

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
GIOVANA CRAVEIRO

“Análise funcional do 10-hidroxi-2-decenóico-ácido (10HDA), inibidor de histona desacetilases e principal ácido orgânico da geleia real, na diferenciação das castas de *Apis mellifera L.*”

"Functional analysis of 10-hydroxy-2-decenoic acid (10HDA), inhibitor of histone deacetylases and main organic acid in royal jelly, in the differentiation of *Apis mellifera L.* castes"

RIBEIRÃO PRETO – SP

2021

GIOVANA CRAVEIRO

“Análise funcional do 10-hidroxi-2-decenóico-ácido (10HDA), inibidor de histona desacetilases e principal ácido orgânico da geleia real, na diferenciação das castas de *Apis mellifera L.*”

"Functional analysis of 10-hydroxy-2-decenoic acid (10HDA), inhibitor of histone deacetylases and main organic acid in royal jelly, in the differentiation of *Apis mellifera L.* castes"

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder

RIBEIRÃO PRETO – SP

2021

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.

Craveiro, Giovana

Análise funcional do 10-hydroxi-2-decenóico-ácido (10HDA), inibidor de histona desacetilases e principal ácido orgânico da geleia real, na diferenciação das castas de *Apis mellifera L.*

Functional analysis of 10-hydroxy-2-decenoic acid (10HDA), inhibitor of histone deacetylases and main organic acid in royal jelly, in the differentiation of *Apis mellifera L.* castes.

Aluna: Giovana Craveiro

Orientador: Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder

Ribeirão Preto, 2021.

P 82;

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Genética – USP/ FMRP/ Departamento de Genética.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, HDACs, castas, desenvolvimento, epigenética.

Keywords: *Apis mellifera*, HDACs, castes, development, epigenetics.

Nome: Craveiro. Giovana

Título: Análise funcional do 10-hidroxi-2-decenóico-ácido (10HDA), inibidor de histona desacetilases e principal ácido orgânico da geleia real, na diferenciação das castas de *Apis mellifera L.*

Title: Functional analysis of 10-hydroxy-2-decenoic acid (10HDA), inhibitor of histone deacetylases and main organic acid in royal jelly, in the differentiation of *Apis mellifera L.* castes

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Genética – USP/ FMRP/ Departamento de Genética.

Orientador: Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder

Aprovado em:

Banca Examinadora

Presidente: Prof. Dr. Klaus H. Hartfelder

Instituição: FMRP - USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedico esse trabalho aos meus pais, pois sem eles nada disso seria possível. Obrigada por todo o amor e carinho que demostram por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Klaus Hartfelder por toda ajuda, orientação tempo disponibilizado e conhecimento compartilhado, para que este trabalho fosse realizado.

Um agradecimento ao Dr. Carlos Antônio Mendes Cardoso Júnior que ajudou no andamento de todo o projeto e na concretização de diversos experimentos e também pelos ensinamentos de protocolos experimentais.

Aos meus colegas de laboratório Carolina, Denyse, Douglas, Marina, Mário, Matheus e Larissa por tornar este um ambiente descontraído, por toda amizade, apoio, e aprendizado proporcionado. Em especial à Denyse e Marina por estarem ao meu lado dentro e fora do laboratório e pela amizade construída entre nós.

Ao técnico Anderson Roberto de Souza por toda ajuda e por toda a convivência no laboratório, tornando este um ambiente agradável e descontraído.

Ao técnico do Apiário Experimental do Departamento de Genética Luiz Aguiar, que foi de suma importância no processo de coleta das abelhas e também por toda ajuda e amizade.

A técnica Vera Lucia Figueiredo e a todos alunos e docentes do Bloca A do Departamento de Genética pela disponibilização de locais para coleta e criação de larvas e também pelo apoio e auxílio em experimentos.

A todos os meus amigos que mesmo de longe me deram força e alegraram meus dias. Em especial agradeço à Priscila C. Corrêa, Franciene R. Oliveira, Amanda R. A. Barboza, Natália Scaraboto por toda a amizade, todo o carinho que vocês demostram por mim e por todas as risadas e momentos compartilhados, que não foram poucos.

As minhas *roommates* Bruna Lima Ferreira e Yasmine Luise Visin, por estarem sempre ao meu lado como uma segunda família, me incentivando, me dando forças e me fazendo dar muitas risadas.

A todos os amigos que fiz fora da sala de aula, nos corredores do prédio central e pela USP, em especial as minhas queridas Camila, Denyse, Lays, Luísa, Mariana, Marina, Roberta e Vanessa. Obrigada por toda amizade risadas e momentos compartilhados.

Ao meu namorado Mário S. Cervoni, por todos os momentos maravilhosos e descontraídos que passo ao seu lado, por toda a força, apoio e ajuda que recebo de você. Obrigada por sempre estar ao meu lado.

Ao meu sobrinho Lucas por mesmo de longe alegrar meus dias e fazer deles dias mais felizes.

Aos meus pais, Maria Inês e Agenor, à minha irmã Aline por tudo que vocês fizeram e fazem por mim e por todos os esforços realizados para que eu pudesse chegar onde estou. Obrigada por serem a minha base, me aconselhando e me incentivando. Sem vocês nada disso seria possível.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP (processo: 2018/11271-9), por todo o suporte financeiro.

A todos aqueles que por esquecimento não citei aqui, mas que ajudaram de alguma forma nesse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

INDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE ABREVIACOES	7
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 <i>Apis mellifera</i> – modelo biológico abordado	9
1.2 <i>Apis mellifera</i> – um himenptero altamente eussocial	11
1.3 Diferenças entre rainhas e operárias	13
1.4 Epigenética – acetilação de histonas	16
1.5 Determinação de castas em abelhas melíferas – efeitos epigenéticos	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3. HIPÓTESE.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Material Biológico	24
4.2 Teste de doses dos inibidores de HDACs 10HDA e butirato de sódio (NaB) em experimento de criação <i>in vitro</i>	24
4.3 Teste de doses <i>in vitro</i> por 24h.....	25
4.4 Cultura de tecido do ovário	25
4.5 Perfil de expressão de HDACs e <i>dnmt3</i> ao longo do desenvolvimento larval	26
4.6 Extração do RNA total e síntese do cDNA	26
4.7 Quantificação por RT-qPCR dos transcritos de genes codificadores de HDACs e genes de interesse	28
4.8 Extração de proteínas nucleares	30
4.9 Incubação de extratos nucleicos com geleia real e geleia de operária.....	31
4.10 Quantificação proteica por método de Bradford	31
4.11 Análise da atividade enzimática	32
4.12 Análises estatísticas	34
4.13 Anotação gênica	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36

5.1	Teste piloto para uso de doses de 10HDA e butirato de sódio em experimentos com criação <i>in vitro</i> de larvas	36
5.2	Perfil de expressão de genes codificadores de HDACs e do Dnmt 3 em larvas de rainha e operárias criadas nas colônias	40
5.3	Teste de doses de 10HDA oferecido a larvas criadas <i>in vitro</i> por 24 h.....	46
5.4	Cultura de tecidos do Ovário	50
5.5	Análise da atividade enzimática	55
5.6	Anotação dos genes codificadores de HDACs em <i>Apis mellifera</i>	59
6.	CONCLUSÃO	62
7.	REFERÊNCIAS	64

Análise funcional do 10-hidroxi-2-decenóico-ácido (10HDA), inibidor de histona desacetilases e principal ácido orgânico da geleia real, na diferenciação das castas de *Apis mellifera* L.

RESUMO

As abelhas da espécie *Apis mellifera* se caracterizam por uma organização social muito avançada, em que a rainha e as operárias são morfologicamente distintas e desempenham funções específicas na colmeia. A rainha é responsável pela reprodução, enquanto as operárias realizam todas as tarefas de manutenção da colmeia. Apesar das grandes diferenças morfológicas e funcionais, as rainhas e operárias não diferem geneticamente, mas representam um polifenismo. Este é desencadeado principalmente pela alimentação diferencial oferecida às larvas. A geleia real, produzida pelas abelhas nutridoras e oferecida em grande quantidade às larvas de rainha, contém compostos que são capazes de regular o desenvolvimento das larvas e, inclusive, do seu estado epigenético. Uma das moléculas da dieta das larvas é o ácido 10 hidroxi-2-decenóico (10HDA), que está presente em quantidades elevadas na geleia real. O 10HDA foi identificado como um inibidor da atividade de enzimas do tipo histona desacetilases (HDAC) em células de mamíferos, e na base deste achado procuramos desvendar o mecanismo de ação do 10HDA nas próprias abelhas. Primeiramente anotamos os genes codificadores das HDACs do genoma de *A. mellifera* e analisamos os seus perfis de expressão gênica. Os resultados obtidos mostram que nos níveis de transcritos destes genes existe uma diferença entre rainhas e operárias ao longo do desenvolvimento, principalmente no final da fase de alimentação, fase L5F2, para a HDAC4 e em L5S1 para HDAC6. Em seguida realizamos um experimento de criação *in vitro* das larvas por 24 h com 10HDA

adicionado ao alimento, e pudemos notar que a concentração mais alta utilizada foi capaz de afetar os níveis de transcritos da HDAC4, que também é a histona desacetilases mais transcrita em abelhas. Este tratamento também afetou os níveis de expressão da DNA metil transferase Dnmt3. Além disso, pudemos notar que o tratamento foi capaz de alterar os níveis do gene *Krüppel-homolog 1 (Kr-h1)*, gene de resposta imediata ao hormônio juvenil (HJ), que tem um papel importante no desenvolvimento das castas, pois promove a diferenciação dos ovários da rainha. Com relação a análise de expressão gênica feita com ovários dissecadas de operárias larvais e incubados *in vitro* na presença de 10HDA pudemos notar que alguns genes chave na diferenciação e regulação ovariana, tais como *Tudor-SN*, *Incov2* e *ILP-1* apresentaram níveis de expressão similares aos de rainhas. Outros genes de interesse como *Dnmt3* e *Egfr* apresentaram um aumento na expressão. Por fim, com relação à análise da atividade enzimática notamos que nas duas fases analisadas não houve diferença na expressão genica entre rainhas e operárias naturais. Além disso, o 10HDA não causou alteração na atividade enzimática como esperado e a incubação de geleia real e geleia de operária com o extrato proteico também não produziu um efeito estatisticamente significativo sobre a atividade enzimática. Podemos concluir que a quantidade diferente de 10HDA ingerida por rainhas e operárias não parece afetar a atividade enzimática em si, mas é capaz de afetar a expressão gênica de genes importantes para o desenvolvimento e para a definição características casta-específicas podendo altera-las dessa forma.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, HDACs, castas, desenvolvimento, epigenética.

Functional analysis of 10-hydroxy-2-decenoic acid (10HDA), inhibitor of histone deacetylases and main organic acid in royal jelly, in the differentiation of *Apis mellifera* L. castes.

ABSTRACT

Bees of the species *Apis mellifera* are characterized by a highly advanced social organization, in which the queen and the workers are morphologically distinct and perform specific functions in the hive. The queen is responsible for reproduction, while the workers carry out all the maintenance tasks of the hive. Despite the great morphological and functional differences, queens and workers do not differ genetically, but represent a polyphenism. This is triggered mainly by the differential feeding of the larvae. Royal jelly, produced by nurse bees and offered in large quantities to queen larvae, contains compounds that are thought to regulate the development of the larvae, including their epigenetic state. One of these molecules is 10-hydroxy-2-decenoic acid (10HDA), which is present in higher quantities in royal jelly than in worker jelly. 10HDA has been identified as an inhibitor of histone deacetylase (HDAC) enzyme activity in mammalian cells, and based on this result our aim here was to discover its actual mode of action in the honey bee. We re-annotated the genes that encode the HDACs in the honey bee genome and we analyzed their expression pattern in the larvae. The results showed that there are differences between queens and workers with respect to expression levels, mainly in the older larvae, in the L5F2 stage for *HDAC4*, and in L5S1 for *HDAC6*. Subsequently we performed an experiment where larvae were reared for 24 h *in vitro* on a diet enriched in 10HDA, and we found that the highest concentration used was able to affect the *HDAC4* transcript levels, which also is the histone deacetylase that is most

highly expressed in bees. We also found that this treatment affected the expression of the *dnmt3* gene, which encodes a DNA methyl transferase. In addition, we could see that the treatment was able to affect the expression levels of *Krüppel-homolog 1 (Kr-h1)*, an immediate response gene to juvenile hormone (HJ), which plays an important role in caste development, as it promotes the differentiation of the queen ovary phenotype. Regarding the gene expression analyses made with ovarian tissue treated with 10HDA *in vitro*, we found that some key genes in ovarian differentiation, such as *Tudor-SN*, *Incov2* and *ILP-1*, had expression levels similar to those seen in queens. Other genes of interest, such as *dnmt3* and *Egfr*, showed an increase in expression in this treatment. Finally, in experiments where larvae received a 10HDA-enriched diet, or where dissected ovaries or nuclear extracts were exposed to 10HDA *in vitro*, we found that 10HDA did not affect the HDAC enzymatic activity. This was contrary to what we had expected from our initial hypotheses and the expression pattern of the HDAC genes, but it is consistent with the results of the analysis of respective enzyme activity in queen and worker larvae, where we also could not detect a difference. From this we conclude that the different quantities of 10HDA fed by the nurse bees to the queen and worker larvae do not seem to affect the HDACs enzymatic activity, despite the differences seen in the expression levels of the HDAC genes. This indicates that the primary function of 10HDA provided to the larvae in their diets may not be the inhibition of the histone deacetylases, and as such, would not be likely to have a major effect on the larval epigenetic states.

Keywords: *Apis mellifera*, HDACs, castes, desdevelopment, epigenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Experimento 4 (Tabela 2). Peso e tempo de desenvolvimento de operárias submetidas ao tratamento com 1 mM ou 10 mM de NaB.

Figura 2. Experimento 5 (Tabela 2). Peso e tempo de desenvolvimento de operárias submetidas ao tratamento com 1mM ou 10mM de NaB.

Figura 3. Expressão relativa dos genes codificadores de HDACs e *dnmt3* em larvas de rainhas e operárias ao longo das fases do desenvolvimento larval.

Figura 4. Nível de expressão de cada HDAC ao longo do desenvolvimento.

Figura 5. Expressão relativa de HDACs e *dnmt3* após tratamento das larvas por 24 h com diferentes concentrações de NaB e 10HDA.

Figura 6. Expressão relativa dos genes *Kr-h1* e *mfe* após tratamento das larvas por 24 h com 10 mM NaB ou 15 mM 10HDA na dieta.

Figura 7. Expressão relativa dos genes importantes na diferenciação e desenvolvimento ovariano em *Apis mellifera* após tratamento do ovário com 10HDA

Figura 8. Análise da atividade enzimática de HDACs entre rainhas e operárias naturais.

Figura 9. Análise da atividade enzimática de HDACs entre os grupos controle (controle alimento e álcool) e os grupos tratados (5mM e 15mM de 10HDA)

Figura 10. Análise da atividade enzimática de HDACs entre amostras de extrato enzimático incubados com tampão (CTRL), geleia real (RJ) e geleia de operária (WJ).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados no ensaio de RT-qPCR.

Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência por experimento com N inicial variado de 80 a 100 larvas (20 a 24 larvas por grupo) em relação ao número total de indivíduos transferidos para as placas de cultura.

Tabela 3. Anotação dos genes codificadores de HDACs de *Apis mellifera* e comparação com os respectivos ortólogos em *Drosophila melanogaster* e *Tribolium castaneu* referente ao número de aminoácidos (aa) e número de éxons.

LISTA DE ABREVIACOES

10HDA	Ácido 10 hidroxí-2-decenóico
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de soro bovina
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dnmt3	DNA metiltransferase 3
DPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>Egfr</i>	Receptor de fator de crescimento epidermal
<i>FoxO</i>	<i>Forkhead box protein O</i>
HDAC 1	Histona desacetilases 1
HDAC 3	Histona desacetilases 3
HDAC 4	Histona desacetilases 4
HDAC 6	Histona desacetilases 6
HJ	Hormônio juvenil
<i>ILP-1</i>	Insulina-like peptídeo 1
<i>ILP-2</i>	Insulina-like peptídeo 2
IIS	Via de Insulina
<i>Kr-h1</i>	Krüppel-homolog 1
L1	Estágio larval 1
L2	Estágio larval 2

L3	Estágio larval 3
L4	Estágio larval 4
L5F1	Estágio larval 5 – alimentação 1
L5F2	Estágio larval 5 – alimentação 2
L5F3	Estágio larval 5 – alimentação 3
L5S1	Estágio larval 5 – Confexão de casulo1
L5S2	Estágio larval 5 – Confexão de casulo 2
L5S3	Estágio larval 5 – Confexão de casulo 3
<i>Mfe</i>	Metil farnesoato epoxidase
N	Número amostral
NaB	Butirato de sódio
NE1	10X Tampão de pré extração
NE2	Tampão de extração
PBS	Tampão fosfato salino
PIC	1000 X Coquetel inibidor de protease
QTL	Quantitative Trait Loci
RNA	Ácido ribonucleico
RpL32	Proteína ribossomal 32
RT-qPCR	PCR quantitativo de transcrição reversa (reação em cadeia da polimerase)
SAHA	Ácido hidroxamico de suberoilanilida
<i>TOR</i>	Target of rapamycin
Vg	Vitelogenina
UR	Umidade Relativa

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Apis mellifera* – modelo biológico abordado

Todo estudo realizado e todo conhecimento adquirido a partir desse estudo tem por base um modelo biológico que foi utilizado para explicar a hipótese proposta. Os modelos de um estudo variam desde microrganismos mais simples, vírus, procariotos, até organismos mais complexos, com diversos tecidos e órgãos, e a escolha desse dependerá da pergunta e da hipótese que se tem, além de outros fatores como a área que o estudo contempla.

Em diversas áreas da Biologia os insetos são utilizados como modelo para o entendimento de vias metabólicas, mecanismos genéticos, doenças e principalmente para a compreensão do comportamento. Um organismo modelo amplamente utilizado, principalmente para a compreensão da genética e hereditariedade, é a mosca de frutas *Drosophila melanogaster*. Este díptero vem sendo utilizado como modelo de estudo para diversas áreas da Biologia, inclusive em estudos que avaliam vias genéticas ligadas ao envelhecimento e amplos *screens* genéticos (Guarente e Kenyon, 2000; Johnston, 2002). Além disso, apresenta também grande importância na área de ecologia e, mais recentemente na área da saúde, como modelo para entendimento de diversas doenças, inclusive de neuronais, tais como as doenças de Alzheimer e de Parkinson (Chintapalli, 2007; Jeibmann e Paulus, 2009). Esse modelo apresenta muitas vantagens tais como um rápido ciclo de gerações, fácil manuseio e, especialmente, a disponibilidade de grande quantidade de recursos genéticos por meio de bancos de estoques de mutantes.

Apesar de sua ampla utilização *Drosophila*. não é considerada um bom modelo para estudos relacionados a genética e epigenética do comportamento (Yan et al., 2014),

pela ausência de enzimas responsáveis pela metilação do DNA (Raddatz et al., 2013). Para o estudo dessa área especificamente, um dos insetos mais adequados, e que foi utilizado nesse trabalho é a abelha da espécie *Apis mellifera* L., um inseto pertencente ao gênero *Apis*, ordem Hymenoptera, que inclui a maioria das espécies de insetos sociais. Os insetos dessa ordem são muito bem-sucedidos ecologicamente, e, especialmente as abelhas, possuem também uma grande importância econômica e ecológica (Page Jr e Robinson, 1991) por seu papel no processo de polinização de inúmeras espécies de plantas.

A. mellifera é uma das 9-11 espécies do gênero *Apis* [esse número varia de acordo com o taxonomista] existente no mundo, e é a espécie que apresenta a distribuição mais ampla pelo globo (Free, 1980). Essas abelhas são amplamente utilizadas como modelo para estudos ecológicos, comportamentais, fisiológicos e de desenvolvimento.

Uma das características que mais chama a atenção para esta espécie é a sua organização social, classificada como altamente eussocial, caracterizada pela presença de castas morfológicamente distintas do sexo feminino, as operárias e rainhas, além dos zangões que representam o sexo masculino. O alto grau de organização social implica na divisão de trabalho, que inclui, como elemento chave, a divisão das tarefas e da reprodução na colônia, onde a rainha possui o quase monopólio de reprodução, enquanto as operárias, como indivíduos facultativamente estéreis, cuidam da prole. Além dessa enorme diferença na capacidade reprodutiva, as rainhas e operárias também diferem em termos da sua longevidade, sendo que a vida adulta de uma rainha é até 10-20 vezes maior que a de uma operária. Dessa forma, a *A. mellifera* se apresenta como modelo interessante para estudos de mecanismos genéticos e epigenéticos que propiciam tamanhas diferenças

morfológicas, fisiológicas e comportamentais em organismos genotipicamente iguais, já que um ovo diploide pode dar origem tanto a uma rainha quanto a uma operária. Além disso, essa espécie é um bom modelo para estudos epigenéticos, uma vez possui codificado em seu genoma um conjunto completo de enzimas muito importantes no processo de regulação epigenética, tais como as DNA metiltransferases, histonas acetil transferases e histonas desacetilases (Yan et al., 2014).

Os indivíduos utilizados neste estudo são larvas de abelhas *A. mellifera* denominadas de africanizadas, originadas da hibridação que ocorreu no Brasil em 1956 pela introdução de rainhas de uma subespécie africana (*A. mellifera adansonii*) com abelhas melíferas de haplótipos ibéricos (*A. mellifera ibérica*) e italianas (*A. mellifera ligustica*) estabelecidas no Brasil nos séculos 17 a 19 trazidas da Europa, lembrando que não existiram espécies endêmicas do gênero *Apis* no Novo Mundo. As abelhas Africanizadas são hoje as principais encontradas na América Latina desde o Uruguai até México e também no Sul dos Estados Unidos.

1.2 *Apis mellifera* – um himenóptero altamente eussocial

Em uma colônia de *Apis mellifera* a fina divisão de trabalho se dá entre as duas castas de fêmeas, geradas a partir de ovos fertilizados, a rainha e as operárias, e o macho, organismo haploide originado de ovos não fertilizados, denominado zangão no gênero *Apis*. As operárias são organismos facultativamente estéreis e responsáveis por realizar todo o trabalho de manutenção da colmeia, que incluem tarefas como construção de favos, alimentação da cria e da rainha, guarda da colmeia, entre outras. Essas funções desempenhadas pelas operárias na colônia são divididas de acordo com a sua idade, em

um processo chamado de polietismo etário, ou maturação comportamental (Winston, 1987; Page Jr e Robinson, 1991). Quanto à rainha e aos zangões, esses são responsáveis exclusivamente pela reprodução. Uma rainha jovem, não fecundada, acasala com diversos zangões em um evento chamado voo nupcial. Neste, a rainha voa para um local de agregação de zangões e rapidamente acasala sequencialmente com mais de dez destes (Koeniger *et al.*, 1979; Schluns *et al.*, 2005). Após este voo nupcial a rainha retorna à colmeia e começa a produzir ovos, principalmente ovos fertilizados que dão origem às operárias (Winston, 1987). Nessa fase, ela pode botar até 2000 ovos por dia. Ela não irá se acasalar mais, e também não saíra mais da colmeia, exceto na divisão da colônia por enxameagem, que é o processo da reprodução social (Winston, 1987).

Um aspecto importante da divisão de trabalho em himenópteros eussociais, é a presença de sobreposição de gerações nas colônias (Wilson, 1971), pois após a fundação da colônia, a rainha, organismo geralmente único na colônia, se tornou a mãe de todas as operárias, e gerações sequencias de operárias cuidam da prole dessa única rainha e da manutenção da colônia em geral. As operárias representam o maior número de indivíduos em uma colmeia, chegando tipicamente a 20-50 mil operárias em colônias de *A. mellifera*, enquanto que os zangões variam de dezenas a centenas de indivíduos dependendo da estação do ano.

Portanto, em uma colônia de *A. mellifera* existem basicamente dois modos de divisão de trabalho, aquela que ocorre dentro da casta de operárias, dependente da idade, o polietismo etário e aquele referente à reprodução, que ocorre entre as duas castas femininas, rainha e operárias, que foram alimentadas diferencialmente na fase larval e, conseqüentemente divergiram em sua morfologia e fisiologia e (Johnson, 2009).

1.3 Diferenças entre rainhas e operárias

Os dois fenótipos morfológicamente e funcionalmente tão divergentes do sexo feminino não são genotipicamente distintos, pois um ovo fertilizado (diploide) tem o potencial de gerar ambos os fenótipos, essa diferenciação irá depender do regime nutricional ao qual a larva será exposta durante o seu desenvolvimento. A larva de rainha recebe, durante toda a fase larval de 5 instares, grandes quantidades de geleia real, uma secreção produzida pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares das operárias nutridoras (Rembold, 1965; Drapeau et al., 2006). As operárias, por sua vez, recebem inicialmente, uma secreção glandular similar, porém menos rica em açúcares, chamada de geleia de operária, e posteriormente, a partir 4º instar larval, uma mistura desta secreção glandular com mel e pólen (Haydak, 1970). Essa diferença na alimentação leva à expressão das características morfológicas, comportamentais e fisiológicas entre os indivíduos adultos dessas duas castas, por meio da ativação diferencial de vias de sensoriamento e sinalização do estado nutricional e do sistema endócrino, principalmente hormônio juvenil (HJ), primordial no processo de regulação da metamorfose e reprodução em insetos (Jindra et al., 2013).

Na via de ação do HJ existem vários genes importantes, tanto relacionados a sua produção quanto à resposta biológica no organismo. Damos destaque a dois genes, o *Krüppel-homolog1 (kr-h1)*, que é o gene de resposta imediata ao HJ (Belles & Santos, 2014; Jindra et al., 2013) e o gene *mfe*, codificador da enzima farnesoato epoxidase, que está envolvido na etapa final da produção de HJ em abelhas (Rachinsky e Hartfelder 1990, 1991). Alterações nos níveis desse hormônio na circulação irão desencadear um processo de diferenciação entre as duas castas.

As rainhas, alimentadas com geleia real, apresentarão um aumento nos níveis de HJ (Rachinsky e Hartfelder 1991), que irão especificamente permitir o desenvolvimento pleno do ovário nas larvas rainhas. Já nas larvas operárias, que recebem outra dieta, os níveis de HJ são mais baixos, e estes níveis baixos não conseguem impedir a morte celular programada que destrói mais que 90% dos ovaríolos, que são as unidades seriais que compõem os ovários dos insetos (Schmidt Capella e Hartfelder, 1998; Leimar et al., 2012).

Entre os diversos genes responsáveis pela diferenciação ovariana entre rainhas e operárias encontra-se o gene *Tudor-SN* codificador de uma proteína que é clivada pela caspase 3 durante o processo de apoptose e que está diretamente relacionado com a esterilidade em *Drosophila melanogaster* (Sundström et al., 2009). Em abelhas melíferas a proteína TUDO-SN apresenta uma interação direta com *lncov1*, um RNA longo não codificador, que tem seu pico de expressão exatamente durante o processo de apoptose ovariana em larvas operárias (Humann et al., 2013). *lncov1* se encontra no centro de um QTL previamente identificado como responsável pela variação no número de ovaríolos em operárias (Linksvayer et al., 2009).

Enquanto o HJ e os genes supracitados estão diretamente ligados ao estabelecimento das diferenças no sistema reprodutivo entre as duas castas, considera-se que vias de sensoriamento de nutrientes podem estar envolvidos na diferença do seu tamanho e de outras características morfológicas das abelhas melíferas (Hartfelder et al., 2015). A via de sinalização de insulina (IIS), juntamente com a via de alvo da rapamicina (TOR) são vias que agem paralelamente e que são conservadas evolutivamente entre os metazoários (Brogiolo et al., 2001; Edgar, 2006). A via de insulina tem uma relação

íntima com o sistema endócrino e juntos ambos são capazes de regular os processos de muda e metamorfose em insetos (Colombani et al., 2005; Mirth et al., 2005). Essas duas vias, tanto a TOR quanto a IIS são de grande importância na diferenciação de castas, por exemplo, o silenciamento, por meio de RNAi, do gene *AmTOR* no início do desenvolvimento causou a inibição das características de rainha (Patel et al., 2007). Por sua vez, os genes pertencentes a via de IIS, *AmILP-1* e *AmILP-2* apresentam um padrão de expressão diferente entre as castas ao longo do desenvolvimento. *AmILP-1* apresenta um pico de expressão nas fases L5F1 e L5F2 na casta de rainha enquanto *AmILP-2* apresenta um pico durante as fases L5F3 e L5S1 na casta de operária (de Azevedo & Hartfelder, 2008). Por sua vez, a via Egfr supostamente tem como uma de suas funções traduzir o estímulo da Royalactina, que é uma proteína da geleia real (Kamakura, 2011).

Por isso é possível notar, quanto as diferenças morfológicas, que a rainha adulta apresenta um grande número de ovários, variando de 150-200 unidades em cada ovário, e por meio deste grande número é capaz de botar por volta de 1000 ovos por dia, enquanto que as operárias têm apenas de 2-20 ovários por ovário (Snodgrass, 1956). Dessa forma, as operárias têm ovários atrofiados, o que torna essa característica um fator limitante na sua capacidade reprodutiva. Observa-se que operárias não são estéreis, mas subférteis, pois são reprimidas na sua capacidade reprodutiva pela presença da rainha na colmeia, mais especificamente pelo feromônio da rainha (ver revisões em Ronai *et al.*, 2016; Hartfelder *et al.*, 2017). Um dos genes que altera sua expressão na ativação do ovário de operárias é *Anarchy*, codificador de uma proteína peroxissômica. Tal proteína pertence à família de proteínas transportadoras de solutos mitocondriais (Visser et al., 2002). *Anarchy* é amplamente estudado por regular diretamente o estado de ativação do ovário

de operárias adultas (Ronai et al., 2016). Na ausência de uma rainha, as operárias podem ativar os seus ovários e produzir ovos que não serão fecundados, já que essas não acasalam, e conseqüentemente tais ovos darão origem a zangões.

Além do tamanho dos ovários, que é uma das características mais marcantes entre as duas castas e que delimita claramente as suas funções distintas, a rainha apresenta também maior longevidade que as operárias, tendo tempo de vida que varia de 2-3 anos, enquanto que as operárias em regiões tropicais tipicamente vivem de 35 a 40 dias, mas podem viver até 180 dias no caso de abelhas diutinos, que passam de inverno na colmeia em climas temperados (Münch & Amdam, 2010). Outra diferença morfológica muito marcante que diferencia rainhas e operárias é que as operárias possuem um aparato especializado para coleta de pólen, as corbículas nas pernas traseiras, e glândulas hipofaríngeas bem desenvolvidas (Snogross, 1956). As glândulas hipofaríngeas são diretamente ligadas à produção de alimento larval (Free, 1980).

1.4 Epigenética – acetilação de histonas

O DNA é uma estrutura extremamente compactada no núcleo da célula dos eucariotos. Para que fatores de transcrição possam interagir com sítios de reconhecimento em regiões regulatórias e a maquinaria de transcrição possa ser montada, existe um processo regulatório fino que modula o grau da condensação e descondensação da cromatina. Esses processos são denominados de epigenéticos pois atuam sobre a estrutura e compactação da cromatina, podendo passar ou não de geração para geração, mesmo que, a princípio, não impliquem em mudanças na sequência nucleotídica do DNA (Holliday and Pugh, 1975). Esses processos epigenéticos são importantes para a

diferenciação celular, desenvolvimento, proteção contra genomas exógenos, tal como o viral, e parecem ser críticos para que haja a integração entre sinais endógenos e ambientais durante a vida do organismo (Jaenisch & Bird, 2003; Feinberg et al., 2006; Herceg, 2007).

Histonas são proteínas altamente conservadas, compostas por um octâmero de proteínas, dois dímeros H3-H4 e dois dímeros H2A-H2B. Esse octâmero é envolto pela fita de DNA, dando origem a uma estrutura denominada nucleossomo. Nessa estrutura existe uma grande interface entre o cerne de histonas e o DNA, o que propicia a formação de 142 ligações de hidrogênio entre os aminoácidos do cerne de proteínas e o esqueleto fosfodiéster que compõe o DNA (Luger et al., 1997; Luger & Richmond, 1998; Jin et al., 2005). Além das ligações que se formam e são de grande importância para manter o DNA envolto às histonas, cada componente desse octâmero irá apresentar também uma cauda N-terminal que se projeta para fora da estrutura do nucleossomo (Luger et al., 1997). São regiões que podem sofrer alterações por adição ou remoção de grupos fosfato, metil ou acetil. Entre as 8 caudas que se projetam para fora da interface cerne de histonas/DNA, as caudas das histonas 3 possuem muitos resíduos específicos de aminoácidos, principalmente lisinas, que são altamente suscetíveis a modificações e apresentam carga positiva. A acetilação, adição de um grupo acetil, a resíduos lisina da cauda N-terminal geralmente causa o afrouxamento da cromatina. A ligação desse grupo a um resíduo de aminoácido, que anteriormente era positiva devido à grande quantidade de lisinas e argininas, torna a região do cerne de histonas agora carregada negativamente, e dessa forma, o DNA, por apresentar carga negativa devido a presença dos grupos fosfato, é repellido, afrouxando o nucleossomo e, conseqüentemente, facilitando o acesso de fatores de transcrição e montagem da maquinaria transcricional. Ao contrário, a desacetilação ou

a metilação de histonas tendem a tornar a cromatina mais compactada, impedindo tal acesso. A acetilação das histonas se dá através da ação de histona acetiltransferases (HATs), enquanto as enzimas histona desacetilases (HDACs) removem o grupo acetil desses resíduos (Eberharter e Becker, 2002). A ação antagônica dessas enzimas permite a regulação do estado de condensação da cromatina. Tanto as HATs quanto as HDACs podem ser moduladas na sua atividade por diversas moléculas, como por exemplo, as HDACis, inibidoras de atividade das HDACs, que, ao impedir a atividade dessas, ocasionam uma manutenção ou até aumento nos níveis de acetilação das histonas (Dokmanovic and Marks, 2005; Dokmanovic et al., 2007a). Dentre os diversos HDACis o Butirato de sódio (NaB), ácido graxo de cadeia curta, é uma molécula muito utilizada para estudos em abelhas de alterações epigenéticas em abelhas (Hu et al., 2017, 2018). Essa molécula é capaz de inibir enzimas HDACs dos grupos I e IIa, além de modificar de forma seletiva todas as HDACs nucleossômicas (Gui et al., 2004; Dokmanovic et al., 2007b). Através dessa função de inibição essa molécula tem comprovada a capacidade a capacidade de alterar a expressão gênica em camundongos e humanos (Davie, 2003) e em abelhas (Hu et al., 2017, 2018).

Alterações epigenéticas, são de suma importância para a regulação dos processos de transcrição, e podem ser fortemente influenciadas por fatores ambientais (Waterland e Jirtle, 2003, 2004). Dessa forma, fatores ambientais podem apresentar uma influência bastante expressiva sobre os padrões epigenéticos encontrados em determinado organismo, especialmente no processo de desenvolvimento.

1.5 Determinação de castas em abelhas melíferas – efeitos epigenéticos

Em *A. mellifera* a alimentação é o fator ambiental de maior influência sobre a determinação das castas femininas. A geleia real, oferecida às larvas de rainha, e a dieta mista oferecida às larvas de operárias (ver referências em Hartfelder et al., 2015), causam respostas divergentes em diversas vias de sinalização e também afeta fatores epigenéticos (Maleszka, 2008). Dentre as diversas moléculas presentes na geleia real, um ácido graxo, 10 hidroxi-2-decenóico (10HDA), tem chamado muita atenção, entretanto, as suas funções como composto alimentar ainda estão pouco esclarecidas. Sabe-se que sua produção aumenta significativamente com o envelhecimento das operárias (Yang et al., 2017). Já quanto à sua ação nas larvas, supõe-se que tem uma função na regulação epigenética como inibidor de HDACs, uma vez que o 10HDA tem mostrado tal efeito em cultivo de células de mamíferos (Spannhoff et al, 2011).

A diferença nos níveis de 10HDA ingerido pelas larvas, principalmente nos estágios larvais críticos para a diferenciação de castas (L4 e L5F1), pode ser um fator muito importante para desencadear a plasticidade fenotípica observada entre as duas castas, pois o 10HDA poderia agir diretamente sobre a compactação da cromatina, através da inibição de HDACs. Dessa forma, sugere-se que os níveis de acetilação de histonas presentes em larvas de rainha que ingerem maior quantidade de 10HDA que operárias (Wang et al., 2016) tenderiam a ser maiores que os níveis observados em operária. Em insetos, e especialmente em abelhas, ainda há poucos estudos relatando efeitos de inibidores de HDACs sobre processos de desenvolvimento. Um destes mostrou que a injeção dos HDACis SAHA e/ou butirato de sódio (NaB) acelera o desenvolvimento pós-embriônico

no lepidóptero *Galleria melonella* (Mukherjee et al., 2012), enquanto a injeção de inibidores de HATs retarda o desenvolvimento. Já em *A. mellifera*, foram mostrados efeitos da 10HDA sobre a melhora da memória em abelhas melíferas adultas expostas a inseticidas do tipo neonicotinóides (Hu et al., 2017) e sobre a resposta imune quando infectadas com diversos patógenos (Hu et al., 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho era de avaliar o papel das enzimas HDACs das classes I e II em larvas de *A. mellifera* e investigar o efeito do inibidor da atividade de HDACs, 10HDA, na expressão de caracteres fenotípicos e principalmente na expressão de genes que são diferencialmente expressos entre as duas castas femininas. Essa pesquisa teve o intuito de entender se, e como um aumento na concentração de 10HDA, substância encontrada em maior concentração no alimento das rainhas, poderia propiciar uma mudança fenotípica nas larvas operária e, especialmente na expressão gênica relativa de genes chave na diferenciação das castas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Quantificar os níveis transcricionais dos genes que codificam as HDACs, e *dnmt3*, uma DNA metil transferase, ao longo do desenvolvimento larval. Tais análises realizamos por meio de ensaios RT-qPCR, comparando larvas de operária e rainhas naturais.
2. Realizar testes de alimentação *in vitro* de larvas de operárias por 24 h com diferentes concentrações de 10HDA para avaliar os efeitos sobre a expressão dos genes que codificam HDACs, *dnmt3*, *Kr-h1* e *mfe*.
3. Avaliar a atividade enzimática das HDACs em larvas de operárias criadas *in vitro* sob dieta com maiores quantidades de 10HDA e compará-las a rainhas e operárias naturais.
4. Avaliar o efeito do 10HDA em cultura *in vitro* de ovários de larvas de operária para avaliar o efeito sobre a expressão de genes importantes na diferenciação casta-específica dos ovários.

5. Realizar uma análise detalhada de anotação dos genes codificadores de HDACs no genoma de *A. mellifera*.

3. HIPÓTESE

A hipótese desse trabalho era que larvas jovens criadas como operárias, quando tratadas com 10HDA através da alimentação, desenvolveriam características fenotípicas e moleculares semelhantes às de rainha. Tal seria causado devido à alteração na conformação da cromatina pela função de inibição que o 10HDA teria sobre as enzimas HDACs.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Para a realização dos experimentos foram utilizadas larvas de operárias e rainhas de *Apis mellifera* (híbridos Africanizados) provenientes do Apiário Experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, SP. Larvas da casta rainha foram criadas seguindo prática padrão da apicultura, por transferência de larvas recém eclodidas para cúpulas realeiras e introdução das mesmas em colmeias de recria. As larvas de operária foram obtidas diretamente de favos de cria. Para confirmar que as larvas coletadas estavam na fase desejada essas foram pesadas em balança digital AY220 (Shimadzu) para subdivisão nos respectivos estágios de desenvolvimento larval (Michelete & Soares, 1993).

4.2 Teste de doses dos inibidores de HDACs 10HDA e butirato de sódio (NaB) em experimento de criação *in vitro*

As larvas coletadas no estágio L1 (primeiro instar larval) foram transferidas para placas de cultura de células (24 poços), contendo uma dieta larval artificial, oferecida diariamente, com 53% de geleia real, 6% de frutose, 6% de glicose, 1% de extrato de levedura e 34% de H₂O (Kaftanoglou et al., 2011; de Souza et al., 2015) e diferentes concentrações de 10HDA (5 mM e 15 mM) e butirato de sódio (NaB, 1 mM e 10 mM). Foram mantidas em estufa com condições similares à da colônia (34 °C e 80% de umidade relativa) até a eclosão das abelhas adultas. Foi realizada a análise de parâmetros gerais como peso e duração do desenvolvimento até emergirem como abelhas para os grupos tratados com NaB e controle. A maioria dos experimentos e testes realizados foram feitos com NaB, usado nesse caso como um controle positivo. Nos poucos testes realizados com

o 10HDA tivemos problemas experimentais pela alta concentração de álcool que essa substância teve de ser diluída.

4.3 Teste de doses *in vitro* por 24h

Para esse experimento larvas de operária em estágio L3 (terceiro instar larval), próximo ao período em que a casta é estabelecida, foram coletadas diretamente da colmeia e transferidas para placas de cultura de células (24 poços), contendo a dieta larval artificial composta de 53% de geleia real, 6% de frutose, 6% de glicose, 1% de extrato de levedura e 34% de H₂O (Kaftanoglou et al., 2011; de Souza et al., 2015) e diferentes concentrações de 10HDA (5 mM e 15 mM) e NaB (1 mM e 10 mM). As placas foram mantidas em estufa com condições similares à da colônia (34 °C e 80% de umidade relativa) por 24 h. Após esse período, quando as larvas já estavam no quarto instar larval (L4), elas foram coletadas e passadas imediatamente para 500 µL de reagente TRIzol® (Life Technologies), e em seguida foram armazenadas em freezer -80 °C até a extração do RNA.

4.4 Cultura de tecido do ovário

Para a realização desse experimento foram utilizadas larvas de operária na fase L5F1, fase anterior a um pico de expressão de HDAC4 em rainhas (Figura 3C). As larvas foram coletadas diretamente dos favos e pesadas para garantir que estavam na fase desejada. Após a coleta essas foram dissecadas e os ovários extraídos e acondicionados em placas de 24 poços contendo meio GRACE (Sigma), e a concentração desejada de 10HDA diluída em álcool absoluto, no caso 5 mM. Como controle foi utilizado um poço apenas com meio GRACE e outro apenas com a mesma quantidade de álcool usada para

dissolver o 10HDA. O experimento foi realizado com 3 amostras por vez, para que o grupo tratado e os controles fossem coletados no mesmo dia e passassem pelas mesmas condições. Para cada grupo foi coletado um pool de 10 pares de ovários, e esses foram mantidos em meio por 24 h a 34 °C e 80% de umidade relativa. Passado o tempo os ovários foram coletados e colocados em tubos de 1,5 mL contendo 250 µL de TRIzol. Em seguida as amostras foram acondicionadas em freezer -80 °C até a extração de RNA do tecido.

4.5 Perfil de expressão de HDACs e *dnmt3* ao longo do desenvolvimento larval

Imediatamente após a coleta as larvas tiveram a cutícula rompida e as carcaças de larvas L1, L2 e L3 foram imersas em 300 µL de reagente TRIzol em tubos Eppendorf de 1,5 mL e homogeneizadas, por serem muito pequenas foi feito um pool de 5 indivíduos para essas fases. Por sua vez, as carcaças das larvas de fase L4 e L5 (F1, F2, F3, S1, S2 e S3) foram imersas em 500 µL de reagente TRIzol em tubos Eppendorf de 2 mL, homogeneizadas com o auxílio de um pistilo e o volume foi completado para 1 mL. As amostras foram armazenadas em freezer -80 °C até a extração de RNA.

4.6 Extração do RNA total e síntese do cDNA

Para a extração do RNA, as amostras em TRIzol retiradas do freezer ficaram por 5 minutos expostas a temperatura ambiente. Em seguida, foi acrescentado clorofórmio aos tubos (0,2 mL para cada 1 mL de TRIzol) e a mistura foi homogeneizada e deixada em repouso em temperatura ambiente por 3 minutos, centrifugadas a $15.234 \times g$ a 4 °C por 15 minutos. Ao final da centrifugação a fase aquosa das amostras, que contém o RNA, foi retirada e transferida para outro tubo Eppendorf. A partir da fase aquosa procedeu-se

com a etapa de isolamento do RNA, em que 0,5 mL de isopropanol 100% para cada 1 mL de TRIzol, foi adicionado às amostras. As mesmas foram homogeneizadas e mantidas em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos, seguido de centrifugação por 10 minutos, a $15.234 \times g$ e 4°C . O sobrenadante presente em cada tubo foi retirado, deixando apenas o pellet ao qual foi adicionado 1 mL de etanol 75% para cada mL de TRIzol. As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas por 5 minutos a uma velocidade de $5.974 \times g$ a 4°C . Ao final da centrifugação o sobrenadante foi retirado, cuidadosamente deixando apenas o pellet, e o excesso de etanol ainda presente foi retirado do tubo por evaporação em bloco térmico a 60°C por volta de 5 a 10 minutos. Já seco, o pellet foi ressuspensão em 10-50 μL de H_2O tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC), dependendo do tamanho do pellet.

Em seguida, 10 μL de cada amostra foi tratada com DNase I, RNase-free (Thermo Scientific™). Para isso, 1 μL da enzima DNase mais 1 μL do 10 x Reaction Buffer foram adicionados a 10 μL de cada amostra, homogeneizadas por pipetagem repetida. Em seguida as amostras foram colocadas em um termociclador (Applied Biosystems) a 37°C por 30 minutos. Logo após, foi adicionado 1 μL de EDTA (50mM), e as amostras foram colocadas novamente no termociclador a 65°C por 10 minutos. A pureza e quantidade do RNA das amostras foram avaliadas por meio de leitura da absorbância nos comprimentos de onda 260 e 280 nm em espectrofotômetro Nanoview (GE Healthcare Life Sciences). Amostras com valores da razão 260/280 entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas para a confecção do cDNA.

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizado com UltraScript 2.0 cDNA Synthesis Kit (PCRBiosystems, London, UK) utilizando 1 µg do RNA total de cada amostra. Todas as amostras com concentrações acima de 0,1 µg/µL foram diluídas em água DEPC para ajustar a concentração desejada. Quantidades iguais de RNA foram retiradas de cada amostra para síntese de cDNA, que foi realizada com 4 µL de 5x cDNA Synthesis Mix, 1 µL de UltraScript 2.0 for cDNA Synthesis (with RNase inhibitor) e 5 µL de água DEPC para cada 10 µL de amostra. As amostras foram homogeneizadas e colocada no termociclador a 50 °C por 30 minutos, seguido de 95 °C por 10 minutos.

4.7 Quantificação por RT-qPCR dos transcritos de genes codificadores de HDACs e genes de interesse

Os níveis de expressão dos genes avaliados neste trabalho foram quantificados por PCR em tempo real (RT-qPCR) utilizando primers específicos (Tabela 1). As análises foram avaliadas em 6-8 replicatas biológicas, cada um com 3 replicatas técnicas. As análises foram realizadas utilizando o reagente PCR 2x qPCRBIO Sygreen Mix Separate ROX (PCRBiosystems, London, UK) no sistema StepOne Plus™ (Applied Biosystems). O mix de reação era composto de 1,0 µL de cDNA (diluído 1:10), 3,7 µL de H₂O ultrapura, 5,0 µL de 2x qPCRBIO PCR Sygreen Mix Separate ROX (para cada 1 mL de Sygreen foi acrescentado 20 µL de ROX) e 0,3 µL dos primers *forward* e *reverse* diluídos juntos a uma concentração de 10 pM, conforme protocolo padronizado no laboratório.

Para a análise e interpretação dos dados obtidos pela RT-qPCR realizamos os cálculos com base nos valores do Ct (*threshold cycle*), ciclo em que a fluorescência ultrapassa o limiar (*threshold*), do gene alvo e dos genes de controle endógeno, sendo estes um gene ribossomal *Rpl32* (GB47227) e uma actina citoplasmática (GB44311)

(Loureço et al., 2008). Para o cálculo da expressão relativa dos genes de interesse aplicamos a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados no ensaio de RT-qPCR. Em negrito os genes endógenos utilizados para padronização. As linhas tracejadas representam ausência de informação

Gene_ID	NCBI_ID	Nome	Nome Primer	Sequência de primers		Tamanho do produto (pb)
				<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>	
GB47227	NM_001011587.1	Ribosomal protein L32	<i>RpL32</i>	CGTCATATGTT GCCAACTGGT	TTGAGCACGT TCAACAATGG	150
GB44311	NM_001185145.1	Actin related protein 1	<i>Actina</i>	TGCCAACACT GTCCTTTCTG	AGAATTGACC CACCAATCCA	156
GB53438	XM_394976.7	Histone deacetylase 1	<i>HDAC 1</i>	TCCTGGCACTG GTGACCTCCG	GCAACCTAACCG ATCCCCTGTCA	205
GB43894	XM_395811.6	Histone deacetylase 3	<i>HDAC 3</i>	TTGGAGCAGA AAGTGGGAGA	CTATTGCTGTC GGTTGGAAAA	132
GB43234	XM_391882.7	Histone deacetylase 4	<i>HDAC 4</i>	CATAGCACGAT GTTCGGTTGT	CACGTTGTCACG CTTCAGATT	164
GB42847	XM_026443068.1	Histone deacetylase 6	<i>HDAC 6</i>	AGAAAGGAA TGGGTGATGC	CTAAAGAAGATA GCCAATGTGTC	189
GB45427	XM_001123084	krüppel-homolog 1	<i>Kr-h1</i>	GCACTGGCAG TGACAAGGAA	CGTGGAGTGTTA TCGTAAGTAGCAA	76
GB48175	NM_001327966	metil farnesoato epoxidase	<i>mfe</i>	GGAATCATT CTTGCGGAGA	GTTATGCGCG CTATGGAAAT	145
GB17332	-----	Insulin-like peptide 1	<i>ILP-1</i>	CGATAGTCCT GGTCGGTTTG	CAAGCTGAGC ATAGCTGCAC	-----
GB10174	NC_037651.1	Insulin-like peptide 2	<i>ILP-2</i>	TTCCAGAAATG GAGATGGATG	TAGGAGCGCA ACTCCTCTGT	166
GB48301	XM_016913181.2	forkhead box protein O	<i>FoxO</i>	TTATGCGAGT GCAGAACGAG	AACCGGACTG TCTGGAAAAGA	242
GB54477	XM_026441434.1	epidermal growth factor receptor-like	<i>Egfr</i>	GAGATCCTGG CCGATATCTG	GCAGAAAGTC CTGGTGGAAATC	187
GB44905	XM_625127	Target of rapamycin	<i>TOR</i>	AACAACCTGTT GCTGACGGTG	GTTGCAGTCC AGGCTTTTTG	153
GB12860	-----	staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	<i>Tudo-SNr</i>	GTTACCAGTG GATCGGTCT	AGCAATGCTC TCGGGTGAAA	-----

JZ474541- JZ474546	-----	long noncoding ovary-1 RNA	<i>Incov 1</i>	GGAGAAGCT TTGGGGAGAG	CTGCTACACA CCACCATAAC	----
JZ474547- JZ474553	-----	long noncoding ovary-2 RNA	<i>Incov 2</i>	TCTCCCGGTGA CAAGGAAATC	GAAGTCCCCC TCGACTTTTC	----
GB48961	XM_006565307.3	peroxisomal membrane protein PMP34	<i>Anarchy</i>	ACAAAGGAA TGGAAGCCAAA	GGAAATTTAC ACGGGGAACA	188
GB55485	NM_001190421.1	DNA methyltransferase 3	<i>Dnmt 3</i>	CAGCGATGACCT GCGATCGGCGATA	TACAGGGTTTA TATCGTTCGGAAC	152

4.8 Extração de proteínas nucleares

Para a extração de proteínas nucleares foi utilizado o nuclear extraction kit (EpiGentek). Inicialmente as larvas foram pesadas e em seguida maceradas com um pistilo em tubos de 1,5 mL. Foi acrescentado a esses tubos o tampão NE1 diluído 10x em água MiliQ e os pedaços teciduais foram novamente homogeneizados. Seguimos a recomendação do fabricante em que por grama de tecido deve-se adicionar 5 ml de NE1 diluído (1X) contendo 5 µl de DTT (1:1000). Após a homogeneização as amostras foram incubadas no gelo por 15 min, em seguida centrifugadas por 10 min a $15.234 \times g$ e $4^\circ C$. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 50 µl do tampão NE2 contendo DTT Solution e PIC a uma proporção de 1: 1000. As amostras foram incubadas em gelo por 15 minutos e nesse tempo de incubação foram vortexadas por 5 segundos a cada 3 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a $21.952 \times g$ e $4^\circ C$. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo frasco e as amostras foram imediatamente quantificadas por método de Bradford.

4.9 Incubação de extratos nucleicos com geleia real e geleia de operária

Para esse experimento utilizamos os extratos nucleicos previamente extraídos de rainhas e operárias naturais da fase L5F2, pois nessa fase as amostras estavam mais concentradas. Escolhemos os 3 extratos com maiores concentrações em cada casta. Após a escolha pegamos cerca de 20 µl de cada amostra e misturamos em único tubo formando um pool de 6 indivíduos, 3 rainhas e 3 operárias. Esse pool serviu de base para o nosso experimento. As geleias, real e de operária, coletadas diretamente da colônia, foram diluídas 100x em tampão NE2 contendo DTT Solution e PIC a uma proporção de 1: 1000, esse foi utilizado no processo de extração de proteínas. Pegamos 10 µl do pool de extrato nucleico e adicionamos 10 µl de geleia real (1:100), geleia de operárias (1:100) ou NE2 (contendo DTT Solution e PIC). Esses 20 µl foram colocados em tubos de 0,2 ml e incubados à 34 °C e 80% de umidade relativa por 1 h em estufa agitando a 180 rpm. As amostras foram armazenadas em freezer -80 °C até a utilização do Kit de análise da atividade enzimática. O n amostral utilizado foi de 7 amostras para cada tratamento.

4.10 Quantificação proteica por método de Bradford

Para a quantificação dos extratos proteicos obtido por meio da extração de proteínas nucleares foi utilizado o método de Bradford, conforme indicado pelo fabricante do kit de análise da atividade enzimática de HDACs. Inicialmente foi construída uma curva padrão a partir de uma concentração conhecida proteína (2 mg/ml) de albumina de soro bovino (BSA; Sigma). O BSA foi pesado e colocado em 1 mL de água, e a partir dessa solução foram geradas 7 diluições consecutivas para a construção da curva padrão. Foram pipetadas duplicatas de 10 µl das respectivas diluições em placa ELISA de 96 poços. Em seguida, 2 µl das amostras de extrato protéico foram pipetados em triplicata

nos poços restantes. Para uma quantificação precisa do extrato nuclear, o buffer de trabalho final (NE2 + PIC com DTT) foi utilizado como branco. Para os poços destinados a produção da curva padrão foram adicionados 190 µl de reagente de Bradford (Comassie Blue G250, Etanol 95%, ácido fosfórico 85% e água ultrafiltrada), e para os poços contendo amostras e o branco foram colocados 198 µl de reagente Bradford, assim totalizando 200 µl em cada poço. Após 10 minutos foi realizada a leitura no equipamento PowerWavex (BIO-TEK instruments, inc.) utilizando o comprimento de onda de 595 nm. Logo após a quantificação as amostras foram congeladas a -80 ° C até uso posterior.

4.11 Análise da atividade enzimática

O ensaio para avaliação da atividade das histonas desacetilases foi realizado utilizando o EpiQuik HDAC Activity/Inhibition Assay Kit (EpiGentek), que avalia nove tipos de HDACs, incluindo as quatro enzimas encontradas em abelhas melíferas (HDACs 1, 3 da classe I e as HDACs 4 e 6 da classe II). Para esse experimento foram utilizados os extratos nucleares previamente preparados. Inicialmente diluímos o primeiro item do kit, H1 (tampão de lavagem 10X) com água ultrafiltrada (pH 7,2-7,5) na proporção 1:10. Em seguida, o reagente H3 foi diluído na proporção 1:50 na solução de H1 diluído. Da solução resultante foi pipetado 50 µl apenas nos poços de amostra e de controle. Para a preparação da curva padrão, foi adicionado 50 µl de H1 diluído aos poços, seguido pela adição de 1 µl de H5 em diferentes quantidades (10, 5, 2,5, 1,0, 0,5 e 0,1 ng). Os poços foram cobertos com parafilme e incubados em temperatura ambiente por 40 minutos. Em seguida os poços foram aspirados e lavados por duas vezes com 150 µL de H1 diluído. Na próxima etapa do ensaio enzimático adicionamos 28 µl de H2 e 2 µl dos extratos nucleares (2,5 ng/µl) aos poços destinados às amostras. Para os poços destinados ao

controle, curva padrão e branco foram adicionados 30 µl de H2. O conteúdo foi cuidadosamente misturado e as strips, colunas destacáveis da placa, foram cobertas e em seguida incubadas a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação o líquido dos poços foi aspirado e os poços foram lavados por três vezes com 150 µL de H1 diluído. Para o passo seguinte foi feita a diluição do H6 (na proporção de 1: 100) em H1 diluído. Da solução resultante dessa diluição foram adicionados 50 µl a cada poço da placa e essas foram novamente cobertas e em seguida a placa foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos e 50-100 rpm em um agitador orbital (TS-2000A VDRL shaker; (Biomixer). O líquido dos poços foi aspirado e os poços lavados quatro vezes com 150 µL de H1 diluído. Na etapa seguinte diluímos H7 (na proporção de 1: 1000) em H1 diluído, e dessa solução adicionamos 50 µl a cada poço da placa e incubamos em temperatura ambiente por 30 minutos. O líquido dos poços foi aspirado e os poços foram lavados cinco vezes com 150 µL de H1 diluído. Em seguida adicionamos 100 µl de H8 a cada poço e incubamos à temperatura ambiente por 7 minutos no escuro até os poços, principalmente o controle, adquirirem uma tonalidade azul média. Por fim, adicionamos 50 µl de H9 a cada poço para interromper a reação enzimática. Após a inclusão do H9, a cor dos poços muda para amarelo. Após 2 minutos a absorbância foi lida no equipamento PowerWave_x (BIO-TEK instruments, inc.) utilizando o comprimento de onda de 450 nm. O cálculo da atividade enzimática foi feito seguindo a fórmula abaixo, indicada no protocolo do fabricante.

$$\text{Activity (ng/h/ml)} = \frac{[\text{OD (control-blank)} - \text{OD (sample - blank)}]}{\text{slope x reaction time (0.5-1 hour)}} \times \text{sample dilution}^*$$

4.12 Análises estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 7. Nas análises estatísticas de peso com que as abelhas emergiram foi utilizado o teste one-way ANOVA com o teste pós-hoc Bonferroni para comparações múltiplas. Para a análise do tempo de desenvolvimento entre os grupos foi utilizado o teste qui-quadrado. Os grupos foram comparados dois a dois por vez e o valor de p foi corrigido pelo método de Bonferroni para múltiplas comparações. Para isso, dividimos o valor de p adotado, no caso 0,05 pelo número de comparações feitas. Na análise do perfil de expressão das HDACs entre rainhas e operárias foi utilizado o teste two-way ANOVA com o teste pós-hoc de Sidak. Com relação as análises do teste de doses e da cultura de tecido foi utilizado o teste one-way ANOVA e pós-hoc de Bonferroni, em alguns gráficos desses experimentos utilizamos o pós-hoc de Turkey. Para dados não paramétricos utilizamos o teste Kruskal-Wallis com pós-hoc de Dunn. Para a análise enzimática foi utilizado teste t para comparar rainhas e operárias naturais e one-way ANOVA e pós-hoc de Turkey para os gráficos do tratamento e incubação de extrato com geleia real e geleia de operária.

4.13 Anotação gênica

Para a anotação gênica partimos do ID dos genes das HDACs indicados no artigo Wang et al. (2014). Baixamos a sequência correspondente ao ID no NCBI e utilizamos a sequência FASTA de proteína como entrada para uma busca tBLASTn contra a base de dados de nucleotídeo Amel_4.5 (GCF_000002195.4) chromosome assembly do BeeBase. Copiamos as coordenadas da sequência obtida para a plataforma Artemis do Sanger Centre (<https://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis>), e a partir desse ponto

começamos a analisar e, caso indicado, ajustar as bordas de exons e introns de cada gene. Finalizada essa etapa realizamos uma busca BlastP contra proteínas preditas de *Drosophila melanogaster* e *Tribolium castaneum* no NCBI para avaliar qual proteína nessas espécies tinha maior similaridades com as anotadas em *A. mellifera*. A partir desse ponto começamos a descrever os detalhes das respectivas proteínas HDAC de *A. mellifera* em termos de número de aminoácidos, número de éxons, e outros.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste piloto para uso de doses de 10HDA e butirato de sódio em experimentos com criação in vitro de larvas

O experimento em questão teve por objetivo avaliar qual o fenótipo, tempo de desenvolvimento e peso, observado em abelhas recém emergidas que foram tratadas ao longo de toda a fase de desenvolvimento larval com 10HDA via alimentação. Estudos tais como os de Wang et al., 2014 revelaram diferenças no peso de larvas tratadas a partir do 4 ° instar larval com 10HDA em comparação ao grupo controle. Foram realizados diversos testes piloto para avaliar qual a melhor dose a ser utilizada dos fármacos inibidores de HDACs, já que na literatura são poucos os artigos que relatam dosagens destes para larvas de abelha. Primeiramente, foram feitos os testes com butirato de sódio (NaB), fármaco utilizado como controle positivo. Entretanto, a maioria destes testes foram malsucedidos, pois as larvas não chegavam a se desenvolver por completo. A maioria morreu durante ou após os estágios finais do 5° instar larval (L5S1, S2 e S3), subfases em que a larva para de se alimentar e começa a esvaziar o intestino em preparação para a metamorfose. Para resolver o problema foram realizados diversos ajustes, tais como alterações nas doses das drogas, alterações na forma de alimentação e manipulação das larvas, além de troca de reagentes que compõem a dieta. Na Tabela 2 é possível observar a porcentagem média de indivíduos vivos em cada fase do desenvolvimento nos experimentos com NaB.

Tabela 2 – Porcentagem de sobrevivência por experimento com N inicial variado de 80 a 100 larvas (20 a 24 larvas por grupo) em relação ao número total de indivíduos transferidos para as placas de cultura.

Experimento	% de larvas em L1	% de larvas em L2	% de larvas em L3	% de larvas em L4	% de larvas em L5 feeding	% de larvas em L5 spinning	% de pupas de olho branco
Experim. 1	100%	98,33%	93,33%	90%	83,33%	50%	0%
Experim. 2	100%	80%	71%	66%	62%	40%	5%
Experim. 3	100%	100%	87,5%	77,5%	71,25%	46,25%	5%
Experim. 4	100%	100%	93,75%	88,75%	83,75%	38,75%	30%
Experim. 5	100%	95%	95%	95%	95%	89%	49%

Após diversas alterações, principalmente no menor manuseio das larvas durante a alimentação, que foi realizada diariamente, foi possível notar um aumento no número de larvas que se desenvolveram por completo e emergiram. No penúltimo experimento realizado com o NaB foi possível coletar abelhas emergidas para avaliar o peso entre os grupos e o tempo de desenvolvimento para cada grupo (Figura 1). Durante os experimentos quarto e cinco, mostrados na tabela 2, a diminuição na manipulação, já que as larvas não eram retiradas do lugar para a troca de alimento (Tabela 2 - Experimentos 4 e 5), esse era colocado ao lado delas, e também a troca do extrato de levedura (Tabela 2 – Experimento 5) contribuíram para um aumento na taxa de sobrevivência e para a produção das Figuras 1 e 2, mas o índice de mortalidade se mantinha alto durante o período de pré-pulpa e pulpa, levando a uma diminuição abrupta do N amostral necessário para resultados confiáveis.

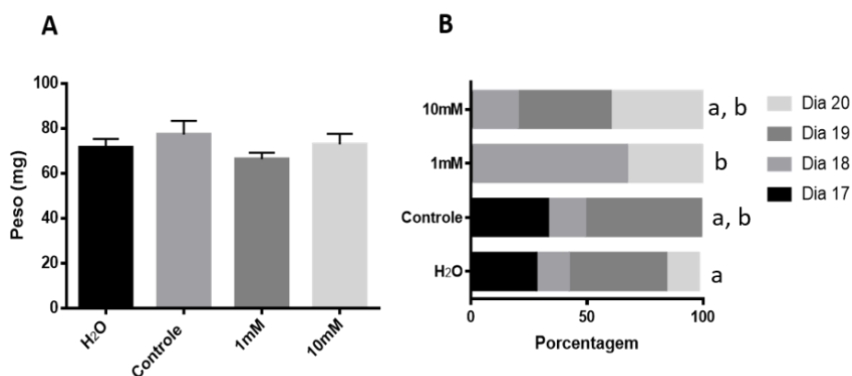


Figura 1 – Experimento 4 (Tabela 2). Peso e tempo de desenvolvimento de operárias submetidas ao tratamento com 1 mM ou 10 mM de NaB. (A) Peso das abelhas logo após terem emergido. O teste one-way ANOVA não acusou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (B) Tempo de desenvolvimento em dias até que as abelhas emergissem. Teste qui-quadrado com correção de Bonferroni $p < 0,0083$ foi adotado após a correção. Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa. O N amostral foi variado para cada grupo. Grupo controle (n=5); Controle com água (H₂O) (n = 7), 1 mM de NaB (N=3) e 10 mM de NaB (n=6). $p < 0,05$ foi adotado como nível de significância.

Os resultados não indicam uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e tratado com relação ao peso com que as abelhas emergiram. Esse resultado certamente tem um viés pelo baixo N amostral, já que um deles, o grupo de abelhas tratadas com 1 mM de NaB tinha apenas 3 indivíduos. Com relação ao tempo que as larvas levaram para se tornarem adultas foi possível observar que houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle (H₂O) e o grupo que recebeu 1 mM de NaB. Esse resultado ainda pouco conclusivo também se deu devido ao baixo N amostral e a grande diferença de n amostral entre os grupos.

No último experimento feito, experimento 5 (Tabela 2) para tentar avaliar o fenótipo e tempo de desenvolvimento de abelhas recém emergidas após alimentação por todo o desenvolvimento com NaB, trocamos o extrato de levedura que vinha sendo usado

para os experimentos e notamos uma melhoria no desenvolvimento das larvas durante todo o período larval e também até as fases que precedem o início do período pupal. Durante o final do período larval, larvas principalmente do grupo controle com H₂O e do tratamento com 1 mM, começaram a morrer em grande quantidade, enquanto as larvas do grupo controle e do 10 mM de NaB se mantiveram muito estáveis. Foi possível dessa vez, produzir mais dois gráficos (Figura 2) em que são feitas as comparações de peso entre os grupos e de data que as abelhas emergiram.

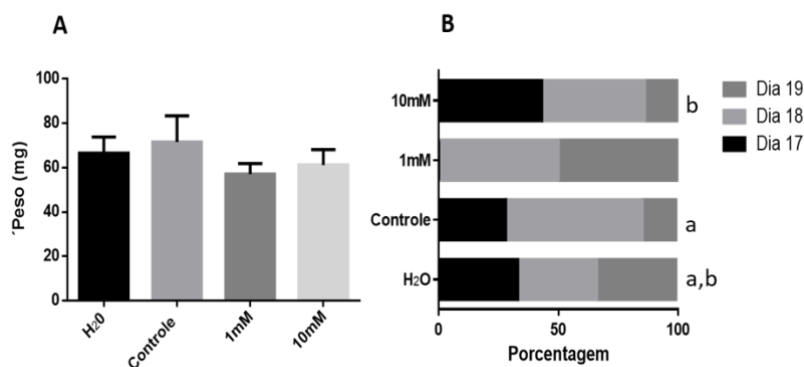


Figura 2 – Experimento 5 (Tabela 2). Peso e tempo de desenvolvimento de operárias submetidas ao tratamento com 1mM ou 10mM de NaB. (A) Peso das abelhas logo após terem emergido. O teste one-way ANOVA não acusou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (B) Tempo de desenvolvimento em dias até que as abelhas emergissem. Teste qui-quadrado com correção de Bonferroni $p < 0,016$ foi adotado após a correção. Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa. O N amostral foi variado para cada grupo. Grupo controle (n=7); Controle com água (H₂O) (n = 3), 1Mm de NaB (N=2) e 10mM de NaB (n=14). Devido ao baixo N amostral, o grupo 1 mM foi excluído das análises estatísticas. $p < 0,05$ foi adotado como nível de significância.

Pudemos notar que, novamente, o peso não apresentou diferença estatisticamente significativa entre grupos estudados. Quanto ao tempo de desenvolvimento notamos diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e controle H₂O e entre controle H₂O e tratamento com 10 mM de NaB. Os resultados

obtidos podem estar sendo influenciados pelo baixo N amostral do grupo controle H₂O que apresenta somente 3 indivíduos.

Com relação a avaliação do desenvolvimento de larvas após o consumo de 10HDA os experimentos foram sem sucesso e não conseguimos atingir um N amostral suficiente. Possivelmente pela longa e continua exposição das larvas ao álcool, solvente utilizado para diluir 10HDA, a mortalidade das larvas foi muito alta logo nos primeiros dias de criação *in vitro*. Dessa forma não demos seguimentos ao este tipo de experimento com 10HDA, tendo apenas os resultados dos testes piloto com NaB informados acima.

5.2 Perfil de expressão de genes codificadores de HDACs e do Dnmt 3 em larvas de rainha e operárias criadas nas colônias

O próximo passo foi realizar o perfil de expressão dos genes codificadores das HDACs anotados no genoma de abelhas melíferas e também do gene *dnmt 3*, codificador da DNA metil transferase 3. Para isso, foram utilizadas amostras de corpo inteiro de larvas de rainha e operária de colmeias (Figura 3).

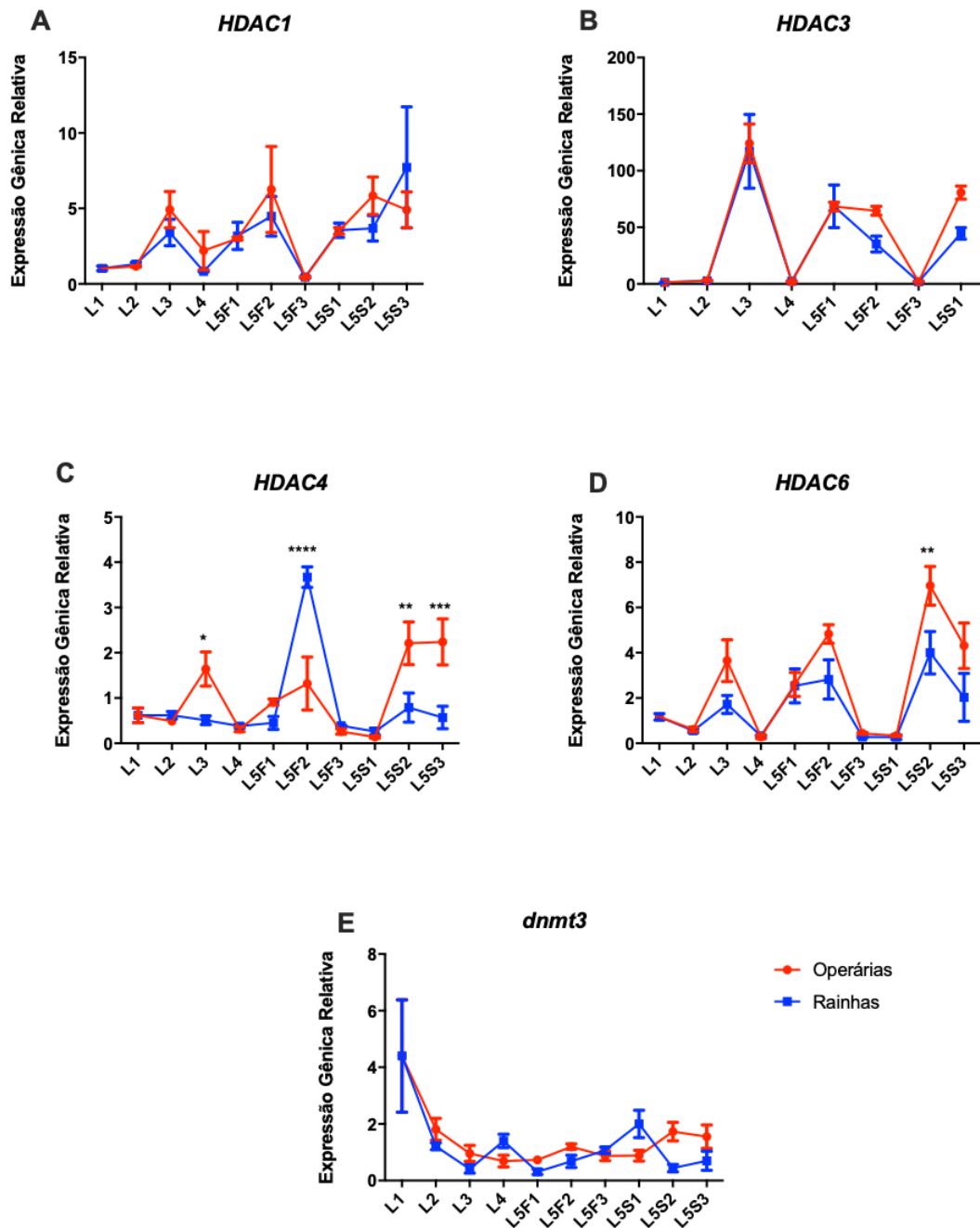


Figura 3 - Expressão relativa dos genes codificadores de HDACs e Dnmt3 em larvas de rainhas e operárias ao longo das fases do desenvolvimento larval. (A) Expressão relativa de *HDAC 1*; (B) Expressão relativa de *HDAC 3*; (C) Expressão relativa de *HDAC 4*; (D) Expressão relativa de *HDAC 6*; (E) Expressão relativa de *dnmt3*. Linha azul representa rainhas e linha vermelha as operárias. Teste two-way ANOVA com teste pós-hoc de Bonferroni; n = 8; * $p < 0,05$, ** $p < 0,009$, *** $p < 0,0001$ e **** $p < 0,00001$ foram adotados como grau de significância. As barras representam a média e o desvio padrão da média.

Os perfis de expressão dos quatro genes codificadores de HDACs e do *dnmt3* mostram que em diversas fases do desenvolvimento há picos de expressão em ambas as castas. Nota-se que para as fases iniciais do desenvolvimento, L1 e L2, os níveis de expressão gênica se mantêm baixos tanto para rainhas quanto para operárias. No terceiro instar larval (L3) é possível observar que ocorre um primeiro pico na expressão dos genes codificadores de HDACs, mas apenas para *HDAC 4* (Figura 3C) existe uma diferença estatisticamente significativa entre as duas castas, com os níveis de operárias mais altos que os de rainhas, enquanto que com relação as outras HDACs, é possível observar que esse pico ocorre para as duas castas.

Nesse contexto é importante lembrar que o quarto instar larval é descrito como a fase a partir da qual ocorre a fixação do fenótipo das castas (Dedej et al., 1998; Hartfelder et al., 2015), e foi possível notar uma queda abrupta na expressão relativa de todos os quatro genes codificadores das HDACs de *A. mellifera* em larvas de ambas as castas. Isso indica que o pico de expressão de HDACs que ocorreu na fase anterior, possa ter sido determinante para a diferenciação subsequente das duas castas.

Outro fato de interesse são os outros picos de expressão que acontecem mais tardiamente, durante o quinto instar larval, com um gradual aumento nas fases de alimentação (L5F1 e L5F2), seguido de uma queda entre L5F3 para L5S1, que marca o fim da fase de alimentação e preparação para a metamorfose. Com relação a *HDAC 4* (Figura 3C) podemos notar que o perfil de expressão do gene codificador dessa enzima é o que mais apresenta diferenças entre as castas, sendo que na fase de L5F2 existe um grande pico de expressão desse gene na casta de rainhas. Esse é o único momento em que

o nível de expressão de rainhas ultrapassa os de operárias e é estatisticamente significativo. Essa enzima é pertencente a classe II das HDACs, que são caracterizadas por serem expressas de maneira específica nos tecidos e regulam os processos de diferenciação, tais como diferenciação muscular e neuronal (Mannaerts et al., 2013).

Outras duas fases do desenvolvimento que merecem destaque são as fases da tecelagem dos casulos (L5S2 e L5S3). Nestas foi possível notar que existe uma diferença estatisticamente significativa na expressão dos genes codificadores de *HDAC 4* (Figura 3C) e *HDAC 6* (Figura 3D), principalmente na fase L5S2. Em L5S3 para *HDAC 4* essa diferença se dá pelo aumento da expressão gênica relativa em operárias quando comparadas a expressão em rainhas. O gráfico de *HDAC 3* (Figura 3B) não apresenta essas fases, pois os valores obtidos foram muito altos, e quando plotados no gráfico o distorciam, dessa forma preferimos deixar essas duas fases de fora para este gene. Com relação ao perfil de expressão para *HDAC 1* (Figura 3A) e *HDAC 3* (Figura 3B) não houve diferenças estatisticamente significantes entre as castas.

Os resultados descritos acima apresentam informações muito interessantes, pois apesar de supormos que a atividade enzimática das proteínas HDACs seja alterada pela quantidade de 10HDA ingerido na dieta larval, observamos que os genes codificadores dessas enzimas não apresentam diferenças muito marcantes e duradoras ao longo do desenvolvimento, e em algumas os níveis de transcritos em rainhas ultrapassam os de operárias e em outras é o contrário, indicando que possivelmente o efeito desse composto se dá diretamente sobre a atividade da proteína e afeta em menor escala a expressão gênica.

Quanto ao perfil de expressão do gene *dnmt3* (Figura 3E), foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre as castas ao longo do desenvolvimento larval. O que chama a atenção é o fato de que durante o primeiro instar larval, tanto para rainhas quanto para operárias, foi observado o maior nível de expressão do *dnmt3*, indicando que nessa fase inicial do desenvolvimento, logo após a eclosão da larva, existe uma maior demanda por essa proteína. Esse resultado possivelmente está diretamente ligado à marcação epigenética do DNA pela metilação de bases de citosina. Tal pode ser especialmente relevante para as células germinativas que, em vertebrados, tem suas marcas epigenéticas por metilação apagadas, e apenas nos estágios seguintes do desenvolvimento essas marcas voltam a ser colocadas no DNA pelas DNA metil transferases. Sabe-se que os padrões de metilação do DNA são estabelecidos durante o desenvolvimento embrionário inicial pelas *de novo* DNA metil transferases DNMT3A e DNMT3B, e ao longo da vida esse padrão é propagado para novas células através da DNMT1 (Bird, 2002).

Na Figura 4 apresentamos os dados da expressão das HDACs de ponto de vista diferente, comparando diretamente entre si os níveis de expressão das respectivas HDACs, separadamente para as duas castas.

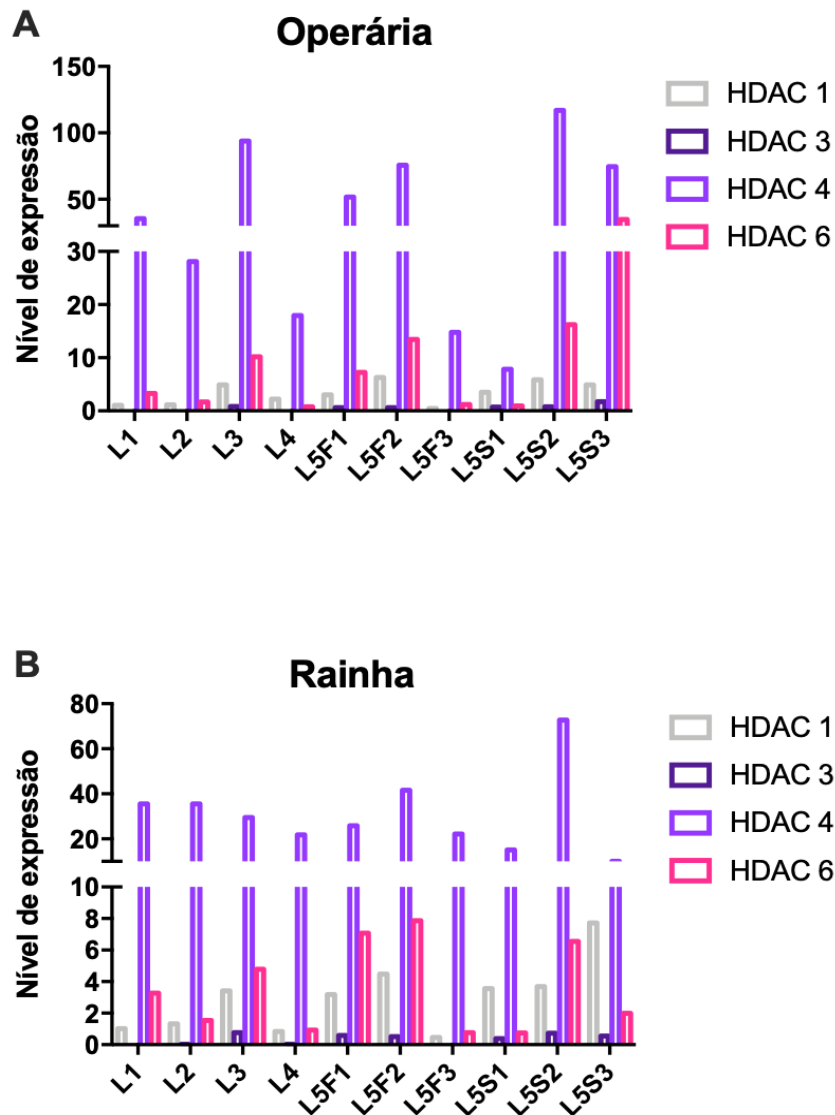


Figura 4 – Nível de expressão de cada HDAC ao longo do desenvolvimento. (A) Nível de expressão das HDACs em operárias; (B) Nível de expressão das HDACs em rainhas.

Essa análise mostra que tanto para a rainha (Figura 4A), quanto para a operária (Figura 4B), a HDAC com maior expressão foi a *HDAC 4*. Os níveis de expressão muito mais altos em comparação às outras HDACs indica que a enzima produto é a mais importante no período de desenvolvimento. A *HDAC-4*, como dito anteriormente, é uma HDAC de classe II, e enzimas desta classe são expressas de maneira específica nos tecidos e regulam

processos de diferenciação, tais como diferenciação muscular e neuronal (Mannaerts et al., 2013). Além disso, e diferente das enzimas de classe I que se encontram no núcleo da célula, as enzimas de classe II podem transitar entre o núcleo e o citoplasma (De Ruijter et al., 2003). Em menor proporção, mas com uma expressão relativamente alta, o mRNA da *HDAC-6*, que também pertence a classe II, foi o segundo mais expresso em comparação com as demais HDACs. Com esses resultados inferimos que as enzimas da classe II parecem ser as mais relevantes no desenvolvimento pós-embrionário das abelhas melíferas.

5.3 Teste de doses de 10HDA oferecido a larvas criadas *in vitro* por 24 h

Com o intuito de avaliar se a 10HDA e o butirato de sódio (NaB), um inibidor de HDACs usado como controle positivo, tem um efeito rápido sobre a expressão gênica, e para contornar os problemas notados em nossos experimentos anteriores na criação *in vitro* de larvas ao longo de todo o desenvolvimento, larvas de operárias em fase L3 foram utilizados nestes testes. A fase L3 é o último estágio larval que as operárias tipicamente escolhem para produzir uma nova rainha quando uma colônia perdeu a sua rainha e se encontra em estado denominado de órfã (Fell and Morse, 1984; Hatch et al., 1999). Assim, nesse experimento usamos larvas L3 coletadas diretamente do favo e as colocamos sobre uma dieta com diferentes concentrações de 10HDA ou NaB. Essas larvas foram então coletadas 24 h após o início do tratamento, e a análise de expressão gênica foi realizada para as 4 HDACs e o *dnmt3* (Figura 5). Assim, na fase da coleta as larvas estariam na fase L4, que é a fase de menor expressão das HDACs e de menor

variação entre larvas de rainha e operária (Figura 3), o que deveria permitir uma boa resolução para os efeitos dos tratamentos.

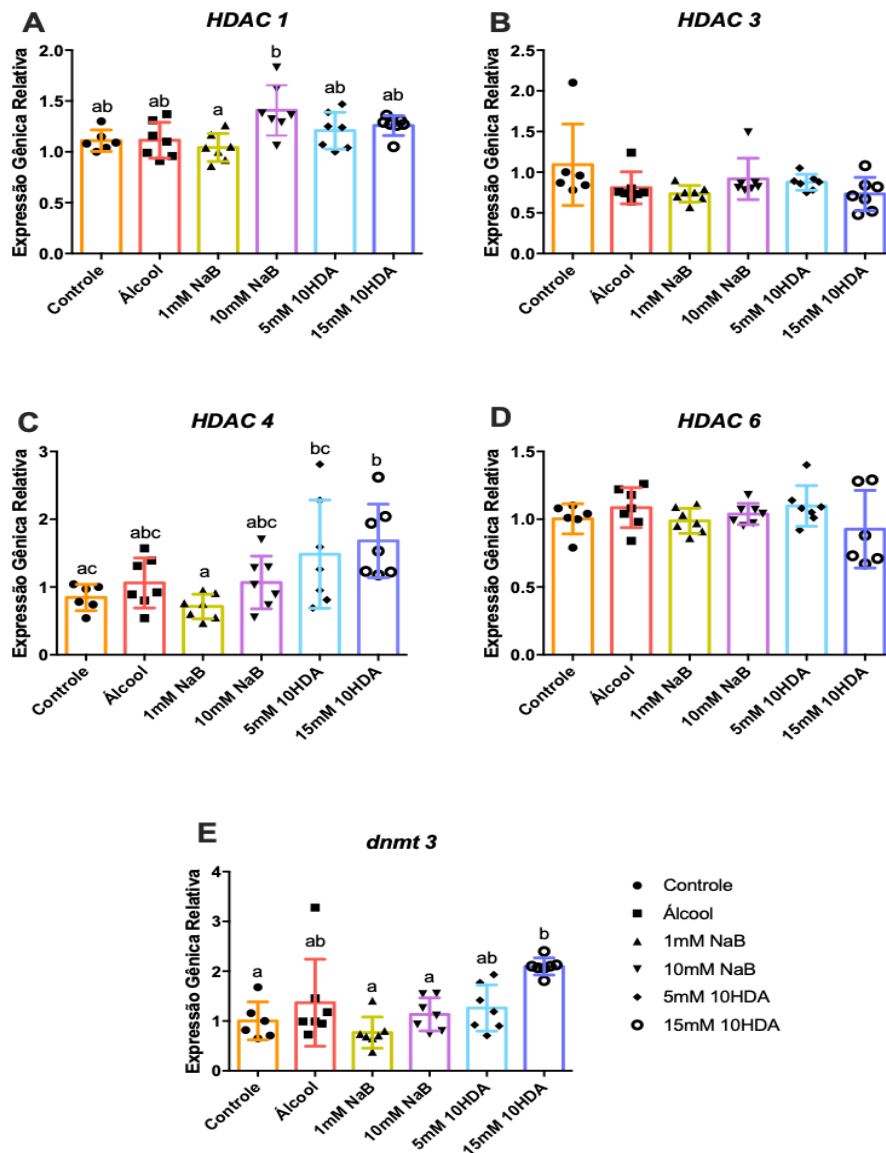


Figura 5 - Expressão relativa de HDACs e *dnmt3* após tratamento das larvas por 24 h com diferentes concentrações de NaB e 10HDA. (A) Expressão relativa de *HDAC 1*; (B) expressão relativa de *HDAC 3*; (C) expressão relativa de *HDAC 4*; (D) expressão relativa de *HDAC 6*; (E) expressão relativa de *dnmt3*. n = 7; Teste one-way ANOVA com pós-hoc de Bonferroni foi utilizado em C e E. Para os demais genes (A, B e D) foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós-hoc de Dunn. $p < 0,05$ foi adotado como grau de significância. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. As barras representam o erro padrão da média e os símbolos indicam cada amostra avaliada.

É possível notar que houve diferenças estatisticamente significantes apenas para as análises feitas com os genes *HDAC 1* (Figura 5A), *HDAC 4* (Figura 5C) e *dnmt3* (Figura 5E); os demais, *HDAC 3* (Figura 5B) e *HDAC 6* (Figura 5D) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos do experimento.

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as duas concentrações do controle positivo, 1 mM de NaB e 10 mM de NaB, na avaliação de *HDAC 1* (Figura 5A). Com relação a expressão de *HDAC 4* (Figura 5C) foram observadas diferenças entre os grupos controle e 15 mM de 10HDA, entre 1 mM de NaB e 15 mM 10HDA e entre os grupos 1 mM de NaB e 5 mM 10HDA. Esse resultado se mostrou interessante, pois houve diferença entre o controle sem tratamento e a concentração mais alta de dose de 10HDA, indicando que essa concentração teve a capacidade de alterar a expressão gênica relativa do gene *HDAC 4*, codificador da histona desacetilase mais expressa em larvas ao longo das fases do desenvolvimento (Figura 4A). Com esse resultado concluímos que foi realmente a concentração de 10HDA que causou este efeito. Outra observação importante é que os dois compostos inibidores de HDACs (NaB e 10HDA) aparentemente têm efeito oposto sobre a expressão dos genes codificadores HDACs, indicando uma certa especificidade na sua atividade inibidora. O NaB foi escolhido como composto para controle positivo, por ter a capacidade de inibir HDACs das classes I e IIa (Gui et al., 2004; Dokmanovic et al., 2007b) e também por estar presente em estudos com abelha (Hu et al., 2017, 2018).

Quanto às diferenças estatisticamente significantes observadas na análise de *dnmt3* (Figura 5E) podemos notar que o grupo tratado com 15 mM de 10HDA o *dnmt3* foi mais expresso quando comparado aos grupos controle, 1 mM de NaB e 10 mM de

NaB, indicando uma ação interessante de 10HDA sobre a expressão gênica. Assim, esses resultados nos mostram que a 10HDA afetou a expressão gênica de dois genes muito importantes em processos epigenéticos como *HDAC 4*, histona desacetilase da classe II e *dnmt3*, uma *de novo* DNA metil transferase responsável por fazer marcas de metilação no DNA.

A partir dos resultados acima decidimos avaliar também a expressão gênica de outros genes candidatos, comparando os controles com os grupos das concentrações mais altas de NaB e 10HDA. Avaliamos a expressão dos genes *Kr-h1* (Figura 6A), gene de resposta imediata ao HJ (Belles & Santos, 2014; Jindra et al., 2013), e o *mfe* (Figura 6B), gene da via de produção de HJ (Rachinsky e Hartfelder 1990, 1991). Com a avaliação desses genes pudemos notar que 10HDA afeta de alguma forma a via de atuação e também a produção de HJ.

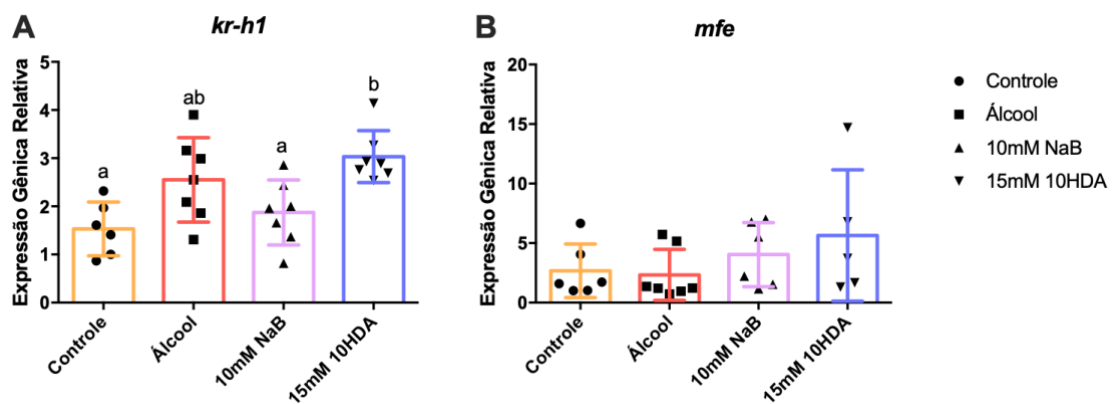


Figura 6 - Expressão relativa dos genes *Kr-h1* e *mfe* após tratamento das larvas por 24 h com 10 mM NaB ou 15 mM 10HDA na dieta. (A) Expressão relativa de *Kr-h1*, teste one-way ANOVA com pós-hoc de Tukey; (B) Expressão relativa de *mfe*, teste Kruskal-Wallis com pós-hoc de Dunn foi utilizado; n= 7; $p < 0,05$ foi adotado como grau de significância. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. As barras representam o erro padrão da média e os símbolos indicam cada amostra avaliada.

Os resultados indicam que a dose de 10HDA que as larvas receberam em maiores quantidades no alimento afetou significativamente a expressão relativa de *Kr-h1* (Figura 6A), mas não houve efeito sobre o *mfe* (Figura 6B). Esse resultado se mostrou interessante, pois aparentemente o 10HDA tem a capacidade de interagir com genes da via de resposta ao HJ, mas não sobre a síntese de HJ nos *corpora allata*.

5.4 Cultura de tecidos do Ovário

O intuito desse experimento foi avaliar se o tratamento com 10HDA tem a capacidade de afetar diretamente as células do ovário, alterando a expressão gênica de genes chave na diferenciação casta-específica desse órgão. Para isso, ovários foram dissecados de larvas operárias e incubados em meio de cultivo na presença de 5 mM 10HDA (5 mM) e a expressão genica relativa de cada gene foi avaliada (Figura 7).

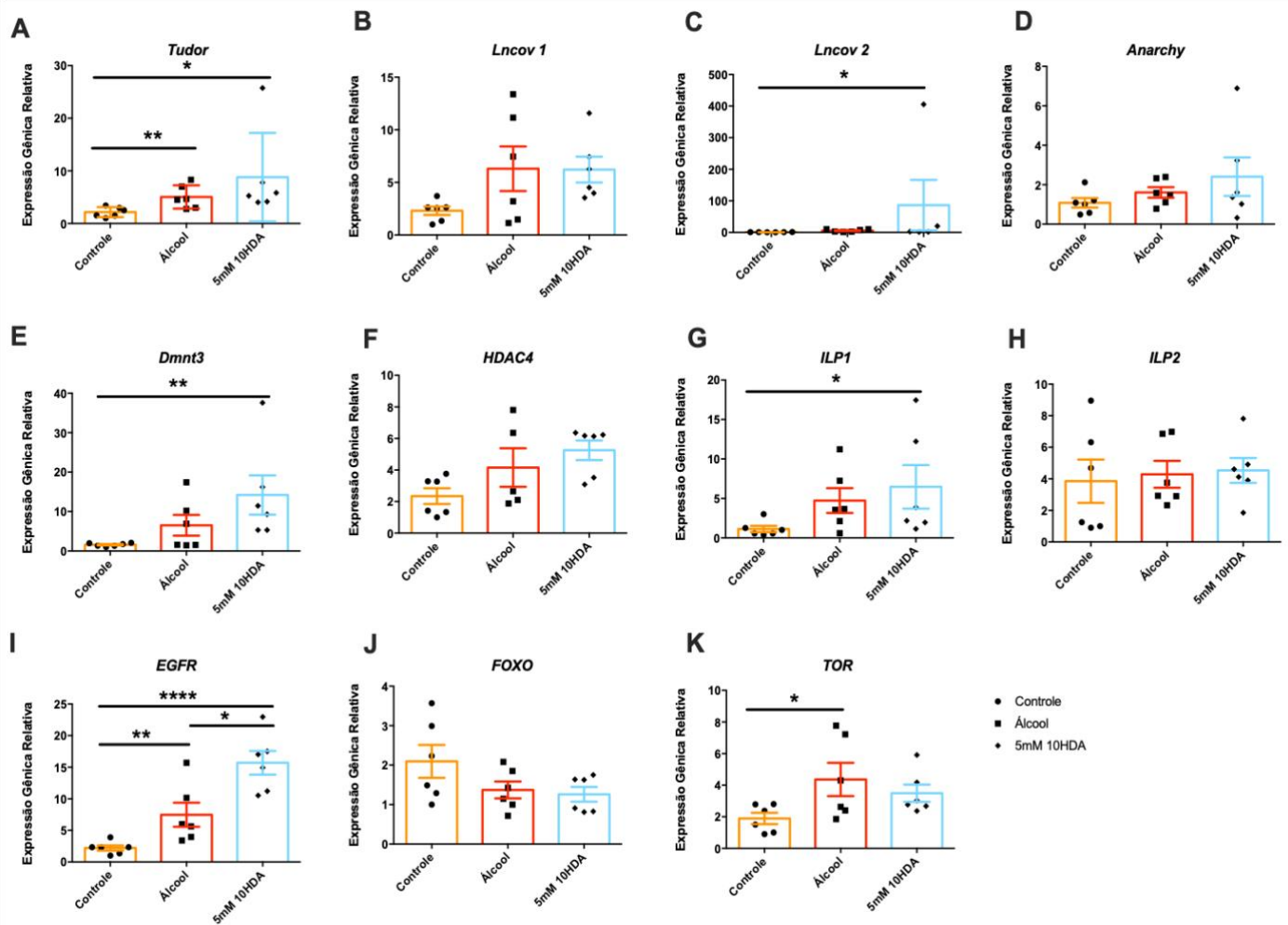


Figura 7 - Expressão relativa dos genes importantes na diferenciação e desenvolvimento ovariano em *Apis mellifera* após tratamento do ovário com 10HDA (A) Expressão relativa de *Tudor-SN*; (B) Expressão relativa de *Lncov1*; (C) Expressão relativa de *Lncov2*; (D) Expressão relativa de *Anarchy*; (E) Expressão relativa de *dnmt3*; (F) Expressão relativa de *HDAC 4*; (G) Expressão relativa de *ILP1*; (H) Expressão relativa de *ILP2*; (I) Expressão relativa de *Egfr*; (J) Expressão relativa de *FoxO*; (K) Expressão relativa de *TOR*. Para os dados dos gráficos A, B, C, D, E, G, H, I, J e K foi utilizado teste one-way ANOVA com teste pós-hoc de Tukey; para F foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós-hoc de Dunn; $n = 6$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,009$, *** $p < 0,0001$ e **** $p < 0,00001$ foram adotados como grau de significância. As barras representam a média e o desvio padrão da média.

Neste tratamento foi possível notar que houve uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle, colocado apenas em meio de cultura, com o tratado e entre o grupo controle com o grupo álcool para o gene *Tudor-SN* (Figura 7A). Podemos notar que existe um aumento no nível de expressão genica do grupo tratado, mas esse aumento também ocorreu no grupo tratado com álcool, usado como solvente para o 10HDA, o que indica uma interferência do mesmo na expressão genica relativa. Apesar dos níveis de expressão do gene *Tudor-SN* (Figura 7A), gene clivado pela caspase 3 e envolvido no processo de morte celular programada do ovário, subirem após o tratamento, em contrapartida, os níveis do *lncov1* (Figura 7B), RNA longo não codificador que interage com a proteína Tudor-SN, apresentam uma tendência ao aumento, mas que não se mostrou estatisticamente significativa. Em larvas de operária esse lncRNA apresenta um pico de expressão na fase L5F3 coincidindo com o início da morte celular programada (Humann et al., 2013). Com relação a *lncov2* (Figura 7C), outro lncRNA relacionado com a diferenciação ovariana (Humann et al., 2013), podemos notar uma diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com 10HDA e o controle com alimento. Esse resultado se mostra interessante, pois *lncov2* é mais expresso no ovário de larvas de rainha (Humann et al., 2013) e em nossos resultados a maior expressão se deu em larvas de operárias tratadas com 10HDA, indicando que a expressão deste lncRNA poderia responder aos elevados níveis de 10HDA presentes na geleia real oferecida às larvas de rainha.

Quanto aos níveis de expressão de *Anarchy* (Figura 7D) podemos observar que não houve uma alteração estatisticamente significativa nos níveis de expressão genica. Esse gene está ligado a ativação dos ovários em operárias adultas (Ronai et al., 2016), o que

pode explicar o porquê do tratamento não alterar a sua expressão genica, pois este foi feito em ovários de larvas.

Realizamos também a análise da expressão do gene *dnmt3* (Figura 7E) e *HDAC 4* (Figura 7F), genes codificadores de proteínas relacionadas a alterações epigenéticas, com o intuito de avaliar se assim como a o tratamento e análise de corpo inteiro, o tratamento direcionado ao tecido do ovário é capaz de alterar a expressão genica relativa desses genes nesse tecido. Com relação ao *dnmt3* (Figura 7D) notamos que essa DNA metil transferase apresentou diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com 10HDA e o grupo controle, exposto apenas ao meio de cultura, mas também houve um efeito do álcool, solvente do 10HDA. Quanto ao gene *HDAC 4* (Figura 7F) foi possível notar que não houve alteração estatisticamente significativa entre o tratamento e os controles. Esse resultado mostra que no tecido do ovário a expressão desse gene não se altera da mesma forma que ocorre na análise do corpo todo.

Na análise realizada dos ovários cultivados *in vitro* podemos notar que o gene *AmILP-1* (Figura 7G) apresentou um aumento de expressão no grupo tratado com 10HDA e esse resultado foi estatisticamente significativo em comparação ao grupo controle, mas também houve um efeito do álcool. Como relação ao gene *AmILP-2* (Figura 7H) não houve mudança estatisticamente significativa entre os três grupos avaliados. Com relação ao gene da via TOR, *AmTOR* (Figura 7K), os resultados foram inconclusivos, já que a diferença estatisticamente significativa se deu entre o grupo controle e álcool, nos indicando que para este gene o solvente teve grande interferência. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de TOR ser um componente central de uma via que regula o crescimento de células e do organismo como um todo, em resposta ao estado nutricional

(Colombani et al., 2003; Oldham & Hafen, 2003). O álcool possivelmente desencadeou uma resposta já que este em grande quantidade é tóxico para as células.

Quanto a análise do gene *Egfr* (Figura 7I) pudemos notar que houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos analisados, sendo que o maior nível de expressão ocorreu no grupo tratado com 10HDA. Esse gene é de grande importância na diferenciação entre as duas castas, e o aumento na expressão observado no grupo tratado chama a atenção, pois indica que a exposição direta do ovário ao 10HDA tem a capacidade de afetar essa via. Quando silenciado por meio RNAi, *Egfr* causou uma diminuição acentuada nos títulos de hormônio juvenil (HJ), afetando diretamente a expressão de características casta-específicas (Kamakura, 2011). Portanto, o aumento no nível de expressão observado após o tratamento nos permite inferir um comportamento semelhante ao observado em rainhas, pois altos níveis de *Egfr* em combinação ao aumento nos níveis de HJ, inferidos a partir do resultado observado com a análise de *kr-h1*, podem indicar uma ação no desenvolvimento ovarianos de rainhas (Kamakura, 2011).

Na Figura 7J avaliamos o nível de expressão genica de *AmFoxO* codificador de um fator de transcrição capaz de inibir o crescimento (Hietakangas & Cohen, 2009). Observamos que entre o grupo controle e tratado não houve uma diferença estatisticamente significativa, mas que os níveis de expressão observados no grupo controle foram maiores em comparação ao grupo álcool e ao grupo tratamento.

5.5 Análise da atividade enzimática

As análises de atividade enzimática das HDACs de classe I e II foram realizadas em três condições diferentes. Primeiramente, comparamos a atividade enzimática entre larvas de rainhas e operárias naturais nos estágios L5F1 e L5F2, para avaliar se em condições naturais existe uma diferença entre as duas castas (Figura 8A e 8B). Como foi possível notar, a diferença entre as castas nos dois estágios larvais não foi estatisticamente significativa, indicando que os níveis de atividade dessas enzimas responsáveis por modulações epigenéticas na cromatina não diferem em intensidade de atividade entre rainhas e operárias.

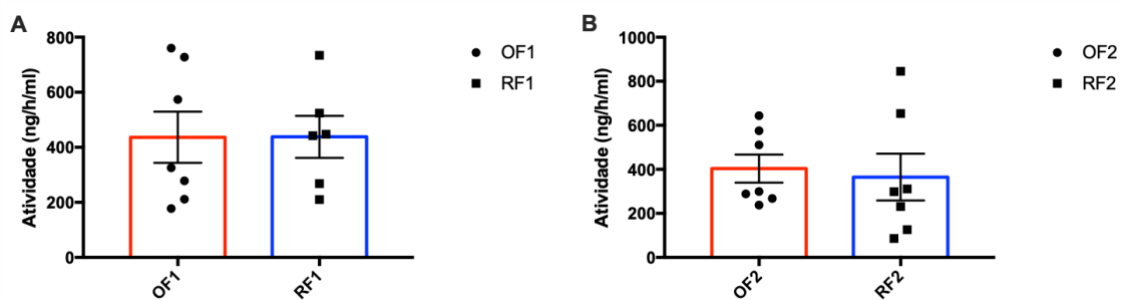


Figura 8 – Análise da atividade enzimática de HDACs entre rainhas e operárias naturais. (A) Atividade enzimática de rainhas e operárias na fase L5F1; (B) Atividade enzimática de rainhas e operárias na fase L5F2; n= 7 Teste *t* two-tailed foi utilizado e $p < 0,05$ foi adotado como grau de significância. As barras representam o erro padrão da média e os símbolos indicam cada amostra avaliada.

O resultado é muito interessante e diferente do esperado. Em nossa hipótese, a maior quantidade de 10HDA oferecida para as rainhas por meio da geleia real teria um efeito direto na modulação da atividade das HDACs, conseqüentemente diminuindo sua atividade, da mesma forma que essa molécula age em células de mamíferos (Spannhoff et al., 2011). Entretanto, a atividade enzimática entre as duas castas, tanto na fase L5F1 (Figura 8A), quanto na fase L5F2 (Figura 8B), não se alterou, mantendo valores muito

próximos entre os indivíduos de cada casta. Esse resultado indica que, apesar de na fase L5F2 haver um aumento nos níveis de transcritos dos genes codificadores de HDACs (Figura 3), principalmente para HDAC 4 na casta de rainha (Figura 3C), a atividade dessas enzimas responsáveis pela alteração conformacional da cromatina por meio de desacetilação de resíduos lisina não foi alterada entre as duas fases. Dessa forma, notamos que em condições naturais, a diferente alimentação oferecida para as larvas das duas castas femininas parece apenas afetar a expressão dos genes codificadores de HDACs, parecendo não ser estímulo suficiente para causar alteração na atividade da enzima em si.

Para uma análise do efeito do 10HDA sobre a atividade enzimática das HDACs realizamos um experimento de tratamento de larvas de operária na fase L5F1, período anterior ao pico de expressão de HDAC 4 observado em rainhas (Figura 3C), com duas dosagens diferentes de 10HDA, 5 mM e 15 mM, via alimentação por 24 h (Figura 9).

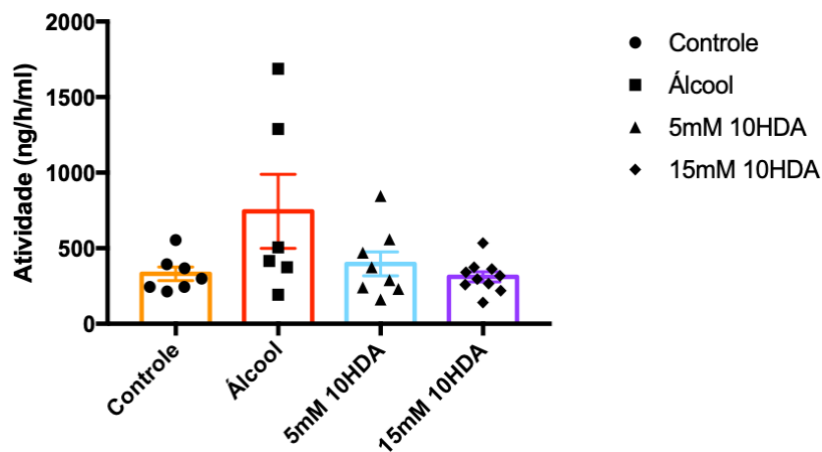


Figura 9 – Análise da atividade enzimática de HDACs entre os grupos controle (controle alimento, n= 7 e álcool, n= 6) e os grupos tratados (5 mM, n= 9 e 15 mM, n= 11 de 10HDA). Teste one-way ANOVA com pós-hoc de Tukey foi utilizado; $p < 0,05$ foi adotado como grau de significância. As barras representam o erro padrão da média e os símbolos indicam cada amostra avaliada.

Com esse resultado pudemos notar que também pelos tratamentos não houve alteração estatisticamente significativa nos níveis de atividade das HDACs quando comparados aos dois grupos controle. Ao segundo grupo de controle foi adicionado ao alimento larval uma quantidade de álcool equivalente ao das larvas que receberam 10HDA, uma vez que o álcool serviu como solvente para o 10HDA.

A atividade enzimática se manteve praticamente estável em todos os grupos analisados, tendo um leve aumento apenas no grupo controle com álcool. Esse resultado é similar ao observado em rainhas e operárias naturais (Figura 8A e 8B), pois os níveis de expressão genica de *HDAC 4* em larvas tratadas com 15 mM de 10HDA (Figura 5A) sofreram também um aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. Novamente ocorre mais um caso em que a expressão genica relativa foi alterada, mas a atividade enzimática se manteve estável entre os grupos. Esse resultado permite inferir que o 10HDA em abelhas pode ter outra função, diferente daquela observada com células de mamíferos (Spannhoff et al., 2011), já que um aumento significativo na dosagem de 10HDA oferecida em dieta as larvas não causou alteração na atividade enzimática.

A terceira condição em que quantificamos a atividade enzimática foi em amostras com extratos nucleicos de rainhas e operárias naturais incubadas à 34 ° C por 1 hora com tampão (controle), geleia real (RJ) ou geleia de operária (WJ) (Figura 10). Tal experimento teve o intuito de avaliar se o alimento em contato direto com o extrato nucleico e em temperatura similar a da colmeia poderia afetar a atividade das HDCA's ali presentes.

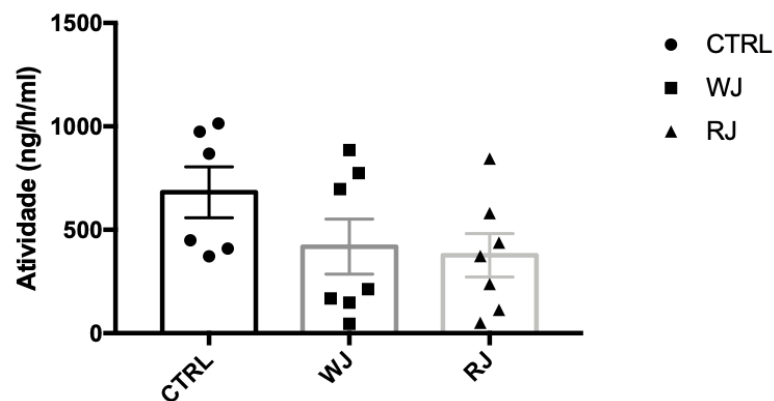


Figura 10 – Análise da atividade enzimática de HDACs entre amostras de extrato enzimático incubados com tampão (CTRL), geleia real (RJ) e geleia de operária (WJ). $n = 7$; Teste one-way ANOVA com pós-hoc de Tukey foi utilizado; $p < 0,05$ foi adotado como grau de significância. As barras representam o erro padrão da média e os símbolos indicam cada amostra avaliada.

Na figura 10 é possível observar que também não houve uma alteração estatisticamente significativa entre os grupos analisados, mas que existe uma tendência a diminuição da atividade em amostras que foram incubadas com geleia de operária e geleia real. Esse terceiro experimento mais uma vez corrobora que a atividade enzimática das HDACs possivelmente não é afetada apenas pelo fator quantidade de 10HDA ingerido. Para modulação da atividade enzimática em abelhas pode haver a ação de moléculas e mecanismos diferentes daqueles observados em células de mamíferos. Outro ponto a se

levar em conta é que apesar da diferença não ser estatisticamente significativa, o extrato nuclear quando colocado em contato direto com a geleia real e a geleia de operária teve uma tendência maior a diminuição da atividade enzimática com relação ao controle do que os grupos tratados por meio da alimentação. Esse resultado se mostra interessante, pois o 10HDA ingerido, independente de sua concentração pode não ter um efeito direto sobre as histonas desacetilases como era de se esperar. Esse resultado fica claro quando analisamos rainhas e operárias naturais que, apesar de naturalmente receberem alimentações distintas, não apresentaram alteração na atividade enzimática. Tal observação indica que o 10HDA tem efeito inibidor quando colocado diretamente em contato com células como foi feito por Spannhoff et al., 2011, mas em *in vivo* e no seu contexto biológico próprio, na diferenciação das castas, tal molécula parece alterar apenas a expressão de genes importantes, mas não tem ação direta sobre a atividade enzimática.

5.6 Anotação dos genes codificadores de HDACs em *Apis mellifera*

Nessa etapa do trabalho foi realizada uma re-anotação dos genes codificadores das quatro histona desacetilases presentes no genoma de *Apis mellifera* e uma comparação de suas características gênicas com genes codificadores de HDACs em outros dois insetos referenciados como modelo de estudos, *Drosophila melanogaster* e *Tribolium castaneum* (Tabela 3).

Tabela 3 – Anotação dos genes codificadores de HDACs de *Apis mellifera* e comparação com os respectivos ortólogos em *Drosophila melanogaster* e *Tribolium castaneum* referente ao número de aminoácidos (aa) e número de éxons. HGDB, Hymenoptera genome Database; NCBI-XM e NCBI-XP se referem às IDs dos respectivos genes e proteínas no GenBank.

GENE	<i>Apis mellifera</i>						<i>Drosophila melanogaster</i>			<i>Tribolium castaneum</i>		
	HGDB	NCBI - XM	NCBI - XP	Localização	Nº de aa	Nº Éxons	Identidade <i>A. mellifera</i>	Nº de aa	Nº Éxons	Identidade <i>A. mellifera</i>	Nº de aa	Nº Éxons
HDAC 1	GB53438	XM_394976.7	XP_394976.4	Group9:10,6 88,165- 10,691,404	492	9	88,46%	521	4	88%	490	5
HDAC 3	GB43894	XM_395811.6	XP_395811.2	Group8:6,62 5,271- 6,626,572	433	1	76,38%	438	3	84,24%	431	3
HDAC 4	GB43234	XM_391882.7	XP_391882.3	Group11:13, 857,219- 13,880,863	1094	16	55,02%	1269	13	67,89%	807	4
HDAC 6	GB42847	XM_026443068.1	XP_026298853.1	Group9:6,53 6,824- 6,544,817	1122	18	53,05%	1022	9	43%	816	12

Com essa análise foi possível observar que o gene codificador de HDACs em *A. mellifera* que apresenta maior identidade com os outros dois insetos é o gene codificador da HDAC 1, com 88% de similaridade na sequência nucleotídica. Com relação ao número de éxons e de aminoácidos existe uma maior diferença entre *A. mellifera* (9 éxons e 492 aa) e *D. melanogaster* (4 éxons e 521 aa), do que quando a comparação é feita com *T. castaneum* (5 éxons e 490 aa). O gene com menor similaridade foi o codificador da HDAC 6, com apenas 53% de similaridade entre *A. mellifera* (18 éxons e 1122 aa) e *D. melanogaster* (9 éxons e 1022 aa) e de 43% entre *A. mellifera* e *T. castaneum* (18 éxons e 816 aa). Foi possível notar que, mesmo tendo uma alta porcentagem de similaridade entre as espécies, os números de aminoácidos, e principalmente o número de éxons, pode variar consideravelmente, como é possível observar no caso da *HDAC 1*, que em *A.*

mellifera apresenta o maior número de éxons (9), quando comparado a *D. melanogaster* e *T. castaneum*, com 4 e 5 éxons respectivamente.

A intenção de fazer essa comparação foi avaliar principalmente a similaridade, já que, diferente de *A. mellifera*, a *D. melanogaster* não é considerada um bom modelo para estudos relacionados à epigenética do comportamento (Yan et al., 2014), por não apresentar enzimas responsáveis pela metilação do DNA (Raddatz et al., 2013). Já as abelhas melíferas são consideradas bons modelos para o estudo de mecanismos epigenéticos, tanto para metilação do DNA como acetilação de histonas, pela presença no genoma de uma maquinaria de enzimas quase completa para tais fins (Yan et al., 2014). Em *T. castaneum*, outra espécie muito utilizada como modelo para estudos do desenvolvimento, os estudos com relação a modificação de histonas e outras alterações epigenéticas, tais como a metilação do DNA ainda são escassos a sua maquinaria não é tão conhecida se comparado aos estudos dessa área com *A. mellifera*. Sobre essa espécie, se tem informação sobre a metilação do genoma em adultos (Zemach et al., 2010) e estudos recentes também com *T. castaneum* mostram que a enzima HDAC1 é capaz de suprimir a expressão de *kr-h1* afetando diretamente a ação do HJ nesses insetos (George, et al., 2019). Portanto, *T. castaneum* vem servindo de modelo para estudos nos últimos anos na área da epigenética assim como *A. mellifera* pois apresenta boa parte das enzimas necessárias para alterações epigenéticas.

6. CONCLUSÃO

Com relação ao perfil de expressão dos genes codificadores das 4 HDACs de *A. mellifera*, os dados mostraram que as castas rainha e operária apresentam um padrão de expressão muito parecido ao longo do desenvolvimento larval, e que as variações entre as castas são mais evidentes apenas ao final do estágio larval, próximo ao início da metamorfose, e assim bem após as decisões da diferenciação casta-específica dos tecidos.

Com relação as 4 HDACs notamos que o gene *HDAC 4* foi o mais expresso nas larvas de ambas as castas indicando que essa enzima poderá ter uma função importante durante o desenvolvimento.

Quando ao potencial papel do 10HDA os resultados permitem concluir que o mesmo influencia sobre os padrões de expressão dos genes codificadores de HDACs, principalmente *HDAC 4*, como também o *dnmt3* e o *Kr-h1*, sendo os dois primeiros muito importantes para a regulação epigenética e o terceiro um gene chave na via de resposta ao hormônio juvenil, que regula o desenvolvimento e a divisão de trabalho nas abelhas melíferas. Tal indica uma integração nas três vias de sinalização ao nível da expressão gênica.

No experimento da cultura de tecido ovariano pudemos observar que a exposição ao 10HDA teve a capacidade de alterar a expressão de genes chave na diferenciação entre as duas castas, tais como o *Tudor-SN*, *Incov-2*, *ILP-1* e *Egfr*. Além de afetar também a expressão genética da *dnmt3*.

Por fim, com relação a atividade enzimática pudemos concluir que não existe uma diferença na atividade entre larvas de rainhas e operárias criadas naturalmente na colônia e que o tratamento com 10HDA não foi capaz de alterar essa atividade. Tal resultado indica que o 10HDA em abelhas não tem como função principal a de inibidor de histona desacetilases, e desta forma não teria um efeito forte sobre o padrão epigenético das larvas. Possivelmente em abelhas esta molécula tem uma função diferente da observada e inferida para células de mamíferos.

7. REFERÊNCIAS

- Belles X, Santos CG (2014). 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.
- Bird A (2002). Epigenetic memory. *Genes Dev.* 16: 16–21.
- Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* 11: 213–221.
- Chintapalli VR, Wang J, Dow JAT (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat. Genet.* 39: 715-720.
- Colombani J, Raisin S, Pantalacci S, Radimerski T, Montagne J, Léopold P (2003). A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell* 114: 739–749.
- Colombani J, Bianchini L, Layalle S, Pondeville E, Dauphin-Villemant C, Antoniewski C, Carré C, Noselli S, Léopold P (2005). Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* 310: 667–670.
- Davie JR (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr.* 133: 2485S–2493S
- Dedej S, Hartfelder K, Aumeier P, Rosenkranz P, Engels W (1998). Caste determination is a sequential process: Effect of larval age at grafting on ovariole number, hindleg size, and cephalic volatiles in the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *J. Apic. Res.* 37: 183-190.
- De Ruijter AJM, Van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, Van Kuilenburg ABP (2003) Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370: 737–749.

- de Souza DA, Wang Y, Kaftanoglu O, De Jong D, Amdam GV, Gonçalves LS, Franco TM (2015). Morphometric identification of queens, workers and intermediates in *in vitro* reared honey bees (*Apis mellifera*). PLoS One 10: e0123663.
- Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA (2007). Histone deacetylase inhibitors: Overview and perspectives. Molecular Cancer Research 5: 981–989.
- Dokmanovic M, Marks PA (2005). Prospects: histone deacetylase inhibitors. J. Cell Biochem 96: 293-304.
- Dokmanovic M, Perez G, Xu W, Ngo L, Clarke C, Parmigiani RB, Marks PA (2007a). Histone deacetylase inhibitors selectively suppress expression of HDAC7. Mol Cancer Ther 6: 2525-2534.
- Drapeau MD, Albert S, Kucharski, R, Prusko C, Maleszka, R (2006). Evolution of the yellow/major royal jelly protein family and the emergence of social behaviour in honey bees. Genome Res 16: 1385-1394.
- Eberharter A, Becker PB (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. EMBO Rep 3: 224-229.
- Edgar BA (2006). How flies get their size: Genetics meets physiology. Nat. Rev. Genet. 7: 907–916.
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. Nat. Rev. Genet. 7: 21–33.
- Fell RD, Morse R (1984). Emergency queen cell production in the honey bee colony. Insectes Soc. 31: 221–237.
- Free JB (1980). A Organização Social das Abelhas (*Apis*). Editora Pedagógica e Universitária LTDA, São Paulo.

- George S, Gaddelapati SC, Palli SR (2019). Histone deacetylase 1 suppresses Krüppel homolog 1 gene expression and influences juvenile hormone action in *Tribolium castaneum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116: 17759–17764
- Guarente L, Kenyon C (2000). Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 408: 255-262.
- Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM, Marks PA (2004). Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21(WAF1) involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 1241–1246.
- Hartfelder K, Guidugli-Lazzarini KR, Cervoni MS, Santos DE, Humann FC (2015). Old threads make new tapestry — rewiring of signalling pathways underlies caste phenotypic plasticity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Adv. Insect Physiol.* 48: 1-36.
- Hartfelder K, Tibério GJ, Lago DC, Bitondi MMG (2017). The ovary and its genes—developmental processes underlying the establishment and function of a highly divergent reproductive system in the female castes of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 49: 49-70.
- Hartfelder K, Rachinsky A (1990). Corpora allata activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titre in honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). *J. Insect Physiol.* 36, 189–194.
- Hatch S, Tarpy D, Fletcher D. (1999) Worker regulation of emergency queen rearing in honey bee colonies and the resultant variation in queen quality. *Insectes Soc.* 46: 372–377.
- Haydak HM (1970). Honey bee nutrition. *Annu. Rev. Entomol.* 15: 143–156.
- Herceg Z (2007). Epigenetics and cancer: Towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis* 22: 91–103.

- Hietakangas V, Cohen SM (2009). Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu. Rev. Genet.* 43: 389–410.
- Holliday R, Pugh J (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187:226–232.
- Humann FC, Tiberio GJ, Hartfelder K (2013). Sequence and expression characteristics of long noncoding RNAs in honey bee caste development--potential novel regulators for transgressive ovary size. *PLoS One* 8: e78915.
- Hu YT, Wu TC, Yang EC, Wu PC, Lin PT, Wu YL (2017). Regulation of genes related to immune signaling and detoxification in *Apis mellifera* by an inhibitor of histone deacetylation. *Sci. Rep.* 7:41255.
- Hu YT, Tang CK, Wu CP, Wu PC, Yang EC, Tai CC, Wu YL (2018). Histone deacetylase inhibitor treatment restores memory-related gene expression and learning ability in neonicotinoid-treated *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* 27: 512-521.
- Jaenisch R, Bird A (2003). Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33: 245–254.
- Jeibmann A, Paulus W (2009). *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 10:407-440.
- Jin J, Cai Y, Li B, Conaway RC, Workman JL, Conaway JW, Kusch T (2005). In and out: Histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem. Sci.* 30: 680–687.
- Jindra M, Palli SR, Riddiford LM (2013). The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu. Rev. Entomol.* 58: 181–204.
- Johnson BR (2009). Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 64: 305-316.

- Johnston DS (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. Nat. Rev. Genet. 3: 176-178.
- Kaftanoglu O, Linksvayer TA, Page RE (2011). Rearing honey bees (*Apis mellifera* L.) *in vitro* I: Effects of sugar concentrations on survival and development. J. Insect Sci. 11: e96.
- Kamakura, M (2011). Royalactin induces queen differentiation in honeybees. Nature, 473: 478–483.
- Kapheim KM, Pan H, Li C, Salzberg SL, Puiu D, Magoc T, Robertson HM, Hudson ME, Venkat A, Fischman BJ, Hernandez A, Yandell M, Ence D, Holt C, Yocum GD, Kemp WP, Bosch J, Waterhouse RM, Zdobnov EM, Stolle E, Kraus FB, Helbing S, Moritz RF, Glastad KM, Hunt BG, Goodisman MA, Hauser F, Grimmelikhuijzen CJ, Pinheiro DG, Nunes FM, Soares MP, Tanaka ÉD, Simões ZL, Hartfelder K, Evans JD, Barribeau SM, Johnson RM, Massey JH, Southey BR, Hasselmann M, Hamacher D, Biewer M, Kent CF, Zayed A, Blatti C, Sinha S, Johnston JS, Hanrahan SJ, Kocher SD, Wang J, Robinson GE, Zhang G (2015). Genomic signatures of evolutionary transitions from solitary to group living. Science. 348:1139-1143.
- Koeniger G, Koeniger N, Fabritius M (1979). Some detailed observations of mating in the honeybee. Bee World 60: 53–57.
- Leimar O, Hartfelder K, Laubichler MD, Page RE (2012). Development and evolution of caste dimorphism in honeybees - a modeling approach. Ecol Evol. 2: 3098–3109.
- Linksvayer TA, Rueppell O, Siegel A, Kaftanoglu O, Page RE, Amdam GV (2009). The genetic basis of transgressive ovary size in honeybee workers. Genetics 183: 693–707.

- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
- Lourenço AP, Mackert A, Cristino AS, Simões ZLP (2008) Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* 39: 372–385.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251–260.
- Luger K, Richmond TJ (1998). DNA binding within the nucleosome core. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 33–40.
- Maleszka R (2008) Epigenetic integration of environmental and genomic signals in honey bees: The critical interplay of nutritional, brain and reproductive networks. *Epigenetics* 3: 188–192.
- Mannaerts I, Eysackers N, Onyema OO, van Beneden K, Valente S, Mai A, Odenthal M, van Grunsven LA (2013). Class II HDAC inhibition hampers hepatic stellate cell activation by induction of microRNA-29. *PLoS One* 8: e55786.
- Michelette de ERF and Soares AEE (1993). Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 24: 431–440.
- Mirth C, Truman JW, Riddiford LM (2005). The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 15: 1796–1807.
- Mukherjee K, Fischer R, Vilcinskas A. (2012). Histone acetylation mediates epigenetic regulation of transcriptional reprogramming in insects during metamorphosis, wounding and infection. *Front. Zool.* 9:25.

- Münch D, Amdam GV (2010) The curious case of aging plasticity in bees. *FEBS Letter* 584, 2496-2503.
- Oldham S, Hafen E (2003). Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: A *TOR de force* in growth control. *Trends Cell Biol.* 13: 79–85.
- Page Jr RE, Robinson GE (1991). The genetics of division of labour in honey bee colonies. *Adv. Insect Physiol.* 23: 117-169.
- Patel A, Fondrk MK, Kaftanoglu O, Emore C, Hunt G, Frederick K, Amdam GV (2007). The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. *PLoS One*, 2: e509.
- Rachinsky A, Hartfelder K (1991). Differential production of juvenile hormone and its desoxy precursor by corpora allata of honey bees during a critical of caste development. *Naturwissenschaften* 78, 270–272.
- Raddatz G, Guzzardo PM, Olova N, Fantappiè MR, Rampp M, Schaefer M, Reik W, Hannon GJ, Lyko F (2013). Dnmt2-dependent methylomes lack defined DNA methylation patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 8627–8631.
- Rembold H (1965). Biologically active substances in royal jelly. *Vitamins Hormones* 23: 359-382.
- Rembold H, Kremer JP, Ulrich GM (1980). Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L.. *Apidologie* 11:29–38.
- Ronai I, Oldroyd BP, Barton DA, Cabanes G, Lim J, Vergoz V (2016a). *Anarchy* is a molecular signature of worker sterility in the honey bee. *Mol. Biology and Evolution*, 33(1), 134–142. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv202>
- Ronai I, Oldroyd PB, Vergoz V. (2016b) The mechanistic, genetic, and evolutionary basis of worker sterility in the social Hymenoptera. *Adv. Insect Physiol.* 48: 251–317.

- Schlüns H, Moritz RFA, Neumann P, Kryger P, Koeniger G (2005). Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens. *Anim. Behav.* 70: 125-131.
- Schmidt Capella IC, Hartfelder K (1998). Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in castespecific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera L.*) ovary. *Journal of Insect Physiology* 44: 385–391.
- Snodgrass RE (1956). *Anatomy of the Honeybee*. Cornell University Press, Ithaca & London.
- Spannhoff A, KeeKim Y, Raynal NJM, Gharibyan V, Su MB, Zhou YY, Li J, Castellano S, Sbardella G, Issa JPJ, Bedford MT (2011). Histone deacetylase inhibitor activity in royal jelly might facilitate caste switching in bees. *EMBO Rep.* 12: 238-243.
- Sundström JF, Vaculova A, Smertenko AP, Savenkov E, Golovko A, Minina E, Tiwari BS, Rodriguez-Nieto S, Zamyatnin AA, Välineva T, Saarikettu J, Frilander MJ, Suarez MF, Zavialov A, Ståhl U, Hussey PJ, Silvennoinen O, Sundberg E, Zhivotovsky B, Bozhkov PV (2009). Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome. *Nat. Cell Biol.*, 11, 1347–1354.
- Vaissière T, Sawan C, Herceg Z, (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat. Res.* 659: 40–48.
- Visser WF, Van Roermund CWT, Waterham HR, Wanders RJA (2002). Identification of human PMP34 as a peroxisomal ATP transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299: 494–497.
- Wang WX, Tian LQ, Huang Q, Wu XB, Zeng ZJ (2014). Effects of 10-hydroxy-2-decenoic acid on the development of honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *J. Apic. Res.* 53: 171-176.

- Wang Y, Ma L, Zhang W, Cui X, Wang H, Xu B. (2016). Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 47: 48-56.
- Waterland RA, Jirtle RL (2004). Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 20: 63–68
- Wilson EO (1971). *The Insect Societies*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Winston ML (1987). *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Yan H, Simola DF, Bonasio R, Liebig J, Berger SL, Reinberg D (2014). Eusocial insects as emerging models for behavioural epigenetics. *Nat. Rev. Genet.* 15: 677–688.
- Yang XH, Yang SF, Wang RM (2017). Comparative proteomic analysis provides insight into 10-hydroxy-2-decenoic acid biosynthesis in honey bee workers. *Amino Acids* 49: 1177–119.
- Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D (2010). Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 328: 916–919.