UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Efeitos de modificações na estrutura da colônia de
Apis mellifera sobre a expressão de genes do comportamento reprodutivo”.

Lucas Trevisoli Agostini

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para obtenção do título de Doutor em
Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação
em Entomologia

Ribeirão Preto - SP

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Efeitos de modificações na estrutura da colônia de
Apis mellifera sobre a expressão de genes do comportamento reprodutivo”.

Lucas Trevisoli Agostini

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para obtenção do título de Doutor em
Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação
em Entomologia.

Orientador: Profa. Dra.
Zilá Luz Paulino Simões

Ribeirão Preto SP

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Agostini, Lucas Trevisoli
Efeitos de modificações na estrutura da colônia de
Apis mellifera sobre a expressão de genes do comportamento
reprodutivo. Ribeirão Preto, 2021.
69 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia
Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:
Entomologia.

Orientador: Simões, Zilá Luz Paulino.

1. *Apis mellifera*. 2. Capacidade Reprodutiva. 3. Organização
Social. 4.

Aos meus pais, José Guilherme e Eliana de Fatima,

Aos meus irmãos Matheus e Thiago

.... Dedico.

Não sabemos quanto tempo nos
resta, não podemos desperdiçá-lo
lamentando coisas que não
podemos mudar.
(Stephen King)

Agradecimentos

- À CNPq pelo suporte financeiro. À Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, minha orientadora, por ter me recebido de maneira tão calorosa no LBDA, pelos ensinamentos, paciência, conversas e toda ajuda que foram fundamentais para a conclusão desse trabalho. Meu mais sincero obrigado.
- A secretária da entomologia Renata, que tanto me aguentou e me ajudou nas horas de aperto.
- A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), em especial ao professor Rodrigo Augusto Santinelo Pereira pelas dicas e conversas.
- A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), em especial ao professor Rodrigo Augusto Santinelo Pereira pelas dicas e conversas.
- Agradeço também à Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi pelas valiosas dicas e ensinamentos.
- À Profa. Dra. Anete Lourenço, sem ela não seria possível a existência desse trabalho, por tudo que me ensinou e por toda a ajuda em todas as fases desse trabalho, além dos momentos de desabafos e amizade.
- A todos os ICs e pós-graduandos do LBDA pela ajuda e ótimos momentos de trabalho e descontração.
- Um agradecimento especial aos meus amigos, Me. Fabio de Oliveira Barbin e Me. Thiago Depintor, que estiveram ao meu lado em todos os momentos, ajudando nos experimentos, nos momentos de distração pela acolhida em suas casas.
- A meus maravilhosos pais, Guilherme e Eliana que muito mais que eu se dedicaram para que esse trabalho fosse concluído, por todo apoio, compreensão e torcida. Muito obrigado por todo sacrifício que tiveram de fazer para que eu realizasse meus sonhos. Vocês são os melhores pais do mundo!
- Aos meus amados irmãos Matheus e Thiago por sempre fazerem meu dia especial, pelas risadas e momentos especiais.
- Ao amor da minha vida, Isabela, por sempre ter acreditado em mim, me dado força e apoio.
- A minha sogra Beth que sempre me recebeu com muito carinho e fez de sua casa meu segundo lar.
- À toda equipe do LBDA, em nome da Dra. Vera Figueiredo e do Luiz Aguiar por me ajudarem a resolver problemas relativos à experimentação e obtenção de amostras.
- Aos professores e técnicos que se tornaram grandes mentores e amigos.
- A todos que de alguma forma ajudaram e apoiaram na realização deste trabalho.

Muito Obrigado!!!

Sumário

1. Resumo.....	9
2. Abstract	10
3. Introdução	11
3.1 <i>Apis Mellifera</i>	11
3.2 Modulação hormonal do desenvolvimento de <i>A. mellifera</i>	14
3.2.1 Complexo Ecr / USP	17
3.2.2 Vitelogenina (Vg).....	19
3.2.3 Kruppel homolog 1 (Kr-h1)	20
3.3 MicroRNAs como sensores e moduladores dos genes	21
4. Justificativa	23
5. Objetivos	25
5.1 Objetivo Geral	25
5.2 Objetivos específicos	25
6. Materiais e método	26
6.1 Material Biológico	26
6.1.1 Colônia especial de observação	26
6.1.2 Verificação do grau de ativação dos ovários	28
6.1.3 Amostra de rainhas	30
6.2 Análise in sílico.....	30
6.2.1 Caracterização dos componentes da via de ecdisteróides	30
6.2.2 Predição computacional de interações miRNA-mRNA e reconstrução de redes regulatórias	31
6.3 Extração de RNA total	33
6.4 Síntese de cDNA e PCR em tempo real (qRT-PCR) para quantificação de mRNAs e microRNAs.....	34
6.5 PCR convencional e eletroforese para avaliação da eficiência dos <i>primers</i>	34

6.6 Perfil de expressão dos genes da via de insulina e dos miRNAs candidatos a reguladores	34
7. Resultados e discussão	36
7.1 Construção da rede de interações gênicas	36
7.2 Análise de qualidade e validação dos <i>primers</i>	37
7.3 Análise da ativação dos ovários	39
7.4 Análise da expressão dos genes candidatos e miRNAs em operárias de <i>A. mellifera</i>	42
7.5 Análise da expressão dos genes candidatos em rainhas virgens e fecundadas de <i>A. mellifera</i>	52
8. Conclusão	57
Referências	58

1. Resumo

As abelhas constituem o grupo economicamente mais importante e proeminente entre os polinizadores. Aproximadamente 35% da produção mundial de culturas alimentares depende em algum grau de polinizadores. A abelha *Apis mellifera* é a espécie mais importante para a polinização de culturas, teve um rápido crescimento global no número de colônias. A abelha da espécie *Apis mellifera* é um inseto eussocial e suas colônias são compostas por uma rainha, milhares de operárias e alguns machos sazonais. As operárias são facultativamente estéreis, seus ovários são muito reduzidos em relação aos das rainhas, mas permanecem funcionalmente competentes. Através de qRT-PCR, investigamos a transcrição relativa de genes ao longo da vida adulta das abelhas operárias tanto em condições normais quanto em condição de orfandade e assim definimos a participação de microRNAs específicos, miR -8, miR-14, miR-34 e bantam na regulação dos genes *E75*, *EcR*, *Kr-h1*, *USP* e *Vg* que são regulatórios da capacidade reprodutiva e os efeitos da modificação da colônia sobre esses genes. Verificamos também a transcrição relativa dos mesmos genes em rainhas virgens e fecundadas. Ao final pudemos concluir que a estrutura da população muda a expressão dos genes que atuam na reprodução.

Palavras chave: *Apis mellifera*; Capacidade Reprodutiva; Organização Social

2. Abstract

Bees are the most economically important and prominent group among pollinators. Approximately 35% of world food crop production depends on pollinators. The honeybee *Apis mellifera* is the most important species for the pollination of crops, it had a rapid global growth in the number of colonies. The bee of the species *A. mellifera* is an eusocial insect and its colonies are composed of a queen, thousands of workers and some seasonal males. The workers are optionally sterile, their ovaries are very small compared to those of queens, but they remain functionally competent. Through qRT-PCR, we define the participation of specific microRNAs, miR-8, miR-14, miR-34 and bantam in the regulation of the E75, EcR, Kr-h1, USP and Vg genes that are regulators of reproductive capacity and the effects of colony modification on these genes. We also verified the relative transcription of the same genes in virgin and fertilized queens. In the end we were able to conclude that the population structure changes the expression of genes that act in reproduction.

Keywords: *Apis mellifera*; Reproductive Capacity; Social Organization

3. INTRODUÇÃO

3.1. *Apis mellifera*

As abelhas constituem o grupo economicamente mais importante e proeminente entre os polinizadores. Aproximadamente 35% da produção mundial de culturas alimentares depende em algum grau de polinizadores, (Potts et al., 2016; Klein et al., 2007; Velthuis e van Doorn, 2006). A abelha *Apis mellifera* é a espécie mais importante para a polinização de culturas, teve um rápido crescimento global no número de colônias gerenciadas nas últimas décadas, em grande parte onde essa espécie foi introduzida (Geldmann, 2018), visto que sua distribuição natural é restrita a alguns continentes

Pertencentes à ordem Hymenoptera, as abelhas apresentam aproximadamente 20.000 espécies distribuídas em 7 famílias (Michener, 2007). As abelhas melíferas pertencem à família Apidae dividindo-se em três subfamílias, Bombinae, Meliponinae e Apinae, sendo que esta última inclui a tribo Apini, gênero *Apis* (Devillers, 2002). Acredita-se que as abelhas evoluíram juntamente com o surgimento das plantas fanerógamas, no Período Cretáceo, entre 146 a 76 milhões de anos (Collet, 2004) e se diversificaram juntamente com a irradiação evolutiva das angiospermas (Raven et al., 2001). O sucesso evolutivo desses insetos se deu principalmente devido a capacidade de se agruparem, o que permitiu o controle da temperatura interna das colônias. Essas características garantiram a permanência das abelhas em locais com temperaturas variadas, favorecendo a sua dispersão por regiões de climas diversos (Collet, 2004).

A abelha da espécie *Apis mellifera* é um inseto eussocial, isto é, apresenta, entre outras características, a divisão reprodutiva do trabalho entre os indivíduos da colônia, cuidados com a cria e sobreposição de gerações (Gullan & Cranston, 1994). As colônias são compostas por uma rainha, milhares de operárias e alguns machos sazonais (zangões) (Figura 1) que são criados apenas durante a estação reprodutiva, quando os recursos da

colônia são abundantes.

Figura 1. Os três diferentes tipos de indivíduos de uma colmeia de *Apis mellifera* (<https://www.britannica.com>)

Apesar de sua presença transitória na colmeia, os zangões têm a importante função de acasalar com rainhas virgens, as rainhas em seu voo nupcial acasalam com diversos machos isso contribui para a manutenção da variabilidade genética da colônia para seus parceiros para a produção de ovos fertilizados que se desenvolvem em operárias (Rangel, 2019). Os zangões se desenvolvem de ovos não fertilizados, portanto são haploides. O dimorfismo de castas, com a presença de rainhas e operárias, também é uma das características dessa espécie. As rainhas têm por funções o controle da colônia e a reprodução, produzindo substâncias denominadas feromônios e um aparelho reprodutor altamente desenvolvido (Michener, 1974; Barchuk et al., 2018), enquanto as operárias são responsáveis por desempenhar tarefas que promovem a manutenção da colônia, incluindo alimentação da cria e da rainha, construção de favos, coleta e processamento do alimento, defesa e limpeza da colônia. As rainhas são poliândricas e acasalam com vários zangões, atingem a maturidade sexual cerca de duas semanas após a emergência (Ellis, 2015). Depois que uma rainha termina seu voo nupcial final e retorna à colmeia, ela começa a armazenar os espermatozoides em sua spermateca, um órgão especializado,

encontrado em muitos insetos, e então inicia a oviposição dos ovos. Aproximadamente cerca de 3% a 5% dos espermatozóides ejaculados de cada zangão são armazenados na espermateca da rainha para futura fertilização dos ovos (Woyke, 1962; Schluns, 2005). Uma rainha pode armazenar aproximadamente cinco a seis milhões de espermatozoides em sua espermateca (Koeniger, 2000; Baer, 2002). Embora esse número possa apresentar variações, as rainhas são altamente eficientes e fertilizam cada ovo com uma média de dois espermatozoides; rainhas que são inseminadas com mais sêmen tendem a armazenar mais espermatozóides e, por sua vez, fertilizar os ovos com mais espermatozóides (Baer, 2017).

As operárias são facultativamente estéreis, seu aparelho reprodutor sofreu modificações durante o desenvolvimento, seus ovários são muito reduzidos em relação aos das rainhas, mas permanecem funcionalmente competentes (Snodgrass, 1956). Na ausência da rainha, as operárias da colônia podem ativar seus ovários e ovopositam ovos que originam machos, portanto, de ovos não fertilizados (Malka et al., 2007). Após a emergência, as operárias jovens normalmente começam como abelhas que cuidam da cria e de outros membros da colônia, incluindo a rainha. Depois de alguns dias, as operárias podem progredir para tarefas externas e coletar néctar, pólen e água (forrageiras). As mudanças fisiológicas associadas à progressão da casta das operárias incluem mudanças no armazenamento de nutrientes (Speth et al., 2015), regulação hormonal (Huang et al., 1995; Amdam et al., 2004), resiliência ao estresse oxidativo (Seehuus et al., 2006), mortalidade e dinâmica de envelhecimento (Speth et al., 2015; Amdam et al., 2005; Munch et al., 2013; Remolina et al., 2009).

Dentro da família Apidae, a espécie *A. mellifera* é tida como um excelente modelo para estudos voltados aos mecanismos de aprendizagem e memorização, e ainda, devido a sua alta capacidade cognitiva, tem sido usada para pesquisas básicas e aplicadas, pois

sua natureza singular associada ao interesse econômico faz com que elas sejam consideradas “rainhas dos insetos” (Menzel et al., 1996; Winston, 1991).

3.2. Modulação hormonal do desenvolvimento de *A.mellifera*

O principal fator responsável pelo dimorfismo das fêmeas na espécie *A. mellifera* é a nutrição diferencial da larva que ocorre durante os primeiros dias de desenvolvimento pós-embriônico. Dependendo do tipo e da quantidade de alimento recebido, uma mesma larva pode se tornar uma rainha ou operária. Essa alimentação diferencial ocorre a partir do 3º instar larval, afetando a atividade dos *corpora allata* e das glândulas prototorácicas, levando à liberação de diferentes títulos hormonais característicos de cada casta (Rachinsky et al., 1990). O desenvolvimento das castas em *Apis mellifera* é governado pela expressão diferencial de conjuntos de genes em resposta à alimentação diferencial durante o estágio larval, onde as rainhas são favorecidas com uma dieta mais rica contendo geleia real e açúcar (Barchuk et al., 2007; Maleszka, 2018). Redes de interação gênica são características de cada casta envolvem principalmente os títulos de hormônio juvenil e ecdisteróides, promovendo mudanças na expressão gênica da larva garantindo assim o seu destino (Hartfelder & Rembold, 1991; Barchuk et al 2007). Desse modo, o dimorfismo entre fêmeas não é uma consequência de diferenças genéticas, mas sim da influência de fatores como a alimentação diferencial modulando os títulos hormonais e a expressão gênica em larvas (Weaver, 1957; Shuel & Dixon 1960).

O sistema nervoso central das abelhas funciona como um órgão sensor, sinalizador e controlador dos eventos fisiológicos do organismo. Entre os insetos, um dos exemplos mais marcantes é a metamorfose, um processo finamente regulado por hormônios produzidos nas células neurosecretoras do cérebro em resposta a estímulos como, crescimento, aumento de peso e “timing”. O cérebro reage a estímulos ambientais

sintetizando e liberando um hormônio peptídico protoracicotrópico que estimula as glândulas protorácicas a sintetizarem e a secretarem ecdisona, uma proteína que faz parte da família dos ecdisteróides. A ecdisona no corpo gorduroso inicia o processo de muda. Além da ecdisona, vários outros ecdisteróides apresentam papéis essenciais na coordenação das mudas larvais e a metamorfose, como o 20-hidroxiecdisona (20E) (Niwa & Niwa, 2014). Este hormônio ativa a expressão dos receptores hormonais nucleares codificados pelos genes *Ecdysone receptor (EcR)* e *ultraspiracle (usp)*, os quais formam um heterodímero que tem a capacidade de se ligar a regiões promotoras de genes sensíveis à ecdisona, regulando assim sua expressão (Koelle et al., 1991; Yao et al., 1992; Yao et al., 1993). Grande parte das informações sobre os ecdisteróides foi obtida pela observação das transições durante o desenvolvimento, ou seja, estes hormônios apresentam um forte papel na coordenação do desenvolvimento a partir da fase larval, garantindo que a metamorfose ocorra no ritmo e momento adequados e que ao final o inseto adulto seja formado (Riddiford, 1993). Após a emergência do inseto adulto, não ocorrem grandes mudanças na morfologia e acredita-se que os ecdisteróides não mais exibirão papéis evidentes ao longo da vida adulta. No entanto, estudos recentes em *Drosophila melanogaster* revelaram que a biossíntese e sinalização pelos ecdisteróides ainda acontece durante a vida adulta e que estes hormônios estão envolvidos em vários processos como a ovogênese, resistência ao estresse, longevidade e atividade neuronal. Tanto em *A. mellifera* quanto em *D. melanogaster*, já foi demonstrado que enzimas esteroidogênicas são expressas no cérebro e que a síntese dos ecdisteróides pode ter um envolvimento com a modulação das atividades neuronais em adultos (Tsutsui et al., 2014; do Regoa & Vaudry, 2015). Em abelhas, ainda há uma grande lacuna, sendo necessário estudos que apontem o envolvimento dos ecdisteróides no desenvolvimento adulto. Possivelmente, estes hormônios podem estar envolvidos em diversos processos ao longo

da vida adulta de operárias, uma vez que estas apresentam uma grande plasticidade comportamental e podem sofrer mudanças fisiológicas de acordo com o avanço de sua idade. Além disso, nos perguntamos se o status reprodutivo de rainhas e operárias pode ser modulado pelos títulos de ecdisteróides, uma vez que estes são produzidos nos ovários e podem regular diversas etapas da ovogênese, como já foi visto em *D. melanogaster* (revisado em Niwa et al., 2015).

Em associação com a sinalização pela via dos ecdisteróides, a vitellogenin (Vg) também apresenta um importante papel, as operárias sofrem uma maturação comportamental associada à idade que depende dos títulos de Vg em sua hemolinfa (Amdam e Omholt, 2003, Guidugli et al., 2005, Nelson et al., 2007). Ainda, o hormônio juvenil apresenta também uma conexão com os ecdisteróides, principalmente agindo juntamente com o 20E para modular o desenvolvimento larval e possivelmente processos que ocorrem no inseto adulto. Uma queda acentuada nos títulos de Vg e um aumento nos títulos do hormônio juvenil levam as operárias a fazer a transição para forrageiras e deixar o ninho para coletar néctar e pólen (Amdam e Omholt, 2003, Nelson et al., 2007). Além disso, a Vg é usada pelas abelhas nutrizas como um doador de aminoácidos para a produção de geleia real (Amdam et al., 2003). A transcrição da vitelogenina é regulada hormonalmente por fatores de transcrição que interagem com a região reguladora upstream do gene Vg. Sítios de ligação são encontrados relacionados à ecdisona, como o complexo receptor de ecdisteróide (EcR / USP) (Paul et al., 2005) e os genes de resposta ao 20E Broad-Complex (BrC), ecdysone-induced protein 74 (E74) e ecdysone-induced protein 75 (E75) (Sun et al. 2002; Yang et al. 2014), foram detectados na região upstream do mosquito *Aedes aegypti* Vg (Zhen et al., 2018).

Assim como a Vg esta ligada a transição das operarias o Kruppel homolog 1 (Kr-h1) é associado a ativação dos ovarios em *Apis mellifera*. Minakuchi e colaboradores em

2008 mostraram que a expressão de Kr-h1 é regulada positivamente pelo hormônio juvenil durante o desenvolvimento pupal em *Drosophila melanogaster*. Assim como a Vg esta ligada a transição das operárias o Kruppel homolog 1 (Kr-h1) é associado a ativação dos ovários em *Apis mellifera*. Minakuchi e colaboradores em 2008 mostraram que a expressão de Kr-h1 é regulada positivamente pelo hormônio juvenil durante o desenvolvimento pupal em *Drosophila melanogaster*. A alta expressão de Kr-h1 é uma resposta ao aumento do hormônio juvenil na hemolinfa dos insetos, em resposta a esse aumento do hormônio juvenil a expressão da Vg vai caindo.

3.2.1. Complexo EcR / Usp

O heterodímero EcR / Usp se liga a uma série de elementos de resposta à ecdisona promovendo a expressão de vários genes responsivos ao ecdisteróide (Nakagawa e Henrich, 2009). Assim, o complexo EcR / USP induz a ativação transcricional de genes no processo de muda (Figura 2), o que desencadeia os genes das vias de sinalização reguladas por ecdiesteróide em artrópodes, o complexo EcR / USP controlam rigidamente o mecanismo regulatório da transdução de sinal e a compreender a modulação dos genes EcR e USP proporcionará uma melhor compreensão das vias ecdiesteróides em artrópodes. Dessa forma, os tempos das mudas larvais e a coordenação dos eventos metamórficos são regulados pelas flutuações nos títulos dos ecdisteróides na hemolinfa e pela subsequente ativação de cascatas gênicas dependentes desses hormônios (Pinto et al., 2002).

A expressão dos genes EcR e USP e seus papéis durante a embriogênese e muda foram extensivamente investigados em artrópodes (Kato et al., 2007, Bortolin et al., 2011). É amplamente documentada a função de EcR e USP na regulação da reprodução e embriogênese na mosca *Drosophila melanogaster* (Oro et al., 1992; Thomas et al. 1993;

Lezzi et al., 2002), no escaravelho vermelho *Tribolium castaneum* (Xu et al., 2010) e no mosquito *Aedes aegypti* (Martin et al., 2001) foi bem estudado. Além disso, EcR / USP provou ser um alvo eficaz para inseticidas e outros estressores químicos / ambientais (Nakagawa e Henrich, 2009, Hwang et al., 2016). A ativação desses produtos químicos dependente da ligação com os genes EcR e USP, essa ligação foi estudada na pulga d'água *Daphnia magna* e *D. melanogaster* (Kato et al., 2007). Além disso, os efeitos adversos de uma série de ecdiesteróides comotestosterona, tebufenozida e bifenis policlorados em EcR e USP foram relatados em invertebrados (Zou e Fingerman, 1997, LeBlanc et al., 2000, Dinan et al. 2001, Mu et al., 2005a, Planello et al., 2008).

O complexo EcR / usp ainda regulam pós-transcricionalmente a expressão de genes envolvidos na morfogênese neuromuscular, levando a características corporais adultas em *Apis mellifera* e *Drosophila melanogaster* (Chawla e Sokol, 2012; Bellés, 2014).

Figura 2. Ilustração das vias de sinalização do ecdiesteróide e o envolvimento dos genes EcR e USP (modificado de Puthumana et al., 2017).

3.2.2. Vitellogenin (Vg)

A vitelogenina (Vg) é um precursor do vitelo em insetos e animais produtores de ovos, como peixes e pássaros (Tufail e Takeda, 2008; Tufail et al., 2014; Sun e Zhang, 2015). Em insetos a Vg é expressa no corpo gorduroso de maneira que atua no aparecimento de vários traços fenotípicos em rainhas e abelhas operárias (Amdam et al., 2003; Guidugli et al., 2005). A concentração de vitelogenina no sangue em rainhas se correlacionou positivamente com a taxa de produção de ovos. A vitelogenina também desempenha um papel importante no processo de diferenciação de castas é secretada na hemolinfa e, então, absorvidos pelo desenvolvimento de oócitos por meio de endocitose mediada por receptores de Vg (Tufail e Takeda, 2008; Tufail et al., 2014). Uma série de estudos mostrou diversos papéis da Vg que não estão ligados a reprodução, como imunidade, longevidade e antioxidação, (Havukainen et al., 2013; Singh et al., 2013; Salmela et al., 2015; Salmela e Sundström, 2017).

É possível encontrar na literatura artigos que relatam atividade imune de Vgs, incluindo propriedades antibacterianas (Singh et al., 2013; Salmela et al., 2015). Vg se liga a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e moléculas padrão associadas a patógenos, como lipopolissacarídeo (LPS), peptidoglicano (PG) e zimosan (Singh et al., 2013; Salmela et al., 2015). A Vg também está envolvida na regulação da função imunológica por meio da interação direta com as células imunológicas (Amdam et al., 2004). Recentemente, foi demonstrado que o Vg atua como portador de eliciadores imunológicos da rainha para os ovos em abelhas (Salmela et al., 2015).

Um título mais alto de Vg em abelhas operárias está associado a uma maior resistência ao estresse oxidativo e a uma vida útil prolongada (Seehuus et al., 2006). Além disso, diferenças específicas de casta na expressão de Vg estão envolvidas na regulação da longevidade da abelha rainha (Corona et al., 2007). A Vg protege as células contra o

dano oxidativo e melhora a tolerância ao estresse oxidativo celular, o que sugere um mecanismo de Vg que estende o tempo de vida das abelhas (Havukainen et al., 2013).

3.2.3. Kruppel homolog 1 (Kr-h1)

O Kruppel homolog 1 (Kr-h1) é um gene que foi identificado pela primeira vez em um estudo utilizando *D. melanogaster*, este gene está ligado e pode regular a metamorfose dos inseto (Schuh et al. 1986). Kr-h1 está intrinsicamente relacionado à regulação do comportamento, ativação do ovário e divisão do trabalho (Fussnecker e Grozinger, 2008) e servindo como um importante sinalizador em processos de muda e metamorfose mediados pelo hormônio juvenil (Kayukawa et al., 2012; Minakuchi et al., 2008) em abelhas da espécie *A. mellifera* (Grozinger et al. 2007; Whitfield et al. 2003; Shpigler et al. 2010; Kilaso et al., 2017).

A expressão do Kr-h1 está fortemente ligada ao comportamento de forrageiras nas operárias de *A. mellifera*. A expressão do fator de transcrição Kr - h1 no cérebro das abelhas foi significativamente maior em forrageiras do que em abelhas que desempenham funções dentro da colônia (Whitfield et al., 2003; Grozinger e Robinson, 2007). Além disso, o feromônio mandibular da rainha retarda a transição do comportamento de cuidado com as crias para forrageamento (Robinson et al., 1998; Pankiw & Page, 2003) e desregula a expressão de genes que podem estar associados ao forrageamento, incluindo Kr - h1 (Grozinger et al., 2003). No entanto, uma vez que as forrageiras são muito diferentes em quase todos os aspectos como fisiologia, estrutura neuroanatômica e comportamento (Robinson & Ben - Shahr, 2002), a expressão de Kr - h1 pode estar envolvida diretamente no comportamento de forrageiras.

3.3. MicroRNAs como sensores e moduladores dos genes

Além das vias de sinalização hormonais regularem espacial e temporalmente o desenvolvimento de insetos, outra classe de moléculas reguladoras denominadas microRNAs também atuam modulando diversos processos biológicos, como a organogênese, metamorfose, apoptose, crescimento celular, desenvolvimento do sistema nervoso, ovogênese, comportamento, locomoção, entre outros (Grun et al., 2005). Estudos recentes têm evidenciado que os miRNAs também atuam como integrantes das vias de sinalização sistêmicas, como a biossíntese de hormônios. Estes atuam como potenciais reguladores da expressão gênica em nível pós-transcricional e também podem ter sua expressão modulada em resposta às mudanças ambientais e fisiológicas (revisado por Luhur et al., 2013).

Uma variedade de miRNAs já foi descrita em insetos, incluindo abelhas. Em *D. melanogaster* alguns miRNAs já foram descritos como reguladores da via de insulina, principalmente em resposta ao status nutricional, com destaque para os miRNAs miR-14, miR-278, miR-8, miR-33 e miR-1. Estes atuam dentro da via de insulina de forma a regular a expressão de genes envolvidos na produção de Insulin-like no cérebro de adultos (miR-14), na homeostase energética, muscular e lipídica (miR-278, miR-1 e miR-33), e no tamanho corporal (miR-8). (Sokol & Ambros, 2005; Teleman et al., 2006; Hyun et al., 2009; Varghese et al., 2010; Davalos et al., 2011).

Os miRNAs também atuam como integrantes das vias hormonais, como nas vias de sinalização pelo hormônio juvenil e ecdisteróides, e podem agir tanto regulando a expressão dos genes envolvidos nessas vias, como ter a sua expressão modulada pelos títulos flutuantes destes hormônios (revisado por Luhur et al., 2013). O miR-34 é um exemplo de miRNA que é regulado diferencialmente pelos hormônios 20E e JH. Em células cultivadas de *D. melanogaster*, altos títulos de 20E reprimem a expressão de miR-

34, enquanto o tratamento com um análogo do JH, metopeno, atua de forma antagônica ao 20E, induzindo a expressão desse miRNA. Outros miRNAs como o miR-100, miR-let-7, miR-125 e miR-8 podem ser ativados ou inibidos de acordo com o tipo de sinalização endócrina (Aravin et al., 2003; Sempere et al., 2003; Leaman et al., 2005; Jin et al., 2012). Em especial, acredita-se que a co-expressão de miR-100, let-7 e miR-125, os quais estão localizados no mesmo cluster gênico denominado *let-7-Complex (let-7-C)*, seja regulada pelo receptor de ecdisona (EcR) ou por seus próprios alvos (Sokol et al., 2008). A regulação dos níveis transcricionais de *let-7-C* dependente de ecdisona é um processo conservado que apresenta papel importante na diferenciação e proliferação celular, na metamorfose e no desenvolvimento do sistema nervoso central (revisado por Luhur et al., 2013). Enquanto a sinalização desencadeada pela ecdisona ativa a expressão de *let-7-C*, a repressão da expressão de miR-8 e miR-14 acontece pela mesma via (Jin et al., 2008; Varghese & Cohen., 2007).

Os miRNAs miR-14 e miR-8 também representam conexões moleculares entre as duas vias, onde estes são reprimidos por 20E e por sua vez regulam negativamente a expressão de genes da via de insulina (Hyun et al., 2009; Jin et al., 2012; Varghese & Cohen, 2007; Varghese et al., 2010). Dessa forma, o que se acredita é que há uma interação entre as vias de sinalização hormonais e os miRNAs, no sentido de coordenar espacial e temporalmente diversos processos biológicos em insetos através da regulação da expressão gênica em níveis transcricionais e pós-transcricionais.

4. JUSTIFICATIVA

As bases genéticas e moleculares da via de ecdisteróides em insetos têm sido melhor exploradas no contexto da metamorfose e na reprodução de insetos adultos. Entretanto, em abelhas, pouco se sabe como essa via responde ao longo da vida de operárias e se esta interage com a via de insulina, bem como se afeta a expressão dos miRNAs. Poucos trabalhos descrevem a ocorrência da síntese de ecdisteróides ao longo da vida adulta em abelhas e há uma escassez de dados que apontem suas possíveis funções nessa fase do desenvolvimento. O que se sabe é que alguns neurônios no sistema nervoso central respondem a sinais endócrinos e que alguns subtipos de células Kenyon dos corpos cogumelares (*mushroom bodies*) expressam genes da via de ecdisteróides em larvas, pupas e operárias jovens de *A.mellifera*, sugerindo que esses hormônios podem estar associados à regulação do funcionamento dos gânglios nervosos (Velarde et al., 2009). Além disso, também foi descrito que o gene *E75* é expresso em ovários de rainhas, o que implica que a via de sinalização dos ecdisteróides apresenta um papel importante na fisiologia reprodutiva de abelhas adultas. No entanto, ainda há pouca informação que aponte de que forma os ecdisteróides se comportam ao longo de toda a vida de abelhas adultas, e ainda se os miRNAs são sensíveis à essa sinalização podendo ter sua expressão modulada ou se apresentarem como potenciais reguladores. É provável que a interação dessa via juntamente com os miRNAs exerça papéis importantes no desenvolvimento cerebral e status reprodutivo de abelhas ao longo da vida adulta, principalmente em operárias que apresentam uma alta plasticidade comportamental e a possibilidade de mudar seu status reprodutivo de acordo com as condições da colônia. Ainda uma pergunta possível: os genes ligados ao comportamento e reprodução e os miRNAs podem ter o papel de promover a resistência ao estresse e interferir na longevidade tanto em rainhas como em operárias?

Nesse contexto, assumindo que existem ainda muitas questões não elucidadas a respeito do envolvimento dos genes ligados a vias de ecdisteróides e do desenvolvimento adulto de insetos, propomos nesse projeto avaliar como estas vias se comportam ao longo da vida adulta em abelhas operárias de *A.mellifera* em condições normais ou de estresse, como a orfandade, as possíveis relações entre elas. Além disto, pretendemos investigar como os miRNAs podem ser modulados ou regulam essas duas vias. Nossa proposta é baseada na hipótese de que tanto as vias de ecdisteróides e insulina em conjunto com os miRNAs atuam regulando processos biológicos em diferentes momentos da vida adulta de operárias, os quais podem estar associados à maturação comportamental, status reprodutivo e longevidade.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

O principal objetivo desse trabalho é avaliar como os genes ligados as via de ecdisteróide e reprodução insulina são moduladas ao longo do desenvolvimento adulto de abelhas *A.mellifera* e como os miRNAs interagem e respondem em ambas as vias.

5.2. Objetivos específicos

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

- Caracterizar a expressão gênica dos componentes genéticos da via dos ecdisteróides ao longo da idade adulta de operárias de *A.mellifera*;
- Realizar a predição de miRNAs que potencialmente regulam genes da via de ecdisteróides e avaliar como a expressão destes é modulada ao longo da idade adulta de operárias;
- Determinar se os componentes genéticos da via de ecdisteróides, incluindo os miRNAs, apresentam uma modulação diferencial em situações de orfandade e estresse.

Verificar se existem diferenças entre as vias de ecdisteróides rainhas virgens e acasaladas tanto no sistema nervoso central.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Material Biológico

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

6.1.1. Colônia especial de observação

Para o presente trabalho foram utilizadas 2 colônias especiais de observação (Figura 3) com abelhas provenientes de duas colônias distintas. O experimento foi realizado em duas etapas, primeiramente com a presença da rainha e posteriormente sem a presença da rainha, com as operárias em condições de orfandade. O uso desse modelo de colônia permitiu o acompanhamento da maturação comportamental e coleta de abelhas com a mesma idade. Inicialmente, para a montagem da colônia de observação foram introduzidas aproximadamente 2000 abelhas operárias, provenientes do apiário, juntamente com um quadro rico em pólen, mel, cria e espaço para postura. Uma rainha virgem sem parentesco com as abelhas foi introduzida no mesmo dia. Após um período de aproximadamente 15 dias, com a colônia já estabelecida (rainha fecundada em postura e com a constatação de abelhas forrageiras), foram introduzidas cerca de 500 abelhas recém-emergidas, com cerca de 2 horas depois de emergidas, marcadas com tinta indelével (Figura 4) dando início a primeira etapa do experimento, em condições normais com a presença da rainha. A marcação nos garantiu o controle da idade de todas as abelhas introduzidas. Foram então coletadas abelhas em diferentes idades de desenvolvimento adulto (recém-emergidas, 3 dias, 7 dias, 15 dias, 25 dias e 45 dias). Após essa etapa do experimento, foi realizada a segunda etapa, na condição sem rainha, onde a rainha foi

retirada da caixa de observação, após a retirada da rainha foi aguardado um período de 5 dias, este período foi necessário para não haver influência dos feromônios da rainha nas novas abelhas que seriam introduzidas. Após esse tempo 500 abelhas recém-emergidas (irmãs das operárias utilizadas na primeira etapa do experimento) e marcadas foram introduzidas. Essa etapa teve por finalidade coletar abelhas nas condições de orfandade e estresse. As coletas foram realizadas do mesmo modo em que ocorreram na primeira etapa. As abelhas coletadas em ambas as etapas do experimento ($n=5$) foram anestesiadas em gelo e dissecadas para a verificação do grau de ativação dos ovários, e era retirada a cabeça. As cabeças foram colocadas imediatamente em 500 μ L de TRIzol®, para posterior extração de RNA total. Todas as amostras coletadas foram estocadas em freezer -80° C até uso.

Figura 3. Colônia de observação

Figura 4. Abelha operária de *Apis mellifera* marcada com tinta indelével.

6.1.2. Verificação do grau de atividade dos ovários

Para verificar o grau de ativação dos ovários as abelhas tinham suas cabeças removidas e o tórax e abdômen eram colocados em solução salina (NaCl 0,9 %) preparada com água DEPC (dietilpirocarbonato – inibidor de RNAase) estéril e gelada. Com o auxílio de um Microscópio Estereoscópio e o uso de micro-pinças e alfinetes esterilizados, as abelhas eram fixadas em uma placa de Petri com parafina e o o ovário era retirado e fotografado para posterior classificação. Foi considerado uma escala de 5 pontos para a classificação onde:

- 0 – Ovário sem sinal de ativação
- 1 – Ovário no início da ativação
- 2 – Ovário ativo
- 3 – Ovário com a presença ou formação de ovos
- 4 – Ovário com sinais de oviposição (Figura 5)
- 5 – Ovário em desintegração (Figura 6)

Figura 5. Ovário com a presença de ovos e sinais de oviposição. Ovários ativados de operárias órfãs de *A. mellifera* de 25 dias de idade. Setas apontam sinais de oviposição.

Figura 6. Ovário desintegrado. Ovários de operárias órfãs de *A. mellifera* de 40 dias de idade, mostrando sinais claros de desintegração.

6.1.3. Amostras de rainhas

Para avaliar as diferenças nos níveis de expressão de genes envolvidos na via do ecdisteróides, para tanto também realizamos a coleta das cabeças das rainhas virgens e acasaladas. Para isso, foi realizada a coleta de rainhas virgens e acasaladas provenientes de diferentes colônias mantidas no apiário experimental. Além disso, as rainhas virgens e acasaladas tinham a mesma idade, sendo que para manter a virgindade das primeiras, estas eram mantidas em uma tela excludora de rainha dentro da colônia. Dessa forma, a rainha virgem não saiu para o voo nupcial e pode ser coletada no status reprodutivo inativo, porem na mesma idade das outras rainhas acasaladas e em postura.

6.2. Análise in silico

6.2.1. Caracterização dos componentes da via de ecdisteróides.

Inicialmente, foi realizado um levantamento bibliográfico dos principais genes que participam das vias de ecdisteróides. A partir disso, foram recuperadas as sequências ortólogas daqueles genes selecionados a partir de bancos de dados específicos como GenBanK, BeeBase (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> e <http://hymenopteragenome.org/beebase/>) e a versão 4.5 do genoma de *A.mellifera*. As sequências de aminoácidos de cada gene foram também recuperadas e utilizadas no banco de dados Beebase através da ferramenta tBLASTn com a finalidade de obtermos as sequências codificadoras de cada gene (CDS) (tabela 1). A partir da região CDS obtida, foram utilizadas as coordenadas dos éxons para realizar a anotação da estrutura de cada gene através da ferramenta Artemis 7.0. Após a anotação gênica, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para posterior amplificação de cada gene nas análises moleculares. Foram selecionados os genes *E75*, *Vg*, *USP*, *Kr-h1* e *EcR* os quais

respondem à sinalização por ecdisona e também codificam as enzimas que participam da síntese de ecdisteróides.

Gene	<i>Forward Primer</i>	<i>Reverse Primer</i>
E75	5' CTTGCGCCGAGAGGGTGAC 3'	5' CGGAACAGAAGAGGCCGAG 3'
Vg	5' GCAGAATACATGGACGGTGT 3'	5' GAACAGTCTTCGGAAGCTTG 3'
USP	5' CTCATCAACCCCGGAAACT 3'	5' ACTTCCGGAGAGAGGGTGGT 3'
Krh-1	5' GGAAAACCATATACTTGCGACA 3'	5' TCCATTGTTTTCTTTGAACCAA 3'
Ecr	5' CCAACAGCAACAACGGCTAC 3'	5' AAAGAGCCAGGCTGCGACAA 3'
Rpl-32	5' - CGTCATATGTTGCCAACTGGT-3'	5' - TTGAGCACGTTCAACAATGG-3'

6.2.2. Predição computacional de interações miRNA-mRNA e reconstrução de redes regulatórias

Em abelhas da espécie *A. mellifera*, já foram descritos 254 microRNAs (mirBase v 21). Para selecionar aqueles microRNAs que possivelmente regulam ou são modulados pelas vias de ecdisteróides e insulina, realizamos inicialmente uma predição computacional de miRNAs com probabilidade de se ligarem a sítios específicos das regiões 3'UTR dos mRNAs selecionados nesse trabalho através da ferramenta RNAhybrid e parâmetros default. A partir disso, foram reconstruídas redes de interação miRNA-mRNA utilizando a ferramenta computacional Cytoscape® 3.7.1. A partir da

literatura, selecionamos previamente um grupo de miRNAs que já foram descritos com algum envolvimento nas vias aqui estudadas em *D.melanogaster*, sendo estes os miRNAs miR 8, Bantam, Mir-14, Mir-34,. Dessa forma, baseando-se na predição computacional, confirmaremos se estes miRNAs foram descritos em *A.mellifera* e se estes apresentam sítios de interação com genes das vias estudadas. Assim, foi possível realizar uma seleção criteriosa de miRNAs para a validação experimental. As sequências para os microRNAs em estudo foram recuperadas a partir do banco de dados miRBase (<http://www.mirbase.org/>), onde a própria sequência do miRNA maduro corresponderá ao primer que foi utilizado para a análise da expressão gênica.

Gene	<i>Forward Primer</i>
miR-8	5'-TAATACTGTCAGGTAAAGATGTC-3'
Bantam	5' TGAGATCATTGTGAAAGCTGATT 3'
miR- 14	5'-TCAGTCTTTTTCTCTCTCCTA-3'
miR- 34	5'-TGGCAGTGTTGTTAGCTGGTTG-3'
miR- 252b	5'-TTAAGTAGTAGTGTCGTAGATGA-3'

6.3. Extração de RNA total

A extração do RNA total foi realizada a partir da cabeça das abelhas utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. Para evitar degradação por RNases, as amostras foram ressuspensas em água DEPC 0,1%. Em seguida as amostras foram incubadas em presença de 10 unidades de DNase I por 30 minutos à 37°C para evitar contaminação com DNA genômico. A pureza e a quantidade de RNA foram avaliadas partir da leitura da absorbância óptica obtida em aparelho NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer V3.03 (NanoDrop Technologies).

6.4. Síntese de cDNA e PCR em tempo real (qRT-PCR) para quantificação de mRNAs e microRNAs

- Genes Codificadores de proteínas (mRNAs)

O RNA total purificado foi padronizado em 3µg por microlitro e foi submetido à reação de Transcrição Reversa (RT) para a síntese de moléculas de cDNA, em volume final de 20µL utilizando o kit Super Script III a partir do seguinte protocolo: 1 µL de oligo(dT)12-18 (500 ng/µL), 1 µL de uma mistura de dNTPs (10 mM), com incubação em termociclador a 65°C por 5 min; 2 µL de tampão RT (Invitrogen), 4 µL de cloridrato de magnésio (Invitrogen), 2 µL de ditriotreitol 0,1 M (DDT, Invitrogen), 1 µL de inibidor de Rnase (RNase OUTTM, 40 U/µL, Invitrogen) e 0,5 µL da enzima SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen) com incubação a 50°C por 50 min, com posterior ciclo de inativação da enzima a 70°C por 15 min.

6.5. PCR convencional e eletroforese para avaliação da eficiência dos *primers*

Foi realizada uma PCR convencional a fim de verificar se a temperatura de pareamento para qual o *primer* foi desenhado atendia ao esperado. Nesta etapa verificou-se também se o produto da amplificação é único. Para realizar a PCR convencional adicionou-se 10 µL do reagente PCR Master Mix 2x (Promega), 7,4 µL de água milliq, 0,8 µL do *primer Reverse*, 0,8 µL do *primer Forward* e 1 µL de cDNA. As amostras foram então colocadas no termociclador variando o número de ciclos e a temperatura de pareamento de acordo com cada par de *primer*. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1% em tampão SB corado com UniSafe. O tamanho do fragmento amplificado foi comparado ao Ladder de 100pb. Os *primers* foram desenhados para amplificarem fragmentos de aproximadamente 130 pb.

6.6. Perfil de expressão dos genes da via de insulina e dos miRNAs candidatos a reguladores

As análises dos níveis de transcrição dos genes de interesse e dos miRNAs candidatos foram realizadas por meio de qPCR utilizando-se Power SYBR® Green (Applied Biosystems) no sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems).

Foram analisadas 5 amostras biológicas em triplicata técnica (5 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas). O gene da proteína ribossomal L32 (*rpl32*) foi utilizado como normalizador para os genes (LOURENÇO et al., 2008) e o miR-252b para os microRNAs. A partir do cDNA obtido, foi feita a análise da expressão gênica de genes selecionados da via de ecdisteróides de qRT-PCR, utilizando o protocolo do reagente SYBR Green

(Applied Biosystems). Foram desenhados primers específicos para amplificação de cada gene selecionado. A reação final consiste em: 10 µL de solução SYBR® Green (Applied Biosystems), 6,4 µL de água deionizada e autoclavada, 0,8 µL de cada primer (10 pmol/µL) e 2 µL da solução de cDNA (diluição 1:10). As reações serão realizadas em triplicatas e processadas em aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos), seguidos por 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto). Para normalizar a expressão dos genes será utilizado o gene RpL 32 e as análises da expressão relativa serão realizadas a partir do método 2- $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen 2001). As análises dos níveis de transcritos foram feitas de acordo com a metodologia de $\Delta\Delta C_t$ comparativo formulada por PFAFFL et al., 2004, em que foi utilizado um nível de significância $p \leq 0,05$ (test t de Student) a fim de comparar e analisar os níveis dos transcritos entre as amostras com a presença e ausência de rainha. As análises estatísticas para um mesmo grupo foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad PRISM v. 6.0 (One way ANOVA) e para comparação entre os grupos, Two way ANOVA. Para verificarmos como se comportam os genes E75, Vg, USP, Krh-1 e Ecr e dos microRNAs miRNAs miR-8, miR-14 e miR34 e miR-batmam.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Construção da rede de interações gênicas

Neste presente trabalho iniciamos as etapas com um levantamento da literatura para escolha dos genes, posteriormente uma predição dos miRNAs que interagem com esses genes e a construção de uma rede de interação até o perfil de transcrição desses genes e miRNAs.

Para a identificação das possíveis interações miRNA-RNA, realizamos análises *in silico* para verificar a estrutura desses genes através da anotação dos mesmos utilizando o software Artemis v. 15.0.0, permitindo assim o desenho de primers. Os sítios putativos de ligação dos miRNAs, miR-8, miR-14, miR-34 e Bantam foram preditos utilizando o software RNAhybrid e através do programa Cytoscape® versão 3.8.2 foram reconstruídas redes de interações entre os genes e miRNAs alvos do estudo. Ao realizarmos o cruzamento dos genes selecionados com todos os miRNAs de *Apis mellifera* disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) construímos a Figura 7 que mostra uma clara interação do miR-8 com os genes *E75*, *Vg* e *EcR*. O miR-14 mostrou interação com os dois genes, *Vg* e *Krh-1*. Na predição de interação o miR-34 interage com os genes *E75*, *Vg*, *Krh-1*, e *EcR*. Os genes *USP* e *Krh-1* apresentaram interação com miRNA Bantam.

Figura 7. Rede de interação miRNA-mRNA alvo. Rede de interação entre todos miRNAs de *Apis mellifera* (quadrados coloridos agrupados) e seus genes alvos (quadrados coloridos) reconstruída através da predição de interação pelo software online RNAhybrid e graficamente desenhada através do programa Cytoscape.

7.2. Análise de qualidade e validação dos *primers*

Para uma análise mais robusta dos dados de expressão gênica, foram analisadas 5 amostras biológicas em triplicata técnica (5 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas) para cada idade. Realizadas as devidas checagens de integridade das amostras, em que constatamos que os fragmentos amplificados utilizando-se primers para o gene *rpL32*, não só tinham o tamanho esperado, como também, um único fragmento de 130 bp (Figuras 8), prosseguimos com a análise por qPCR dos primers para os genes *E75*, *Vg*, *USP*, *Krh-1* e *EcR*, bem como dos miRNAs *miR-8*, *miR-14* e *miR-34* e *Bantam* (Figura 9) em que as abelhas foram mantidas em suas colônias de origem sem que houvesse

qualquer interferência, ou seja, em condições normais.

Figura 8. Experimentos de PCR convencional e análise em gel de agarose para checagem dos *primers* descritos na Tabela 1. Foi utilizado como normalizador, o gene *rpl32*. Marcador:100pb. cérebro; 0 dias de idade; 3 dias de idade; 7 dias de idade; 15 dias de idade; 25 dias de idade e 40 dias de idade; B: Branco.

Figura 9. Análise dos produtos de PCR para verificação da eficiência dos primers desenhados para amplificação de *E75*, *Vg*, *USP*, *Krh-1* e *EcR*. Eletroforese em gel de agarose 1%. Marcador:100pb. B: Branco.

7.3. Análise da ativação dos ovários

As operárias em idades e condições controladas foram primeiramente dissecadas para extração dos ovários, para análise referente a sua ativação a mesma abelha teve a cabeça removida para a extração do RNA.

A esterilidade facultativa das operária tipo requer um controle das operárias por parte da rainha, este controle se dá por meio da liberação de feromônio por parte da rainha, mantendo assim a maioria das operárias com o ovário no status inativo (Dietemann et al., 2005, van Oystaeyen et al., 2014).

No presente trabalho utilizamos ovários de abelhas recém-emergidas como grupo controle, onde nenhum dos ovários, de um total de 10 abelhas para cada colônia utilizada

no trabalho, apresentou qualquer sinal de ativação. Foi utilizado o teste qui-quadrado para a comparação do controle com os demais dias de coleta, apenas abelhas com 3 dias de idade não mostraram diferença significativa em relação ao controle (Figura 10). Nas coletas das abelhas com idade entre 15 e 25 dias foi tomado o cuidado de coletar abelhas de dentro da colônia e abelhas que trabalham como forrageiras, para isso as forrageiras eram coletadas na entrada da colônia e quando era observada a presença de pólen na corbícula.

Figura 10. Gráfico com as porcentagens dos ovários inativos e ativos coletados na colônia 1. Abelhas com idade de 7, 15, 25 e 40 dias mostraram diferença significativa em relação ao controle ($p = 0,025$). Zero significa ovário não ativado, 1 ovário no início da ativação, 2 ovário ativo, 3 ovário com a presença ou formação de ovos, 4 ovário com sinais de oviposição, desintegrando: ovário em desintegração.

Nossos resultados corroboram com diversos trabalhos que mostram a constância no efeito que o feromônio da rainha exerce sobre as operárias, sendo este feromônio um agente supressor da ativação do ovário (por exemplo, Strauss et al., 2008). A supressão da ativação dos ovários resultaria de uma corrida evolucionária por dominância entre as castas, na qual as mutações reprodutivas nas operárias seriam contrariadas por mudanças

no feromônio rainha para restabelecer a dominância (Hefetz e Katzav-Gozansky, 2004). Espera-se que tal corrida evolutiva leve a uma proliferação de compostos feromonais ao longo do tempo (Hefetz e Katzav-Gozansky, 2004) e à perda de função de outros feromônios (Keller e Nonacs, 1993). A função e composição fortemente conservada dos feromônios da rainha e da operária ao longo do tempo evolutivo aponta para a hipótese de que os feromônios da mandíbula medeiam um 'diálogo' entre operárias e rainhas e entre operárias (Kocher e Grozinger, 2011) sobre sua fertilidade e seu domínio reprodutivo.

Além do feromônio mandibular da rainha outros fatores influenciam na ativação dos ovários das operárias, como mudanças na dieta, por exemplo (Dombroski et al., 2003; Pirk et al. 2010, Frias et al., 2015), níveis de CO₂ (Koywiwattrakul et al., 2005), e expressão diferencial de genes (Thompson et al., 2007; Duncan et al., 2020). Wang e colaboradores (2020) mostram que o neurotransmissor tiramina tem efeito na vitelogênese e na produção de Vg em dois tecidos diferentes (ovário e corpo gorduroso) em larvas e operárias de *A. mellifera*, em contrapartida Cardoso-Júnior et al. (2019) mostram que a expressão de Vg não está correlacionada com a ativação de ovários de operárias, e sugere que Vg tem funções não reprodutivas em ovários de operárias.

Assim como em nosso trabalho Koywiwattrakul e Sittipraneed (2009) mostraram que as operárias sem a presença de rainha mostraram um nível significativamente mais alto de desenvolvimento e ativação ovariana, incluindo operárias com ovários totalmente ativos. Em seu trabalho esse nível de ativação apareceu pela primeira vez em operárias a partir de 10 dias, em nosso trabalho esse nível de ativação foi verificado a partir da idade de 7 dias após a emergência. Nossos dados vão de acordo, onde também foi demonstrado que abelhas com poucos dias de idade já mostravam sinais de ativação dos ovários.

7.4. Análise da expressão dos genes candidatos e miRNAs em operárias de *A. mellifera*.

Os resultados obtidos pela amplificação dos genes alvo, por qPCR (Termociclador StepOne Plus, Applied Biosystems), foram analisados quanto aos níveis de expressão, utilizando-se o método $\Delta\Delta C_t$ comparativo. Para isso foi calculado a média dos valores de C_t entre as réplicas técnicas das amostras. O valor numérico de C_t é inversamente proporcional à quantidade inicial do transcrito, ou seja, quanto menor valor de C_t , maior é a expressão do gene de interesse (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Calculando-se a diferença de C_t entre o gene de interesse e o gene controle (rpl32 e miR-252b), foram obtidos os valores de ΔC_t , usados nos testes estatísticos (Two Way ANOVA) com nível de significância $\leq 0,05$, e para construção dos gráficos foram transformados em $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (figuras 11 a 16).

Na primeira etapa do experimento, com a presença da rainha, é possível observar que há uma clara modulação na expressão dos genes estudados. Avaliamos também como esses mesmos genes e miRNAs respondem à condição de orfandade, isto porque as operárias podem passar para status de poedeiras e ainda podem regredir ou avançar na transição nutriz-forrageira a fim de manter o funcionamento do ninho. Para tal estudo, realizamos novamente o perfil de expressão dos genes selecionados utilizando abelhas das mesmas idades que a primeira etapa (0, 3, 7, 15, 25 e 40 dias) porém provenientes de um ninho sem a rainha, ou seja, operárias órfãs. Observamos que, diferentemente da condição normal, os genes não apresentaram, de forma geral, um padrão bem evidente dos níveis de transcrição. Apenas o gene *E75* (Figura 11) não mostrou diferença significativa nos níveis de expressão em todas as idades quando comparado na colônia com a presença de rainha e na condição de orfandade.

Figura 11. Perfil de transcrição dos genes *E75* e *EcR* no cérebro durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha, 0,5,10,15,20 - dias de vida. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$; ** Nível de significância $\leq 0,001$; *** Nível de significância $\leq 0,0001$; **** Nível de significância $\leq 0,00001$.

Figura 12. Perfil de transcrição dos genes *Kr-h1* e *USP* no cérebro durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha, 0,5,10,15,20 - dias de vida. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$; ** Nível de significância $\leq 0,001$; *** Nível de significância $\leq 0,0001$; **** Nível de significância $\leq 0,00001$.

Figura 13. Perfil de transcrição do gene Vg no cérebro durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha, 0,5,10,15,20 - dias de vida. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$; ** Nível de significância $\leq 0,001$.

Na análise de dados cruzados apenas as abelhas com 3 dias de idade mostraram diferença significativa em relação as abelhas com 7 dias de idade em relação aos níveis de expressão do gene *E75* na condição com rainha. Já para as abelhas órfãs aquelas com 15 dias de idade mostram diferença significativa para as abelhas recém-emergidas. Porém é notável um pico de expressão do gene *E75* nas abelhas com 3 dias de idade na condição com rainha (Figura 11).

O gene *E75* juntamente com o gene Broad-Complex (BR-C) está associado a uma cascata genica que eventualmente induz a morte celular programada e respondem a Ecdisona (Baehrecke e Thummel, 1995). Essas cascatas de genes reguladas por ecdisteróides também têm papéis importantes na oogênese em insetos (Tzolovsky et al., 1999; Kozlova et al., 2000; Sun et al., 2002). Considerando que os genes regulados por ecdisteróides são necessários para a morte celular programada em *D. melanogaster*

(Martin e Bachrecke, 2004), BR-C, *E75* e *E74* podem estar envolvidos na degeneração e remoção de células foliculares dos oócitos. Essas descobertas sugerem ainda que os genes regulados por ecdiesteróides estão envolvidos na oogênese de uma maneira específica em *A. mellifera* (Paul et al., 2006). Assim como no presente trabalho Velaverde et al. (2009) encontraram picos de *E75* nos primeiros 3 dias de vida de *A. mellifera* em colônias com a presença de rainha. Takeuch et al. (2007) demonstrou que *E74*, *E75* e BR-C são preferencialmente expressos nas células foliculares do ovário da rainha, sugerindo um papel na oogênese. O gene *E75* está envolvido no destino do ovócito. Se continua ou não o progresso pela ovogênese ou se é conduzido ao processo de morte celular. Segundo alguns autores, os ovários das operárias, mesmo na presença das rainhas, estão sempre tentando iniciar o processo de ativação (Ronai et al., 2015; Ronai et al., 2016; da Cruz-Landim et al., 2017). Este fato poderia explicar a rápida resposta à ausência da rainha

O gene EcR, um receptor da ecdisona forma um heterodimérico com o gene ultraspiracle (USP) (Hill et al., 2013). O EcR é expresso nos corpos cogumelares de abelhas operárias e forrageadoras jovens. Isso é importante pois a expressão coincidente de AmEcR e AmUSP, que acontece no cérebro das abelhas, é necessária para a formação do heterodímero que permite a regulação da transcrição do ecdiesteróide (Yao et al., 1993).

Em nosso trabalho o EcR não mostrou diferença significativa nos níveis de expressão quando cruzamos os dados entre as idades das abelhas na condição com rainha, já na condição sem rainha a expressão de EcR mostrou diferença significativa em relação às recém-emergidas com 15 e 25 dias de idade, porém, o gene foi mais expresso aos 7 dias de idade das operárias, na presença da rainha e uma maior expressão aos 15 dias de idade nas abelhas sem rainha (Figura 11).

O gene *Krh-1* teve um pico de expressão nas operárias com 3 dias de idade na condição com rainha que se diferenciou significativamente das demais idades; na colônia sem da rainha, operárias com 7 e 40 dias mostraram diferença em relação as abelhas de 0 e 3 dias.

Assim como a *Vg*, o gene *Kr-h1* está fortemente associado ao comportamento de forrageamento. Whitfield et al. (2003) mostraram que *Kr - h1* no cérebro das abelhas foi significativamente maior em forrageadoras do que em abelhas mais jovens (Whitfield et al., 2003) e é maior em forrageiras do que em todos os outros grupos comportamentais (Grozinger e Robinson, 2007). Apesar dessas afirmações chama a atenção em nosso trabalho os resultados obtidos nas idades de 7 dias na condição sem rainha e 3 dias com rainha. A expressão desse gene poderia estar sofrendo interferência de algum outro gene também expresso nessa idade? Apesar dos resultados inesperados é possível verificar que nos níveis de *Kr-h1* quando comparados com os níveis de *Vg* mostraram um comportamento esperado, quando os níveis de *Vg* aumentam os de *Kr-h1* caem (Figura 14).

Os níveis do feromônio da rainha podem atrasar a mudança no comportamento das operárias dentro da colônia, de nutridoras para forrageiras (Robinson et al., 1998; Pankiw & Page, 2003), este atraso leva a desregulação da expressão de genes associados ao forrageamento como é o caso do *Kr-h1*. Ao utilizarmos um modelo de colônia de observação, tratando-se de uma colônia pequena, para a execução desse experimento podemos ter influenciado no grau de influência do hormônio da rainha, o que pode explicar a expressão incomum nas idades já mencionadas. Fussnecker e Grozinger (2008) afirmam que os níveis de *Kr-h1* nos cérebros de abelhas que após passarem pela fase de forrageamento e voltarem ao comportamento de nutridoras não são menores do que os níveis de forrageiras; assim, a alta expressão de *Kr - h1* não está especificamente

associada à produção ativa do comportamento de forrageamento, mas pode estar associada a alguma outra mudança fisiológica associada ao estado de forrageamento, como mudanças neuroanatômicas no cérebro, e também concluem que como as forrageiras são diferentes em quase todos os aspectos de suas irmãs mais novas em termos de idade, fisiologia, estrutura neuroanatômica e comportamento (Robinson & Ben - Shahr, 2002), a expressão de Kr-h1 pode não estar envolvida na produção direta do comportamento de forrageamento, mas pode ser diferencialmente expresso simplesmente como um subproduto de um desses outros fatores comportamentais.

Orlova et al. (2003) verificou os níveis de expressão de diversos genes estando entre eles Kr-h1 e Vg e mostrou que em seu estudo todos os genes foram afetados pela presença da rainha e pela presença da cria da mesma maneira, embora em graus diferentes, isso sugere que a abelha *A. mellifera* apresenta um repertório maior e mais diverso de mecanismos regulatórios do que outros insetos eusociais mais primitivos, onde os efeitos de diferentes fatores sociais usam as mesmas alavancas regulatórias (Robinson e Ben-Shahr, 2002; Toth et al., 2010).

O gene USP em *A. mellifera* liga-se ao hormônio juvenil e sua expressão pode ser modulada pelos títulos de hormônio juvenil. Existe uma relação direta entre o título de hormônio juvenil e os níveis de Vg na hemolinfa de fêmeas de *A. mellifera* durante as horas finais do desenvolvimento pupal e durante os primeiros dias de vida adulta (Barchuk et al., 2002). A expressão USP segue de perto os perfis de título de hormônio juvenil (Fang et al., 2005). Esta relação entre os níveis de Vg/ USP através do hormônio juvenil é percebida nos resultados obtidos neste trabalho os níveis de USP e Vg aumentam nas mesmas idades, pois USP é expresso no cérebro das abelhas ao longo de todo o período de desenvolvimento comportamental adulto (Velarde et al., 2006). Os níveis de USP e EcR também podem se associados em nosso trabalho, este resultado coincide com

o mostrado por Yao et al. (1993) e Velaverde et al. (2009) onde EcR e USP formam heterodímero que permite a regulação da transcrição do ecdiesteróide (Yao et al., 1993).

Figura 14. Perfil comparativo de transcrição do gene Vg e Kr-h1 no cérebro durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha, 0,5,10,15,20 - dias de vida. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$

Em nosso trabalho os genes escolhidos assim como os miRNAs que avaliamos responderam à condição de orfandade, isto porque as operárias podem passar para status

de poedeiras ativando seu ovário e ainda podem regredir ou avançar na transição nutriz-forrageira a fim de manter o funcionamento do ninho. Diversos estudos mostram que a expressão de alguns genes nos “mushroom bodies” muda de acordo com a divisão de trabalho e a fase em que a operária de encontra (Ben-Shahar, 2005; Yamazaki et al., 2006; Denison e Raymond-Delpech, 2008; Heylen et al., 2008).

No presente trabalho é possível notar uma diferença significativa entre os níveis de transcrição dos microRNAs escolhidos, tanto entre as idades quanto na comparação entre as colônias com e sem a presença da rainha (Figuras 15 e 16). Os microRNAs foram identificados como importantes reguladores pós-transcricionais. MicroRNA são RNAs não codificadores de pequeno tamanho (aproximadamente 22 nucleotídeos) que regulam a expressão gênica reprimindo a tradução ou degradação do RNA mensageiro (mRNA). Alguns microRNAs foram verificados ou previstos para regular até centenas de alvos por meio de emparelhamento impreciso de bases (Bartel e Chen, 2004; Grun et al., 2005; Krek et al., 2005; Lim et al., 2005; Bartel, 2009). Desse modo alguns miRNAs podem ter efeitos significativos na regulação pós-transcricional. Além disso, alguns miRNAs podem trabalhar juntos por meio de sinergismo (Bartel, 2009). Esta característica dos miRNAs de regular diversos genes e atuarem em conjunto pode explicar as diferenças nos níveis de transcrição que ocorreram na comparação entre idade e entre as colônia nesse nosso trabalho.

Figura 15. Perfil de transcrição dos miRNAs miR-8, miR-14 no cérebro durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha, 0,5,10,15,20 - dias de vida. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$; ** Nível de significância $\leq 0,001$; *** Nível de significância $\leq 0,0001$; **** Nível de significância $\leq 0,00001$.

Figura 16. Perfil de transcrição dos miRNAs miR-8, Bantam no cérebro durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha, 0,5,10,15,20 - dias de vida. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$; ** Nível de significância $\leq 0,001$; *** Nível de significância $\leq 0,0001$; **** Nível de significância $\leq 0,00001$.

Os miRNAs bantam, miR-8, miR-14 e miR-34 em *A. mellifera* estão ligados a orientação do axônio, fatores de transcrição basais, cálcio, endocitose, transdução

olfativa, via Wnt, antígenos, endocitose, insulina, endocitose, vias metabólicas diversas, digestão e absorção de proteínas, proteólise mediada por ubiquitina (Shi et al, 2014).

Hori e colaboradores (2011) inferem que o miR-34 pode atuar em funções neurais em *A. mellifera* e que a expressão dos miRNAs podem variar de acordo com os processos biológicos que estão relacionados (He et al., 2005; Fiore et al., 2009).

Um pequeno número de miRNAs com altos níveis de expressão desempenham um papel importante nas mudanças comportamentais dependentes da idade nas abelhas desde a função de nutriz até forrageiras (Liu et al., 2012). Em sua pesquisa Liu et al. (2012) testou a expressão de diversos miRNAs no desenvolvimento de forrageiras e nutridoras e também verificou uma variação dos níveis de expressão dos miRNAs nas diferentes fases das abelhas usadas em seu estudo.

Podemos verificar que a colônia órfã altera os níveis de expressão dos genes e micros utilizados no estudo. O tipo de colônia utilizada, por ser de tamanho reduzido, pode também ter influência nos níveis de expressão dos genes.

7.5. Análise da expressão dos genes candidatos em rainhas virgens e fecundadas de *A. mellifera*.

As abelhas são insetos sociais que possuem a capacidade de se desenvolver em duas castas distintas, com características morfológicas e fisiológicas diferentes, a partir de um mesmo genoma, em resposta a estímulos ambientais (Winston, 1991; Groh e Rössler, 2008). Este fascinante fenômeno biológico é conhecido como diferenciação de castas.

A nutrição é uma pista chave que induz a diferenciação de casta (Haydak, 1943; Weaver, 1955; Kucharski et al., 2008; Maleszka, 2014). Muitos nutrientes são diferentes entre a geleia real e a geleia consumida pelas operárias (Wang et al., 2016). Além disso,

as vias alternativas de desenvolvimento das abelhas rainhas e operárias também estão associadas a mudanças transcricionais sutis (Barchuk et al., 2007).

No presente trabalho, avaliamos novamente o perfil de expressão dos genes selecionados utilizando abelhas rainhas de mesma idade, portanto foram usados dois grupos, um com rainhas virgens que foram impedidas de realizar o voo nupcial e um segundo grupo com rainhas fecundadas. Observamos que os genes, de forma geral, tiveram um padrão bem evidente dos níveis de transcrição, porém nos genes selecionados apenas o gene Vg mostrou uma diferença significativa na comparação entre os grupos.

Figura 17. Perfil de transcrição do gene *E75* no cérebro de rainhas de *A. mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$; ** Nível de significância $\leq 0,001$; *** Nível de significância $\leq 0,0001$; **** Nível de significância $\leq 0,00001$

Figura 18. Perfil de transcrição do gene EcR no cérebro de rainhas de *A. mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$; ** Nível de significância $\leq 0,001$; *** Nível de significância $\leq 0,0001$; **** Nível de significância $\leq 0,00001$

Figura 19. Perfil de transcrição do gene *E75* no cérebro de rainhas de *A. mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$; ** Nível de significância $\leq 0,001$; *** Nível de significância $\leq 0,0001$; **** Nível de significância $\leq 0,00001$

Figura 20. Perfil de transcrição do gene Vg no cérebro de rainhas de *A. mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$; ** Nível de significância $\leq 0,001$; *** Nível de significância $\leq 0,0001$; **** Nível de significância $\leq 0,00001$

Figura 21. Perfil de transcrição do gene E75 no cérebro de rainhas de *A. mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$; ** Nível de significância $\leq 0,001$; *** Nível de significância $\leq 0,0001$; **** Nível de significância $\leq 0,00001$

A expressão de genes é diferente em operárias e rainhas (Hepperle e Hartfelder 2001; Barchuk et al. 2007; Chen et al. 2012; Cameron et al. 2013). O desenvolvimento das castas em *A. mellifera* é governado pela expressão diferencial de conjuntos de genes em resposta à alimentação diferencial durante o estágio larval, o que favorece rainhas na quantidade de geléia real e açúcar (Barchuk et al., 2007; Maleszka, 2018).

8. Conclusão

A estrutura da população está intrinsecamente ligada a expressão dos genes que atuam na reprodução. Os genes selecionados estão comprovadamente ligados a capacidade reprodutiva de abelhas operárias da espécie *Apis mellifera*.

Referências

- A. HEFETZ, T. KATZAV-GOZANSKY. **Are multiple honeybee queen pheromones indicators for a queen-workers arms race?** *Apiacta*, 39 (2004), pp. 44-52
- A. VAN OYSTAEYEN, R.C. OLIVEIRA, L. HOLMAN, J.S. VAN ZWEDEN, C. ROMERO, C.A. OI, P. D'ETTORRE, M. KHALES, J. BILLEN, F. WÄCKERS, J.G. MILLAR, T. WENSELEERS. **Conserved class of queen pheromones stops social insect workers from reproducing.** *Science*, 343 (2014), pp. 287-290
- AMDAM, G. V., AASE, A., SEEHUUS, S. C., FONDRK, M. K., NORBERG, K., HARTFELDER K. **Social reversal of immunosenescence in honey bee workers.** *Experimental Gerontology*. 2005
- AMDAM, G. V., HARTFELDER, K., NORBERG, K., HAGEN, A., OMHOLT, S. W. **Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite Varroa destructor (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering?** *Journal of economic entomology*. 2004
- AMDAM, G. V., OMHOLT, S. W. **The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis.** *Journal of theoretical biology*, 223(4), 451-464. 2003.
- AMDAM, G.V., NORBERG, K., HAGEN, A., AND OMHOLT, S.W. **Social exploitation of vitellogenin.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, pp. 1799–1802. 2003
- ARAVIN, A. A., LAGOS-QUINTANA, M., YALCIN, A., ZAVOLAN, M., MARKS, D., SNYDER, B. **The small RNA profile during Drosophila melanogaster development.** *Developmental Cell*. 5(2), 337–350.2003
- BAER, B. **Sexual selection in Apis bees.** *Apidologie* 2005.
- BAER, B.; COLLINS, J.; MAALAPS, K.; DEN BOER, S.P.A. **Sperm use economy of honeybee (Apis mellifera) queens.** *Ecol. Evol.* 2017.
- BAER, B.; COLLINS, J.; MAALAPS, K.; DEN BOER, S.P.A. **Sperm use economy of honeybee (Apis mellifera) queens.** *Ecol. Evol.* 2016.
- BARCHUK, A. R., BITONDI, M. M. G., SIMÕES, Z.L.P. **Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of Apis mellifera.** *J Insect Sci* 2: 1: 8pp. 2002
- BARCHUK, A. R., CRISTINO, A. S., KUCHARSKI, R., COSTA, L. F., SIMÕES, Z. L., MALESZKA, R. **Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee Apis mellifera.** *BMC developmental biology*, 7(1), 70. 2007
- BARCHUK, A. R., CRISTINO, A. S., KUCHARSKI, R., COSTA, L. F., SIMÕES, Z. L. P. MALESZKA, R. **Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee Apis mellifera.** *BMC Developmental Biology*. 2007

BARCHUK, A. R., DOS SANTOS, G. D., CANESCHI, R. D., DE PAULA JUNIOR, D. E., MODA, L. M. R. **The ontogenetic saga of a social brain.** *Apidologie*, 49(1), 32-48. 2018

BARCHUK, A. R., FIGUEIREDO, V. L. C., SIMÕES, Z. L. **Downregulation of ultraspiracle gene expression delays pupal development in honeybees.** *Journal of insect physiology*, 54(6), 1035-1040. 2008

BARCHUK, A. R., SANTOS, G. D., CANESCHI, R. D., PAULA JUNIOR, D. MODA, L. M. R. **The ontogenetic saga of a social brain.** *Apidologie*, 49. 2018

BARCHUK, A.R., CRISTINO, A.S., KUCHARSKI, R., COSTA, L.F., SIMÕES, Z.L., MALESZKA, R. **Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honey bee *Apis mellifera*.** *BMC Dev. Biol.* 7, 70. 2007

BARTEL, D. P. **MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.** *Cell*, 136, pp. 215-233. 2009

BARTEL, D. P., CHEN, C. Z. **Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs.** *Nature Reviews Genetics*, 5, pp. 396-401. 2004

BELLÉS, X., SANTOS, C. G. **The MEKRE93 (Methoprene tolerant-Krüppel homolog 1-E93) pathway in the regulation of insect metamorphosis, and the homology of the pupal stage.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* 52, 60–68. 2014.

BEN-SHAHAR Y. **The foraging gene, behavioral plasticity, and honeybee division of labor.** *J. Comp. Physiol. A* 191, 987–994. 2005.

BORTOLIN, F., PIULACHS, M.-D., CONGIU, L., FUSCO, G. **Cloning and expression pattern of the ecdysone receptor and retinoid X receptor from the centipede *Lithobius peregrinus* (Chilopoda, Lithobiomorpha).** *Gen. Comp. Endocrinol.*, 174, pp. 60-69. 2011.

CAMERON, R. C., DUNCAN, E. J., DEARDEN, P. K. **Biased gene expression in early honeybee larval development.** *BMC Genomics* 14, 903, 2013

CARDOSO-JÚNIOR, C. A. M., OLDROYD, B., & RONAI, I. **Vitellogenin expression in the ovaries of adult honeybee workers provides insights into the evolution of reproductive and social traits.** *bioRxiv*, 547760. 2019

CHAWLA, G., SOKOL, N. S. **Hormonal activation of let-7-C microRNAs via EcR is required for adult *Drosophila melanogaster* morphology and function.** *Development* 139, 1788–1797. 2012.

CHEN, X., HU, Y., ZHENG, H., CAO, L., NIU, D., YU, D., SUN, Y., HU, S., HU, F. **Transcriptome comparison between honey bee queen- and workerdestined larvae.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42(9), 665–673. 2012

COLLET, T. **Estruturas genéticas das populações de abelhas Africanizadas (*Apis mellifera* L.) do Brasil e Uruguai determinada por meio de polimorfismos do DNA mitocôndrial.** 2004. 66p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) -

Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

CORONA, M., VELARDE, R. A., REMOLINA, S., MORAN-LAUTER, A., WANG, Y., HUGHES, K. A., ROBINSON, G. E. **Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 104, pp. 7128-7133. 2007.

DA CRUZ-LANDIM, C., PATRÍCIO, K., ANTONIALLI JR, W. F. **Cell death and ovarian development in highly eusocial bees (Hymenoptera, Apidae): caste differentiation and worker egg laying.** Journal of Morphological Sciences, 23(1), 0-0. 2017.

DAVALOS, A., GOEDEKE, L., SMIBERT, P., RAMIREZ, C. M., WARRIER, N. P., ANDREO, U. **miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(22), 9232–9237. 2011.

DENISON R., RAYMOND-DELPECH V. **Insights into the molecular basis of social behaviour from studies on the honeybee, *Apis mellifera*.** Invert. Neurosci. 8, 1–9. 2008.

DEVILLERS, J. **The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology.** In: Devillers, J. Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. (Ed.). Minh-Hà Pham-Delègue, p. 1-11. 2002

DINAN, L., BOURNE, P., WHITING, P., DHADIALLA, T. S., HUTCHINSON, T. H. **Screening of environmental contaminants for ecdysteroid agonist and antagonist activity using the *Drosophila melanogaster* B cell in vitro assay.** Environ. Toxicol. Chem., 20, pp. 2038-2046. 2001.

do REGOA, J. L., VAUDRY, H. **Comparative aspects of neurosteroidogenesis: From fish to mammals.** Comp Endocrinol. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.05.014. 2015.

DOMBROSKI, T. C. D., SIMÕES, Z. L. P., & BITONDI, M. M. G. **Dietary dopamine causes ovary activation in queenless *Apis mellifera* workers.** *Apidologie*, 34(3), 281-289. 2003

DUNCAN, E. J., LEASK, M. P., & DEARDEN, P. K. **Genome architecture facilitates phenotypic plasticity in the honeybee (*Apis mellifera*).** *Molecular Biology and Evolution*. 2020

E. H. BAEHRECKE AND C. S. THUMMEL. **The *Drosophila* E93 gene from the 93F early puff displays stage- and tissue-specific regulation by 20-hydroxyecdysone.** Dev Biol 171:85–97. 1995.

ELLIS, J., LAWRENCE, J. C., KOENIGER, N., KOENIGER, G. MATING. **Biology of Honey Bees (*Apis mellifera*);** Wicwas Press: Kalamazoo, MI, USA, 2015

FANG, F., XU, Y., JONES, D., JONES, G. **Interactions of ultraspiracle with ecdysone receptor in the transduction of ecdysone-and juvenile hormone-signaling.** The FEBS journal, 272(7), 1577-1589. 2005.

FIORE R., KHUDAYBERDIEV S., CHRISTENSEN M., SIEGEL G., FLAVELL S.W., KIM T.K., GREENBERG M.E., SCHRATT G. **Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels.** EMBO J. 28, 697–710. 2009

FRIAS, B. E. D., BARBOSA, C. D., & LOURENÇO, A. P. **Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): impact on adult health.** *Apidologie*, 47(1), 15-25. 2016

FUSSNECKER, B., C. GROZINGER. Dissecting the role of Kr-h1 brain gene expression in foraging behavior in honey bees (*Apis mellifera*). *Insect molecular biology* 17.5: 515-522. 2008

FUSSNECKER, B., GROZINGER, C. **Dissecting the role of Kr-h1 brain gene expression in foraging behavior in honey bees (*Apis mellifera*).** *Insect molecular biology*, 17(5), 515-522. 2008.

G. SUN, J. ZHU, C. LI, Z. TU, AND A. S. RAIKHEL. E74, an ecdysone inducible early gene, is involved in the ecdysteroid gene regulatory hierarchy during mosquito vitellogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 190:147–157. 2002

G. TZOLOVSKY, W. M. DENG, T. SCHLITT, AND M. BOWNES. The function of the Broad-Complex during *Drosophila* oogenesis. *Genetics* 153:1371–1383. 1999

GELDMANN, J., GONZÁLEZ-VARO, J. P. **Conserving honey bees does not help wildlife.** *Science*, 359(6374), 392-393. 2018.

GROZINGER, C. M., FISCHER, P., HAMPTON, J. E. **Uncoupling primer and releaser responses to pheromone in honey bees.** *Naturwissenschaften* 94: 375–379. 2007.

GROZINGER, C. M., SHARABASH, N. M., WHITFIELD, C. W., ROBINSON, G. E. **Pheromone-mediated gene expression in the honey bee brain.** *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (Suppl. 2): 14519–14525. 2003.

GRUN, D., WANG, Y. L., LANGENBERGER, D., GUNSALUS, K. C., RAJEWSKY, N. **MicroRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets.** *PLoS Computational Biology*, 1, p. e13. 2005.

GUIDUGLI, K. R., NASCIMENTO, A.M., AMDAM, G.V., BARCHUK, A. R., OMHOLT, S., SIMÕES, Z. L. P., HARTFELDER, K. **Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect.** *FEBS Lett.*, 579, pp. 4961-4965. 2005.

GULLAN, P. J., CRANSTON, P. S. **The insects. An Outline of Entomology.** Chapman & Hall. New York. 1994

HARTFELDER, K., HEINZ R. **Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*.** *Journal of Comparative Physiology B* 160.6: 617-620. 1991

HAVUKAINEN, H., MÜNCH, D., BAUMANN, A., ZHONG, S., HALSKAU, Ø., KROGSGAARD, M., AMDAM, G. V. **Vitellogenin recognizes cell damage through membrane binding and shields living cells from reactive oxygen species.** J. Biol. Chem., 288, pp. 28369-28381. 2013.

HE L., THOMSON J. M., HEMANN M. T., HERNANDO-MONGE E., MU D., GOODSON S., POWERS S., CORDON-CARDO C., LOWE S.W., HANNON G.J., HAMMOND S. M. **A microRNA polycistron as a potential human oncogene.** Nature 435, 828–833. 2005

HEPPERLE, C., HARTFELDER, K. **Differentially expressed regulatory genes in honeybee caste development.** Naturwissenschaften 88(3), 113–116. 2001

HEYLEN K., GOBIN B., BILLEN J., HU T.T., ARCKENS L., HUYBRECHTS R. **Amfor expression in the honeybee brain: a trigger mechanism for nurseforager transition.** J. Insect Physiol. 54, 1400–1403. 2008.

HILL, R. J., BILLAS, I. M. L., BONNETON, F., GRAHAM, L. D., AND LAWRENCE, M. C. Ecdysone receptors: from the Ashburner model to structural biology. Annu. Rev. Entomol. 58, 251–271. 2013.

HORI, S., KANEKO, K., SAITO, T. H., TAKEUCHI, H., KUBO, T. **Expression of two microRNAs, ame-mir-276 and-1000, in the adult honeybee (*Apis mellifera*) brain.** Apidologie, 42(1), 89-102. 2011

HWANG, D. S., HAN, J., WON, E. J., KIM, D. H., JEONG, C. B., HWANG, U. K., ZHOU, B., LEE, J.-S. **BDE-47 causes developmental retardation with down-regulated expression profiles of ecdysteroid signaling pathway-involved nuclear receptor (NR) genes in the copepod *Tigriopus japonicus*.** Aquat. Toxicol., 177, pp. 285-294. 2016.

HYUN, S., LEE, J. H., JIN, H., NAM, J., NAMKOONG, B., LEE, G. **Conserved MicroRNA miR-8/miR-200 and its target USH/FOG2 control growth by regulating PI3K.** Cell, 139(6), 1096–1108. 2009.

K. STRAUSS, H. SCHARPENBERG, R.M. CREWE, F. GLAHN, H. FOTH, R.F.A. Moritz **The role of the queen mandibular gland pheromone in honeybees (*Apis mellifera*): honest signal or suppressive agent?** Behav. Ecol. Sociobiol. (2008)

KATO, Y., KOBAYASHI, K., ODA, S., TATARAZAKO, N., WATANABE, H., IGUCHI, T. **Cloning and characterization of the ecdysone receptor and ultraspiracle protein from the water flea *Daphnia magna*.** J. Endocrinol., 193, pp. 183-194. 2007

KAYUKAWA, T., MINAKUCHI, C., NAMIKI, T., TOGAWA, T., YOSHIYAMA, M., KAMIMURA, M., MITA, K., IMANISHI, S., KIUCHI, M., ISHIKAWA, Y. **Transcriptional regulation of juvenile hormonemediated induction of Krüppel homolog 1, a repressor of insect metamorphosis.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 109, pp. 11729-11734. 2012.

KILASO, M., REMNANT, E. J., CHAPMAN, N. C. **DNA methylation of Kr-h1 is involved in regulating ovary activation in worker honeybees (*Apis mellifera*).**

Insectes Soc 64:87–94. 2017.

KLEIN, A. M., VAISSIE'RE, B. E., CANE, J. H., STEFFAN-DEWENTER, I., CUNNINGHAM, S. A., KREMEN, C., TSCHARNTKE, T. **Importance of pollinators in changing landscapes for world crops.** Proc R Soc B 274:303–313. 2007.

KOCHER, S. D., GROZINGER, C. M. **Cooperation, conflict, and the evolution of queen pheromones.** J. Chem. Ecol. 37, 1263-1275. 2011

KOELLE, M. R., TALBOT, W. S., SEGRAVES, W. A., BENDER M. T., CHERBAS, P., HOGNESS, D. S. **The Drosophila EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily.** Cell. 1991;67:59–77.

KOENIGER, N.; KOENIGER, G. **Reproductive isolation among species of the genus Apis To cite this version.** Apidologie 2000.

KOYWIWATTRAKUL, P., & SITTIPRANEED, S. **Expression of vitellogenin and transferrin in activated ovaries of worker honeybees, Apis mellifera.** Biochemical genetics, 47(1-2), 19. 2009

KOYWIWATTRAKUL, P., THOMPSON, G. J., SITTHIPRANEED, S., OLDROYD, B. P., & MALESZKA, R. **Effects of carbon dioxide narcosis on ovary activation and gene expression in worker honeybees, Apis mellifera.** *Journal of Insect Science*, 5(1), 36. 2005

KREK A., GRÜN D., POY M. N., WOLF R., ROSENBERG L., EPSTEIN E. J., MACMENAMIN P., DA PIEDADE I., GUNSALUS K. C., STOFFEL M., RAJEWSKY N. **Combinatorial microRNA target predictions,** Nat. Genet. 37, 495–500. 2005

L. KELLER, P. NONACS. **The role of queen pheromones in social insects: queen control or queen signal?** Anim. Behav., 45 (1993), pp. 787-794

LEAMAN, D., CHEN, P. Y., FAK, J., YALCIN, A., PEARCE, M., UNNERSTALL, U., GAUL, U. **Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in Drosophila development.** Cell, 121(7), 1097-1108. 2005.

LEBLANC, G. A., MU, X., RIDER, C. V. **Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean Daphnia magna.** Environ. Health Perspect., 108, pp. 1133-1138. 2000

LEZZI, M., BERGMAN, T., HENRICH, V. C., VÖGTLI, M., FRÖMEL, C., GREBE, M., SPINDLER-BARTH, M. **Ligand-induced heterodimerization between the ligand binding domains of the Drosophila ecdysteroid receptor and ultraspiracle.** European journal of biochemistry, 269(13), 3237-3245. 2002.

LIM L. P., LAU N. C., GARRETT-ENGELE P., GRIMSON A., SCHELTER J. M., CASTLE J., BARTEL D. P., LINSLEY P. S., JOHNSON J. M. **Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs.** Nature 433, 769–773. 2005.

LIU, F., PENG, W., LI, Z., LI, W., LI, L., PAN, J. SU, S. **Next-generation small**

RNA sequencing for microRNAs profiling in *Apis mellifera*: comparison between nurses and foragers. *Insect molecular biology*, 21(3), 297-303. 2012

LUHUR, A., CHAWLA, G., SOKOL, N. S. **MicroRNAs as components of systemic signaling pathways in *Drosophila melanogaster*.** In *Current topics in developmental biology* (Vol. 105, pp. 97-123). Academic Press. 2013.

MALESZKA, R. **Beyond Royalactin and a master inducer explanation of phenotypic plasticity in honey bees.** *Commun Biol* 1:8. 2018

MALKA, O., SHNIEOR, S., HEFETZ, A., KATZAV-GOZANSKY, T. **Reversible royalty in worker honeybees (*Apis mellifera*) under the queen influence.** *Behav. Ecol. Sociobiol.* 61, 465–473. 2007.

MARTIN, D., WANG, S.-F., RAIKHEL, A. S. **The vitellogenin gene of the mosquito *Aedes aegypti* is a direct target of ecdysteroid receptor.** *Mol. Cell. Endocrinol.*, 173, pp. 75-86. 2001.

MENZEL, R., GEIGER, K., CHITTKA, L., JOERGES, J., KUNZE, J., MULLER, U. **The knowledge base of bee navigation.** *Journal of Experimental Biology*, Berlin, v.199, p. 141-146. 1996.

MICHENER, C. D. **The social behavior of the bees: a comparative study.** Cambridge: Harvard University Press. 1974

MICHENER, C. D. **The Bees of the World.** (2nd ed.), The John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA. 2007.

MINAKUCHI, C., ZHOU, X., RIDDIFORD, L. M. **Krüppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*.** *Mech. Dev.*, 125, pp. 91-105. 2008.

MU, X., RIDER, C. V., HWANG, G. S., HOY, H., LEBLANG, G. A. **Covert signal disruption: anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signaling pathways.** *Environ. Toxicol. Chem.*, 24, pp. 146-152. 2005.

MUNCH, D., KREIBICH, C. D., AMDAM, G. V. **Aging and its modulation in a long-lived worker caste of the honey bee.** *J Exp Biol.* 2013

NAKAGAWA, Y. V. C. **Henrich Arthropod nuclear receptors and their role in molting.** *FEBS J.*, 276. 2009.

Nakagawa, Y., Henrich, V. C. **Arthropod nuclear receptors and their role in molting.** *FEBS J.*, 276, pp. 6128-6157. 2009.

NELSON, C. M., IHLE, K. E. FONDRAK, M. K. PAGE JR., R. E. AMDAM, G. V. **The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization.** *PLoS Biol*, 5, Article e62, 10.1371/journal.pbio.0050062. 2007.

NIWA, R., NIWA, Y. S. **Enzymes for ecdysteroid biosynthesis: their biological functions in insects and beyond.** *Biosci Biotechnol Biochem.* 78:1283–92. 2014

ORLOVA, M., STARKEY, J., AMSALEM, E. **A small family business: synergistic and additive effects of the queen and the brood on worker reproduction in a primitively eusocial bee.** *Journal of Experimental Biology*, 223(3). 2020.

ORO, A. E., MCKEOWN, M., EVANS, R. M. **The *Drosophila* retinoid X receptor homolog ultraspiracle functions in both female reproduction and eye morphogenesis.** *Development*, 115, pp. 449-462. 1992.

PANKIW, T., PAGE, R. E. JR. **Effect of pheromones, hormones, and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.).** *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 189: 675–684. 2003.

PAUL, R. K., TAKEUCHI, H., KUBO, T. **Expression of two ecdysteroid-regulated genes, Broad-Complex and E75, in the brain and ovary of the honeybee (*Apis mellifera* L.).** *Zoological Science*, 23(12), 1085-1092. 2006.

PAUL, R. K., TAKEUCHI, H., MATSUO, Y., KUBO, T. **Gene expression of ecdysteroid-regulated gene E74 of the honeybee in ovary and brain.** *InsectMol. Biol.* 14, 9–15. 2005.

PINTO, L. Z., HARTFELDER, K., BITONDI, M. M. G., SIMÕES, Z. L. P. **Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development.** *J Insect Physiol* 48 : 783 -790. 2002.

PIRK, C. W., BOODHOO, C., HUMAN, H., & NICOLSON, S. W. **The importance of protein type and protein to carbohydrate ratio for survival and ovarian activation of caged honeybees (*Apis mellifera scutellata*).** *Apidologie* 41.1: 62-72. 2010

PLANELLO, R., MARTINEZ-GUITARTE, J. L., MORCILLO, G. **The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*.** *Chemosphere*, 71, pp. 1870-1876. 2008.

POTTS, S. G., IMPERATRIZ-FONSECA, V., NGO, H. T., AIZEN, M. A., BIESMEIJER, J. C., BREEZE, T. D., VANBERGEN, A. J. **Safeguarding pollinators and their values to human well-being.** *Nature*, 540. 2016.

PUTHUMANA, J., LEE, M. C., HAN, J., KIM, H. S., HWANG, D. S., LEE, J. S. **Ecdysone receptor (EcR) and ultraspiracle (USP) genes from the cyclopoid copepod *Paracyclopina nana*: Identification and expression in response to water accommodated fractions (WAFs).** *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 192, 7-15. 2017.

RACHINSKY, A., STRAMBI, C., STRAMBI, A., HARTFELDER, K. **Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last estágio honeybee larvae.** *Gen Comp Endocrinol*, 79:31-38. 1990

RANGEL, J., FISHER, A. **Factors affecting the reproductive health of honey bee (*Apis mellifera*) drones—A review.** *Apidologie*, 1-20. 2019.

RANGEL, J., FISHER, A. **Factors affecting the reproductive health of honey bee (*Apis mellifera*) drones—A review.** *Apidologie*, 1-20. 2019.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 906p. 2001

REMOLINA, S. C., HAFEZ, D. M., ROBINSON, G. E., HUGHES, K. A. **Senescence in the worker honey bee *Apis Mellifera*.** *J Insect Physiol.* 2007.

ROBINSON, G. E., BEN-SHAHAR, Y. **Social behavior and comparative genomics: new genes or new gene regulation?** *Genes Brain Behav* 1: 197–203. 2002.

ROBINSON, G. E., WINSTON, M. L., HUANG, Z., PANKIW, T. **Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers.** *J Insect Physiol* 44: 685–692. 1998.

RONAI, I., BARTON, D. A., OLDROYD, B. P., VERGOZ, V. **Regulation of oogenesis in honey bee workers via programmed cell death.** *Journal of insect Physiology*, 81, 36-41. 2015

RONAI, I., OLDROYD, B. P., VERGOZ, V. **Queen pheromone regulates programmed cell death in the honey bee worker ovary.** *Insect molecular biology*, 25(5), 646-652. 2016

S.D. KOCHER, C.M. **Grozinger Cooperation, conflict and the evolution of queen pheromones,** *J. Chem. Ecol.*, 37 (2011), pp. 1263-1275

SALMELA, H., AMDAM, G. V., FREITAK, D. **Transfer of immunity from mother to offspring is mediated via egg-yolk protein vitellogenin.** *PLoS Pathog.*, 11, p. e1005015. 2015.

SALMELA, H., SUNDSTRÖM, L. **Vitellogenin in inflammation and immunity in social insects.** *Inflamm. Cell Signal*, 4, p. e1506. 2017

SCHLUNS, H., MORITZ, R. F. A., NEUMANN, P., KRYGER, P., KOENIGER, G. **Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens.** *Anim. Behav.* 2005.

SCHUH, R., AICHER, W., GAUL, U. **A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Krüppel, a *Drosophila* segmentation gene.** *Cell* 47:1025–1032. 1986.

SEEHUUS, S. C., KREKLING, T., AMDAM, G. V. **Cellular senescence in honey bee brain is largely independent of chronological age.** *Experimental Gerontology*. 2006

SEMPERE, L. F., SOKOL, N. S., DUBROVSKY, E. B., BERGER, E. M., AMBROS, V. **Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity.** *Developmental biology*, 259(1), 9-18. 2003.

SHI, Y. Y., ZHENG, H. J., PAN, Q. Z., WANG, Z. L., & ZENG, Z. J.

Differentially expressed microRNAs between queen and worker larvae of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 46(1), 35-45. 2015

SHUEL, R. W., DIXON, S. E. **The early establishment of dimorphism in the female honeybee, *Apis mellifera*.** *Insectes Soc.* 7, 265–282. 1960.

SINGH, N. K., PAKKIANATHAN, B. C., KUMAR, M., PRASAD, T., KANNAN, M., KÖNIG, S., KRISHNAN, M. **Vitellogenin from the silkworm, *Bombyx mori*: an effective anti-bacterial agent.** *PLoS One*, 8, p. e73005. 2013.

SNODGRASS, R. E. *Anatomy of the honeybee.* Cornell University Press, London, UK. 1956.

SOKOL, N. S., AMBROS, V. **Mesodermally expressed *Drosophila* microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth.** *Genes & Development*, 19(19), 2343–2354. 2005.

SOKOL, N. S., XU, P., JAN, Y. N., AMBROS, V. ***Drosophila* let-7 microRNA is required for remodeling of the neuromusculature during metamorphosis.** *Genes & development*, 22(12), 1591-1596. 2008.

Speth, M. T., Kreibich, C. D., Amdam, G. V., Munch, D. **Aging- and task-related resilience decline is linked to food responsiveness in highly social honey bees.** *Exp Gerontol.* 2015

SUN, C., ZHANG, S. **Immune-relevant and antioxidant activities of vitellogenin and yolk proteins in fish.** *Nutrients*, 7, pp. 8818-8829. 2015.

SUN, G., ZHU, J., LI, C., TU, Z., RAIKHEL, A. S. **Two isoforms of the early E74 gene, an Ets transcription factor homologue, are implicated in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito, *Aedes aegypti*.** *Mol. Cell. Endocrinol.* 190, 147–157. 2002

T. KOZLOVA AND C. S. THUMMEL. **Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*.** *Trends Endocrinol Metab* 11:276–280. 2000.

TELEMAN, A. A., MAITRA, S., COHEN, S. M. ***Drosophila* lacking microRNA miR-278 are defective in energy homeostasis.** *Genes & Development*, 20(4), 417–422. 2006.

THOMPSON, G. J., YOCKEY, H., LIM, J., & OLDROYD, B. P. **Experimental manipulation of ovary activation and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers: testing hypotheses of reproductive regulation.** *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 307(10), 600-610. 2007

TOTH, A. L., VARALA, K., HENSHAW, M. T., RODRIGUEZ-ZAS, S. L., HUDSON, M. E., ROBINSON, G. E. **Brain transcriptomic analysis in paper wasps identifies genes associated with behaviour across social insect lineages.** *Proc. R. Soc. B* 277, 2139-2148. 2010

TSUTSUI, K., HARAGUCHI, S. **Breakthrough in neuroendocrinology by discovering novel neuropeptides and neurosteroids: 2. Discovery of neurosteroids and pineal neurosteroids.** *Gen Comp Endocrinol.* 205:11–22. 2014

TUFAIL, M., NAGABA, Y., ELGENDY, A. M., TAKEDA, M. **Regulation of vitellogenin genes in insects.** *Entomol. Sci.*, 17, pp. 269-282. 2014.

TUFAIL, M., TAKEDA, M. **Molecular characteristics of insect vitellogenins.** *J. Insect Physiol.*, 54, pp. 1447-1458. 2008.

V. DIETEMANN, C. PEETERS, B. HÖLLDOBLER. **Role of the queen in regulating reproduction in the bulldog ant *Myrmecia gulosa*: control or signalling?** *Anim. Behav.*, 69 (2005), pp. 777-784.

VARGHESE, J., COHEN, S. M. **microRNA miR-14 acts to modulate a positive autoregulatory loop controlling steroid hormone signaling in *Drosophila*.** *Genes & Development*, 21(18), 2277–2282. 2007

VARGHESE, J., LIM, S. F., COHEN, S. M. ***Drosophila* miR-14 regulates insulin production and metabolism through its target, sugarbabe.** *Genes & Development*, 24(24), 2748–2753. 2010.

VELARDE, E., HAQUE, R., IUVONE, P. M., AZPELETA, C., ALONSO-GÓMEZ, A. L., DELGADO, M. J. **Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of period and cryptochrome transcripts in retina, liver, and gut.** *Journal of biological rhythms*, 24(2), 104-113. 2009.

VELARDE, R. A., ROBINSON, G. E., & FAHRBACH, S. E. **Coordinated responses to developmental hormones in the Kenyon cells of the adult worker honey bee brain (*Apis mellifera* L.).** *Journal of insect physiology*, 55(1), 59-69. 2009.

VELARDE, R. A., ROBINSON, G. E., FAHRBACH, S. E. **Nuclear receptors of the honey bee: annotation and expression in the adult brain.** *Insect Molecular Biology*, 15, pp. 583-595. 2006.

VELARDE, R. A., ROBINSON, G. E., FAHRBACH, S. E. **Coordinated responses to developmental hormones in the Kenyon cells of the adult worker honey bee brain (*Apis mellifera* L.).** *Journal of insect physiology*, 55(1), 59-69. 2009

VELTHUIS, H. H. W., VAN DOORN, A. **A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination.** *Apidologie* 37:421–451. 2006

WANG, Y., AMDAM, G. V., DANIELS, B. C., & PAGE JR, R. E. **Tyramine and its receptor TYR1 linked behavior QTL to reproductive physiology in honey bee workers (*Apis mellifera*).** *Journal of insect physiology*, 126, 104093. 2020

WEAVER, N. **Effects of larval age on dimorphic differentiation of the female honeybee.** *Ann. Entomol. Soc. Am.* 50, 283–294. 1957.

WHITFIELD, C. W., CZIKO, A. M., ROBINSON, G. E. **Gene expression**

profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science* 302: 296–299. 2003.

WINSTON, M. L. **The biology of the honeybee.** Cambridge, MA: Harvard University Press, 281p. 1991.

WOYKE, J. **Natural and Artificial Insemination of Queen Honeybees.** *Bee World* 1962, 43, 21–25.

WOYKE, J. **Natural and Artificial Insemination of Queen Honeybees.** *Bee World* 1962, 43, 21–25.

XU, J., TAN, A., PALLI, S. R. **The function of nuclear receptors in regulation of female reproduction and embryogenesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*.** *J. Insect Physiol.*, 56, pp. 1471-1480. 2010.

YAMAZAKI Y., SHIRAIA K., PAUL R. K., FUJIYUKI T., WAKAMOTO A., TAKEUCHI H., KUBO T. **Differential expression of HR38 in the mushroom bodies of the honeybee brain depends on the caste and division of labor.** *FEBS Lett.* 580, 2667–2670. 2006.

YANG, C., LIN, Y., LIU, H., SHEN, G. **The broad complex isoform 2 (BrC-Z2) transcriptional factor plays a critical role in vitellogenin transcription in the silkworm *Bombyx mori*.** *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 2674–2684. 2014.

YAO, T. P., FORMAN, B. M., JIANG, Z., CHERBAS, L., CHEN, J. D., CHERBAS P. **Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes.** *Nature.*;366:476–9. 1993.

YAO, T., SEGRAVES, W. A., ORO, A. E., MCKEOWN, M., EVANS, R. M. ***Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation.** *Cell.* 71:63–72. 1992.

ZHEN, C., YANG, H., LUO, S., HUANG, J., & WU, J. **Broad-complex Z3 contributes to the ecdysone-mediated transcriptional regulation of the vitellogenin gene in *Bombus lantschouensis*.** *PloS one*, 13(11), e0207275. 2018.

ZOU, E., FINGERMAN, M. **Effect of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea, *Daphnia magna*.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 38, pp. 281-285. 1997.