações de hormônios ecdisteróides, em experimento realizado com intervalos de 12 horas entre os pontos de amostragem. Assim, concluímos que tal qual ocorre na mosca de fruta, o miR-34 também é reprimido na presença de 20E em abelhas melíferas. Ao analisar os dados de expressão do miR-34 vemos que o HJ tem forte influência sobre a expressão deste, estimulando a expressão deste miRNA (1:30 e 24 horas). Os dados ainda mostram uma relação antagônica dos hormônios HJ e 20E sobre a expressão do miR-34. O HJ III resultou em um aumento da expressão no grupo tratado em relação ao controle e o 20E diminuiu a expressão do grupo tratado em relação ao controle. Conclusão semelhante também foi obtida por Sempere

et al (2003) onde foi verificado em células embrionárias de *D. melanogaster* em cultivo (células S2) que aplicação de HJ induz a expressão de miR-34 e como dito anteriormente, tratamento dessas células com ecdisteróides reprime a expressão de miR-34. Porém, os dados de perfil de expressão deste miRNA obtidos por Hernandez (2013) apontam que em fases larvais o miR-34 e o HJ possuem uma relação inversa, quando o hormônio está alto o miR-34 está baixo e vice-versa. Essa mesma relação inversa não foi observada em pupa, nossos tratamentos hormonais mostram que grupos tratados com HJ III possuem a expressão do miR-34 aumentada.

O miR-34 foi identificado na rede regulatória de *EcR* e verificado estar diferencialmente expresso durante o desenvolvimento pupa-adulto de *A. mellifera* por Mello e colaboradores em 2014. Em 2016 Hernandez validou interações miR-34 - *EcR*. Nosso trabalho contribui com informações em relação ao tempo de resposta desse miRNA aos hormônios testados.

O miR-281 apresentou níveis de diferença significativa para o ponto com 1 e 1:30 hora após tratamento com HJ III (figura 27A) porém, diferenças que se invertem, com 1 hora de tratamento o grupo tratado teve níveis de expressão diminuídos em relação ao grupo controle. Padrão que se inverte 1:30 após tratamento com HJ III, o grupo tratado tem superexpressão em relação ao grupo controle. Perante tratamento com 20E a expressão do miR-281 foi alterada 1 hora após tratamento hormonal, tendo seus níveis diminuídos em relação ao grupo controle. Os níveis foram restabelecidos 1:30 hora depois do tratamento, voltando a níveis mais baixos em relação ao grupo controle, 24 após tratamento com 20E (figura 27B).

Figura 26. Expressão relativa do miR-281 perante tratamentos hormonais (HJ III / 20E) realizados com 1 hora, 1:30 hora e 24 horas. A= Dados de expressão relativa em grupos tratados com $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de HJ III, e controle com $1\mu\text{l}$ de acetona pura em fase de pupa de olho branco (Pw). B= Dados de expressão relativa em grupos tratados com $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de 20E, e controle com $1\mu\text{l}$ de solução salina 0,9% em fase de pupa de olho marrom (Pb). O asterisco representa p valor menor que 0,05 no teste t realizado.

O miR-281 mostrou ser afetado tanto pelo tratamento com HJ III quanto pelo tratamento com 20E. Quanto tratado com HJ III os níveis foram restaurados até 24 horas após o tratamento e quando tratado com 20E os níveis não foram restabelecidos mesmo 24 após tratamento. Observamos também uma relação íntima entre o miR-281 e o gene *EcR*, no tratamento com HJ III tanto o *EcR* (figura 23A) quanto o miR-281 apresentam expressão diminuída no grupo tratado com 1 hora e aumentada no grupo tratado com 1:30 hora em relação ao grupo controle. Também no tratamento com 20E o grupo tratado teve expressão de miR-281 diminuída em relação ao grupo controle 24 horas após tratamento, tal qual os tratamentos com o gene *EcR*. O miR-281 atua sobre a expressão do *EcR* em *B. mori* (Jiang et al., 2013), diminuindo os níveis de expressão de *EcR*, segundo os autores o miR-281 e *EcR* são co-expressos em tecidos específicos de forma que o miRNA tenha ação tecido-específica sobre o *EcR*. Os autores ainda mostraram que miR-281 tem sua expressão diminuída após tratamento com 20E, dados que vão de encontro ao que encontramos também para abelhas, onde miR-281 teve expressão diminuída em relação ao grupo controle com 1 e 24 horas após tratamento com 20E. Porém, neste mesmo trabalho os autores concluíram que o miR-281 não seja afetado pelo tratamento com HJ, nossos dados mostram que em abelhas acontece diferente pois a expressão de miR-281 foi alterada com o tratamento com HJ III, principalmente no primeiro ponto de coleta (1 hora) onde a relação entre o hormônio e o miR-281 foi inversa. Comparando com os dados obtidos por Hernandez (2013)

este miRNA responde igualmente ao hormônio HJ em fases iniciais e em fases finais do desenvolvimento.

O miR-281 foi ainda o que apresentou maior variações frente ao tratamento com 20E, sendo o 20E o único hormônio presente durante fases pupais (Rembold, 1987; Pinto et al., 2002), apontamos o miR-281 como regulador chave do desenvolvimento pupal.

O miR-252b foi o que apresentou menor variação entre os miRNAs analisados, mostrando diferença estatisticamente significativa apenas 1:30 após tratamento com HJ III (figura 28A). Para os outros pontos analisados e também para o experimento de tratamento com 20E o miR-252b não mostrou variação, sendo este pouco estimulado pelo tratamento com o hormônio HJ III e indiferente ao tratamento com 20E (figura 28B).

Figura 27. Expressão relativa do miR-252b perante tratamentos hormonais (HJ III / 20E) realizados com 1 hora, 1:30 hora e 24 horas. A= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 1µg/µl de HJ III, e controle com 1µl de acetona pura em fase de pupa de olho branco (Pw). B= Dados de expressão relativa em grupos tratados com 3µg/µl de 20E, e controle com 1µl de solução salina 0,9% em fase de pupa de olho marrom (Pb). O asterisco representa p valor menor que 0,05 no teste t realizado.

Nossos resultados mostram que o miR-252b não é responsivo aos hormônios HJ III e 20E, sendo que este miRNA apresentou diferença apenas em um ponto do tratamento com HJ III em 1:30 h. Contudo, como mostrado no trabalho de Rubio e colaboradores (2012) o miR-252 seria importante em estágios pré-metamórficos (N5), pois foi verificado este estar mais expresso do que durante estágios metamórficos (N6) em *B. germânica*, insetos hemimetábolos (dados de bibliotecas de miRNAs sequenciados através de NGS). Também em um trabalho de 2009, Liu e colaboradores apontaram o miR-252 como atuante no processo de desenvolvimento em *B. mori*.

Sendo bem provável este possuir papeis que não seja hormônio-dependente em fases pupais nas abelhas, uma vez que este miRNA teve interações validadas com os genes *Usp*, *chd64*, *ftz-f1* e *EcR* por Hernandez em 2016, além de estabelecer interações com os genes *inr2* e *gce* aqui preditas. Além do mais, dados contidos no trabalho de Hernandez (2016) sugerem que o miR-252b seja antagônico ao HJ em estágios larvais, porém em estágios pupais essa relação não foi verificada (figura 27A).

Os dados mostram que o miR-281 e o miR-34 respondem a ambos hormônios, sendo o miR-34 mais lento na resposta em relação ao miR-281. O miR-281 aparece como regulador do desenvolvimento pupal. Também verificamos que o miR-252b é bem mais estável perante os tratamentos hormonais, e o miR-252a (homólogo ao miR252b) um bom candidato a gene de referência para análise de dados de qPCR de miRNAs tal qual realizado em nosso trabalho.

5 – CONCLUSÃO

Nosso trabalho fornece dados a respeito das interações entre os hormônios HJ e 20E, os genes de resposta e miRNAs em fases próximas à emergência do adulto, ou seja, fases finais do desenvolvimento, mostrando que o comportamento de alguns genes é estágio-específico, tal qual o gene *gce*. Concluimos ainda que o comportamento do miR-34 é estágio-específico também, sendo o miR-28 regulador chave no processo do desenvolvimento pupal em *A. mellifera*, finalmente o papel do miR-252b em pupas, não dependente da ação de hormônios.

6 - REFERÊNCIAS

- Abdou, M. A., He, Q., Wen, D., Zyaan, O., Wang, J., Xu, J., ... & Wang, J. (2011). *Drosophila* Met and Gce are partially redundant in transducing juvenile hormone action. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(12), 938-945.
- Agui, N., Granger, N. A., Gilbert, L. I., & Bollenbacher, W. E. (1979). Cellular localization of the insect prothoracicotropic hormone: in vitro assay of a single neurosecretory cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(11), 5694-5698.
- Almeida, M. I., Reis, R. M., & Calin, G. A. (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 717(1), 1-8.
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350-355.
- Ament, S. A., Wang, Y., Chen, C. C., Blatti, C. A., Hong, F., Liang, Z. S., ... & Sinha, S. (2012). The transcription factor ultraspiracle influences honey bee social behavior and behavior-related gene expression. *PLoS genetics*, 8(3), e1002596.
- Areiza, M., Nouzova, M., Rivera-Perez, C., & Noriega, F. G. (2015). 20-hydroxyecdysone stimulation of juvenile hormone biosynthesis by the mosquito corpora allata. *Insect biochemistry and molecular biology*, 64, 100-105.
- Asgari, S. (2013). MicroRNA functions in insects. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43(4), 388-397.
- Bahrami, S., & Drabløs, F. (2016). Gene regulation in the immediate-early response process. *Advances in biological regulation*, 62, 37-49.
- Bahrami, S., & Drabløs, F. (2016). Gene regulation in the immediate-early response process. *Advances in biological regulation*, 62, 37-49.

- Barchuk, A. R., Maleszka, R., & Simões, Z. L. P. (2004). *Apis mellifera* ultraspiracle: cDNA sequence and rapid up-regulation by juvenile hormone. *Insect molecular biology*, 13(5), 459-467.
- Baumann, A., Barry, J., Wang, S., Fujiwara, Y., & Wilson, T. G. (2010). Paralogous genes involved in juvenile hormone action in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 185(4), 1327-1336.
- Behura, S. K. (2007). Insect microRNAs: Structure, function and evolution. *Insect biochemistry and molecular biology*, 37(1), 3-9.
- Belgacem, Y. H., & Martin, J. R. (2007). Hmgcr in the corpus allatum controls sexual dimorphism of locomotor activity and body size via the insulin pathway in *Drosophila*. *PLoS One*, 2(1), e187.
- Belles, X., & Santos, C. G. (2014). The MEKRE93 (Methoprene tolerant-Krüppel homolog 1-E93) pathway in the regulation of insect metamorphosis, and the homology of the pupal stage. *Insect biochemistry and molecular biology*, 52, 60-68.
- Bellés, X., Martín, D., & Piulachs, M. D. (2005). The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 50, 181-199.
- Bernardo, T. J., & Dubrovsky, E. B. (2012). The *Drosophila* juvenile hormone receptor candidates methoprene-tolerant (MET) and germ cell-expressed (GCE) utilize a conserved LIXXL motif to bind the FTZ-F1 nuclear receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7821-7833.
- Bitondi, M. M. G., Mora, I. M., Simoes, Z. L. P., & Figueiredo, V. L. C. (1998). The *Apis mellifera* pupal melanization program is affected by treatment with a juvenile hormone analogue. *Journal of insect physiology*, 44(5), 499-507.

- Bollenbacher, W. E., Smith, S. L., Goodman, W., & Gilbert, L. I. (1981). Ecdysteroid titer during larval-pupal-adult development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *General and comparative endocrinology*, 44(3), 302-306.
- Bond, N. D., Nelliott, A., Bernardo, M. K., Ayerh, M. A., Gorski, K. A., Hoshizaki, D. K., & Woodard, C. T. (2011). ssFTZ-F1 and Matrix metalloproteinase 2 are required for fat-body remodeling in *Drosophila*. *Developmental biology*, 360(2), 286-296.
- Broadus, J., McCabe, J. R., Endrizzi, B., Thummel, C. S., & Woodard, C. T. (1999). The *Drosophila* β FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Molecular cell*, 3(2), 143-149.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., ... & Vandesompele, J. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611-622.
- Culliney, T. W. (1983). Origin and evolutionary history of the honeybees *Apis*. *Bee World*, 64(1), 29-38.
- de Azevedo, S. V., & Hartfelder, K. (2008). The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development—differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae. *Journal of Insect Physiology*, 54(6), 1064-1071.
- Di Cara, F., & King-Jones, K. (2013). How clocks and hormones act in concert to control the timing of insect development. *Curr Top Dev Biol*, 105, 1-36.
- Dubrovsky, E. B. (2005). Hormonal cross talk in insect development. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 16(1), 6-11.
- Dubrovsky, E. B., Dubrovskaya, V. A., Bernardo, T., Otte, V., DiFilippo, R., & Bryan, H. (2011). The *Drosophila* FTZ-F1 nuclear receptor mediates juvenile hormone activation of E75A

- gene expression through an intracellular pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 286(38), 33689-33700.
- Elekonich, M. M., Jez, K., Ross, A. J., & Robinson, G. E. (2003). Larval juvenile hormone treatment affects pre-adult development, but not adult age at onset of foraging in worker honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of insect physiology*, 49(4), 359-366.
- Elias-Neto, Moyses. (2011). Diferenciação do exoesqueleto em abelhas eussociais: heterocronia da maturação cuticular. Tese de Doutorado, apresentada à faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Entomologia. Orientador: Bitondi Marcia Maria Gentile. 109 p. : il. ; 30cm
- Elsik CG, Tayal A, Diesh CM, Unni DR, Emery ML, Nguyen HN, Hagen DE. Hymenoptera Genome Database: integrating genome annotations in HymenopteraMine. *Nucleic Acids Research* 2016 Jan 4;44(D1):D793-800. doi: [10.1093/nar/gkv1208](https://doi.org/10.1093/nar/gkv1208) 10. Epub 2015 Nov 17. PubMed PMID : [26578564](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26578564/).
- Elsik, C. G., Worley, K. C., Bennett, A. K., Beye, M., Camara, F., Childers, C. P., ... & Elhaik, E. (2014). Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC genomics*, 15(1), 86.
- Fahrbach, S. E., & Robinson, G. E. (1996). Juvenile hormone, behavioral maturation, and brain structure in the honey bee. *Developmental neuroscience*, 18(1-2), 102-114.
- Fang, F., Xu, Y., Jones, D., & Jones, G. (2005). Interactions of ultraspiracle with ecdysone receptor in the transduction of ecdysone-and juvenile hormone-signaling. *The FEBS journal*, 272(7), 1577-1589.

- Feldlaufer, M. F., Herbert, E. W., Svoboda, J. A., Thompson, M. J., & Lusby, W. R. (1985). Makisterone A: The major ecdysteroid from the pupa of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect biochemistry*, 15(5), 597-600.
- Ferjani, I., Fattoum, A., Manai, M., Benyamin, Y., Roustan, C., & Maciver, S. K. (2010). Two distinct regions of calponin share common binding sites on actin resulting in different modes of calponin–actin interaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(9), 1760-1767.
- Fukuda, H., & Sakagami, S. F. (1968). Worker brood survival in honeybees. *Researches on Population Ecology*, 10(1), 31-39.
- Garófalo, C. A. (1977). Brood viability in normal colonies of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 16(1), 3-13.
- Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. F. (2016). *Developmental biology*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer.
- Gomez-Orte, E., & Belles, X. (2009). MicroRNA-dependent metamorphosis in hemimetabolan insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), 21678-21682.
- HARTFELDER, K. (1993). Structure and function of the prothoracic gland in honey bee (*Apis mellifera* L.) development. *Invertebrate reproduction & development*, 23(1), 59-74.
- Hartfelder, K., & Engels, W. (1998). 2 Social Insect Polymorphism: Hormonal Regulation of Plasticity in Development and Reproduction in the Honeybee. *Current topics in developmental biology*, 40, 45-77.
- Henrich, V. C., Rybczynski, R., & Gilbert, L. I. (1999). Peptide hormones, steroid hormones, and puffs: mechanisms and models in insect development. *Vitamins and hormones*, 55, 73-125.

- Hernandes, Natália Helena. (2013). Moléculas reguladoras do crescimento larval e da metamorfose em abelhas operárias *Apis mellifera*. Monografia apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP: Ciências Biológicas. Orientador: Nunes, F. M. F.
- Hernandes, Natália Helena. 2016. Identificação e validação das interações miRNA – mRNA na metamorfose de *Apis mellifera*. Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: Genética. Orientador: Simões, Zilá Luz Paulino.
- Hinton, H. E. (1946). Concealed phases in the metamorphosis of insects. *Nature*, 157(3991), 552.
- Hoess, R. H., Wierzbicki, A., & Abremski, K. (1986). The role of the loxP spacer region in PI site-specific recombination. *Nucleic acids research*, 14(5), 2287-2300.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443(7114), 931.
- Ibáñez-Ventoso, C., Vora, M., & Driscoll, M. (2008). Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PloS one*, 3(7), e2818.
- Jiang, J., Ge, X., Li, Z., Wang, Y., Song, Q., Stanley, D. W., ... & Huang, Y. (2013). MicroRNA-281 regulates the expression of ecdysone receptor (EcR) isoform B in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43(8), 692-700.
- Jindra, M., Bellés, X., & Shinoda, T. (2015 b). Molecular basis of juvenile hormone signaling. *Current Opinion in Insect Science*, 11, 39-46.
- Jindra, M., Palli, S. R., & Riddiford, L. M. (2013). The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annual review of entomology*, 58, 181-204.

- Jones, G., & Sharp, P. A. (1997). Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13499-13503.
- Kayukawa, T., Minakuchi, C., Namiki, T., Togawa, T., Yoshiyama, M., Kamimura, M., ... & Shinoda, T. (2012). Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of Krüppel homolog 1, a repressor of insect metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(29), 11729-11734.
- Kim, V. N. (2005). Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol cells*, 19(1), 1-15.
- Kingan, T. G., & Adams, M. E. (2000). Ecdysteroids regulate secretory competence in Inka cells. *Journal of Experimental Biology*, 203(19), 3011-3018.
- Krüger, J., & Rehmsmeier, M. (2006). RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic acids research*, 34(suppl 2), W451-W454.
- Krüger, J., & Rehmsmeier, M. (2006). RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic acids research*, 34(suppl 2), W451-W454.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
- Li, M., Mead, E. A., & Zhu, J. (2011). Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(2), 638-643.
- Li, Z. Q., Cheng, D. J., Wei, L., Zhao, P., Shu, X., Tang, L., ... & Xia, Q. Y. (2010). The silkworm homolog of Methoprene-tolerant (Met) gene reveals sequence conservation but function divergence. *Insect science*, 17(4), 313-324.
- Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews cancer*, 15(6), 321.

- Liu, P. C., Wang, J. X., Song, Q. S., & Zhao, X. F. (2011). The participation of calponin in the cross talk between 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone signaling pathways by phosphorylation variation. *PloS one*, 6(5), e19776.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lourenço, A. P., Mackert, A., dos Santos Cristino, A., & Simões, Z. L. P. (2008). Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, 39(3), 372-385.
- Lozano, J., & Belles, X. (2011). Conserved repressive function of Krüppel homolog 1 on insect metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous species. *Scientific reports*, 1, 163.
- Lozano, J., & Belles, X. (2014). Role of Methoprene-tolerant (Met) in adult morphogenesis and in adult ecdysis of *Blattella germanica*. *PloS one*, 9(7), e103614.
- Lucas, K., & Raikhel, A. S. (2013). Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43(1), 24-38.
- Mello, T. R., Aleixo, A. C., Pinheiro, D. G., Nunes, F. M., Bitondi, M. M., Hartfelder, K., ... & Simões, Z. L. (2014). Developmental regulation of ecdysone receptor (EcR) and EcR-controlled gene expression during pharate-adult development of honeybees (*Apis mellifera*). *Frontiers in genetics*, 5, 445.
- Mello, T. R., Aleixo. (2012). O papel dos receptores nucleares AmFTZ-F1 e EcR no desenvolvimento pupal de *Apis mellifera*. In: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.
- Michelette, E. D. F., & Soares, A. E. E. (1993). Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, 24(4), 431-440.

- Minakuchi, C., Namiki, T., & Shinoda, T. (2009). Krüppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Developmental biology*, 325(2), 341-350.
- Minakuchi, C., Zhou, X., & Riddiford, L. M. (2008). Krüppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of development*, 125(1), 91-105.
- Morlando, M., Ballarino, M., Gromak, N., Pagano, F., Bozzoni, I., & Proudfoot, N. J. (2008). Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nature structural & molecular biology*, 15(9), 902-909.
- Nijhout, H. F. (1994). *Insect hormones*. Princeton University Press. Princeton new Jersey.
- Nijhout, H. F., & Grunert, L. W. (2002). Bombyxin is a growth factor for wing imaginal disks in Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15446-15450.
- Orme, M. H., & Leever, S. J. (2005). Flies on steroids: the interplay between ecdysone and insulin signaling. *Cell metabolism*, 2(5), 277-278.
- Paul, R. K., Takeuchi, H., Matsuo, Y., & Kubo, T. (2005). Gene expression of ecdysteroid-regulated gene E74 of the honeybee in ovary and brain. *Insect molecular biology*, 14(1), 9-15.
- Pinto, L. Z., Hartfelder, K., Bitondi, M. G., & Simões, Z. L. P. (2002). Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *Journal of insect physiology*, 48(8), 783-790.
- Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A., & Hartfelder, K. (1990). Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *General and comparative endocrinology*, 79(1), 31-38.

- Rehmsmeier, M., Steffen, P., Höchsmann, M., & Giegerich, R. (2004). Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *Rna*, 10(10), 1507-1517.
- Rembold, H. (1987). Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry*, 17(7), 1003-1006.
- Riddiford, L. M. (1994). Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. In *Advances in insect physiology* (Vol. 24, pp. 213-274). Academic Press.
- Robinson, G. E., Strambi, A., Strambi, C., Paulino-Simões, Z. L., Tozeto, S. O., & Barbosa, J. M. N. (1987). Juvenile hormone titers in European and Africanized honey bees in Brazil. *General and Comparative Endocrinology*, 66(3), 457-459.
- Rubio, M., de Horna, A., & Belles, X. (2012). MicroRNAs in metamorphic and non-metamorphic transitions in hemimetabolan insect metamorphosis. *BMC genomics*, 13(1), 386.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A., & Barrell, B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 16(10), 944-945.
- Santos, A. E., Bitondi, M. M. G., & Simões, Z. L. P. (2001). Hormone-dependent protein patterns in integument and cuticular pigmentation in *Apis mellifera* during pharate adult development. *Journal of insect physiology*, 47(11), 1275-1282.
- Sempere, L. F., Sokol, N. S., Dubrovsky, E. B., Berger, E. M., & Ambros, V. (2003). Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity. *Developmental biology*, 259(1), 9-18.
- Thummel, C. S. (1995). From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members. *Cell*, 83(6), 871-877.

- Truman, J. W., Rountree, D. B., Reiss, S. E., & Schwartz, L. M. (1983). Ecdysteroids regulate the release and action of eclosion hormone in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Journal of Insect Physiology*, 29(12), 895-900.
- Ueda, H., Sonoda, S., Brown, J. L., Scott, M. P., & Wu, C. (1990). A sequence-specific DNA-binding protein that activates fushi tarazu segmentation gene expression. *Genes & development*, 4(4), 624-635.
- Wang, H. B., Ali, S. M., Moriyama, M., Iwanaga, M., & Kawasaki, H. (2012). 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone analog prevent precocious metamorphosis in recessive trimolter mutants of *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 42(2), 102-108.
- Weinstock, G. M., Robinson, G. E., Gibbs, R. A., Worley, K. C., Evans, J. D., Maleszka, R., ... & Elisk, C. G. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443(7114), 931-949.
- Whitfield, C. W., Behura, S. K., Berlocher, S. H., Clark, A. G., Johnston, J. S., Sheppard, W. S., ... & Tsutsui, N. D. (2006). Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314(5799), 642-645.
- Wigglesworth, V. B. (1940). The determination of characters at metamorphosis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Journal of Experimental Biology*, 17(2), 201-223.
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855-862.
- Winston, M. L. (2003). *A biologia da abelha*. Tradução de Carlos A. Osowski - Porto Alegre: Magister. 276p. ; il.

- Xu, L., Li, S., & Stohr, B. A. (2013). The role of telomere biology in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 8, 49-78.
- Yao, T. P., Segaves, W. A., Oro, A. E., McKeown, M., & Evans, R. M. (1992). *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, 71(1), 63-72
- Zamore, P. D., & Haley, B. (2005). Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science*, 309(5740), 1519-1524.
- Zufelato, M. S., Bitondi, M. M. G., Simoes, Z. L. P., & Hartfelder, K. (2000). The juvenile hormone analog pyriproxyfen affects ecdysteroid-dependent cuticle melanization and shifts the pupal ecdysteroid peak in the honey bee (*Apis mellifera*). *Arthropod structure & development*, 29(2), 111-119.

ANEXO I

Os dados a seguir não foram incluídos na dissertação pois o experimento conta com apenas duas repetições, sendo não possível realizar estatística para confirmação de significância entre as diferenças no grupo controle e tratado.