

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MARINA CARVALHO PERUZZOLO

ANÁLISES TRANSCRICIONAIS DE GENES CANDIDATOS À DETERMINAÇÃO DE
CASTAS DE ABELHAS MELÍFERAS (*Apis mellifera* L.)

RIBEIRÃO PRETO - SP
2021

MARINA CARVALHO PERUZZOLO

ANÁLISES TRANSCRICIONAIS DE GENES CANDIDATOS À DETERMINAÇÃO DE
CASTAS DE ABELHAS MELÍFERAS (*Apis mellifera* L.)

TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF CANDIDATE GENES FOR HONEYBEE (*Apis
mellifera* L.) CASTE DETERMINATION

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Perto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências,
área de concentração em Biologia
Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder
Coorientador: Dr. Carlos Antônio M. Cardoso-Júnior

RIBEIRÃO PRETO - SP
2021

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

Peruzzolo, Marina Carvalho

Análises transcricionais de genes candidatos à determinação de castas de abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.)

Nº páginas: 53

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder

Coorientador: Dr. Carlos Antônio M. Cardoso-Júnior

Ribeirão Preto, 2021.

Versão Original.

1. *Apis mellifera*.
2. Diferenciação de castas.
3. Ovário.
4. Expressão gênica.
5. Morte celular programada.

Nome: PERUZZOLO, Marina Carvalho

Título: Análises transcricionais de genes candidatos à determinação de castas de abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.).

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 Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder

Aprovado em:

Banca Examinadora

Presidente: Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder

Instituição: FMRP - USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais e família. Obrigada por tudo que sempre fizeram por mim. Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Sou profundamente grata ao Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder pela oportunidade em fazer parte do seu grupo, pelas orientações e acima de tudo, por todos os ensinamentos compartilhados que ultrapassaram

Agradeço ao Dr. Carlos Antônio Mendes Cardoso Júnior por se fazer presente em todos os momentos em que precisei de ajuda, apoio e, até mesmo, de um “puxão de orelha”. Você foi essencial nessa caminhada, possibilitou que meu projeto tivesse um início, me deu forças durante e me deu suporte para finalizar mais essa etapa.

Aos meus colegas de laboratório, Douglas Elias Santos, Denyse Lago, Giovana Craveiro, Larissa Ribeiro e Matheus Scheffer, não sei muito bem se emito um agradecimento ou solicito um pedido de beatificação, tenho absoluta certeza de que a convivência comigo foi um grande desafio, risos. De qualquer forma, obrigada a todos por toda ajuda e aprendizado que compartilharam comigo. Em especial, Denyse e Giovana, obrigada por permitirem que minha presença em suas vidas extrapolasse qualquer barreira e transformasse nossa relação em uma maravilhosa amizade.

Ao técnico Anderson Roberto de Souza e a técnica Vera Lúcia Figueiredo pelas ajudas e convivências. Certamente obtive experiências distintas e enriquecedoras.

Não encontro maneira para demonstrar meu agradecimento ao Luiz Roberto Aguiar, técnico do Apiário Experimental do Departamento de Genética, que me auxiliou sempre que possível e tolerou meus infundáveis pedidos de material, me ajudando, inclusive, nos seus momentos de descanso nos finais de semana. Mais que um profissional, foi um grande amigo. Meu profundo e sincero muito obrigada!

Passar por essa fase foi um processo difícil, mas se tornou muito mais leve com a companhia das minhas amigas Daniele Grieco, Mariana Mamede, Giovana Craveiro, Denyse Lago, Vanessa Arfelli, Luisa Nora, Camila Gachet, Lays Trajano e Roberta Silveira. Não posso deixar de agradecer às minhas companheiras de apartamento e vida, Marcela Tavares Luiz e Tainá Keiller Leão, por todas as conversas e todas as risadas, nosso convívio foi muito especial, levarei vocês para sempre em meu coração.

Daniele Grieco e filhas, vocês têm minha eterna gratidão por tudo o que fizeram por mim. Vocês me acolheram no lar de vocês e fizeram com que eu me sentisse da família. Poder conviver com vocês e passar cada momento de descontração marcou minha vida de uma forma que não sei descrever, levo vocês no meu coração. *Arigatou gozaimasu!*

Meu amado companheiro, Willian Giordani, tenho uma imensa gratidão por ter você em minha vida, você sempre esteve ao meu lado e sempre me apoiou e me impulsionou, você me faz querer ser uma pessoa melhor a cada dia. Para mim você é um exemplo de dedicação e perseverança, sinto muito orgulho e alegria de poder compartilhar contigo não só nossas conquistas, mas toda minha vida. A caminhada se torna mais leve ao seu lado, muito obrigada por dividir a sua vida comigo.

Hoje, ainda que mestre, busco dentro de mim, até o mais profundo, forças para me tornar alguém melhor, é por eles, pelas pessoas mais fundamentais e maravilhosas que poderiam estar em minha vida, pelo meu querido irmão Henrique Carvalho Peruzzolo, pelos meus pais, Edna Maria de Oliveira Carvalho e Paulo Peruzzolo, e certamente por seus respectivos cônjuges, Eder Salgado e Marilene Borin, vocês me ofereceram o melhor de si, foram minha base e minha estrutura, estiveram sempre ao meu lado independente do que estivesse à frente, meu mais profundo desejo é que haja uma forma para que eu possa retribuir a vocês todo amor, carinho e todo suporte que nunca hesitaram em me dar. Palavras de gratidão são pouco perto de tudo o que merecem.

Muitas pessoas passaram pelo meu caminho, me deram a oportunidade de deixar minha marca e, com certeza, deixaram algo em mim. Me considero uma pessoa de muita sorte, pois em todos os momentos difíceis, e nos alegres também, sempre tive pessoas maravilhosas ao meu lado. Não é de dois anos que minha história se conta, esse é apenas um capítulo, muitas pessoas não foram citadas, mas gostaria que soubessem que se eu percorri minha trajetória até aqui, é porque encontrei vocês pelo caminho, muito obrigada a todos que um dia passaram por minha vida.

Por fim, agradeço ao imprescindível auxílio das agências de fomento, CAPES, CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio concedido através do processo n. 2019/07264-0.

RESUMO

PERUZZOLO, M. C. **Análises transcricionais de genes candidatos à determinação de castas de abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.)**. 2021. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021).

As abelhas *Apis mellifera* são caracterizadas, principalmente, por sua organização social avançada, na qual as rainhas, operárias e zangões são morfologicamente distintos e desempenham funções específicas na colmeia. A rainha e zangão são responsáveis pela reprodução, enquanto as operárias realizam as demais tarefas de manutenção da colônia e cuidado parental. Apesar de morfologicamente e funcionalmente distintas, rainhas e operárias não diferem geneticamente, sendo a qualidade da dieta fornecida à larva o principal estímulo que promove a diferenciação das suas características morfologicamente distintas. O polifenismo apresentado se deve, em parte, a fatores epigenéticos, como a metilação do DNA e RNAs não codificantes, que afetam e, em consequência, alteram a expressão de genes chave aos processos de diferenciação celular e morte celular programada. Uma das principais características morfológicas distinta entre as castas é o sistema reprodutor, as rainhas plenamente desenvolvem os seus ovários, enquanto os ovários das operárias passam por um processo de morte celular programada, garantindo assim o monopólio reprodutivo das rainhas. Com a proliferação celular dos ovários durante o estágio larval, as rainhas adultas chegam a possuir 200 ovariolos por ovário, apresentando a capacidade de colocar, aproximadamente, mil ovos por dia. Já as operárias, após o processo de morte celular nos ovários na fase larval, quando adultas possuem apenas entre 2 e 20 ovariolos por ovário, o qual é facultativamente inativo. O objetivo deste trabalho foi quantificar os níveis de transcritos de genes candidatos, especialmente epigenéticos, para o desenvolvimento ovariano casta-específico em larvas de rainhas e operárias. Os resultados obtidos mostraram que os níveis de transcritos dos genes *Incov1* e *Tudor-SN* nos ovários larvais de operárias coincidem com a fase expressiva da morte celular programada no estágio L5F3. Já os genes *Incov2* e *fringe* apresentaram picos de expressão na fase anterior (L5F1), mas com

direcionalidade oposta, sendo que *Incov2* é mais expresso em rainhas, e *fringe* em operárias. É importante enfatizar que a fase L5F1 marca bem o início da morte celular programada. Interessantemente, *Incov2* encontra-se hospedado em um intron de *fringe*, indicando assim que o lncRNA *Incov2* atua como repressor da sua expressão. A expressão do gene *Hdac4*, a histona desacetilase mais expressa em larvas de abelhas, não foi diferente entre rainhas e operárias, sugerindo que a expressão diferencial observada em amostras do corpo inteiro deve ser oriunda de células de outros tecidos cuja expressão é casta-específica, potencialmente o cérebro e/ou corpo gorduroso. Apesar de experimentos prévios indicarem que o *knockdown* da DNA metiltransferase 3 (DNMT3) resulta no desenvolvimento de ovários *queen-like*, o gene não se apresentou como diferencialmente expresso entre as castas, mas o gene *Hdac4* apresentou um pico de expressão marcante no início do quinto instar larval. Para outro gene, *Anarchy*, fator chave para esterilidade em operárias adultas, encontramos que sua expressão em larvas é maior nos ovários de operárias no estágio em que ocorre morte celular programada (L5F3). Também analisamos o gene *Krüppel-homolog 1 (Kr-h1)*, sendo este um fator de transcrição de resposta imediata ao hormônio juvenil, o qual apresenta importante papel no desenvolvimento das castas, promovendo a diferenciação dos ovários nas rainhas, observamos expressão significativa nos ovários de operárias na fase L5F3. Por fim, *Egfr*, outro gene de interesse quantificado, não apresentou expressão ovariana casta-específica. Com este trabalho identificamos genes potencialmente implicados no desenvolvimento diferencial dos ovários, fornecendo um conjunto de dados para futura validação funcional.

Palavras-chave: *Apis mellifera*. Diferenciação de castas. Ovário. Expressão gênica. Morte Celular Programada

ABSTRACT

PERUZZOLO, M. C. **Transcriptional analysis of candidate genes for honey bees (*Apis mellifera* L.) caste determination.** 2021. Dissertation (Master) – Ribeirão Preto Medical School. University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Apis mellifera bees are characterized by their advanced social organization, in which queens, workers and drones are morphologically distinct and perform specific functions in the hive. The queen and drone are responsible for reproduction, while the workers carry out the other tasks of colony maintenance, like brood care and foraging. Despite being morphologically and functionally distinct, queens and workers do not differ genetically, but it is the quality of the diet supplied to the larva that promotes the differentiation of their morphologically distinct characteristics. This polyphenism is due, in part, to epigenetic factors, such as DNA methylation and non-coding RNAs, which affect and, consequently, alter the expression of key genes in the processes of cell differentiation and programmed cell death. One of the main morphological characteristics that differs among the castes is the reproductive system: the queens fully develop their ovaries, while a programmed cell death process degrades most of the workers' ovaries during larval development, thus guaranteeing the queens' reproductive monopoly. With cell proliferation in the ovaries during the larval stage, the adult queens end up with up to 200 ovarioles per ovary, and they can lay approximately one thousand eggs per day. On the other hand, workers, after the process of cell death in the larval ovaries, have only between 2 and 20 ovarioles left per ovary, and these are facultatively inactive. The aim of this work was to quantify the transcript levels of candidate genes, especially ones encoding epigenetic factors, during the caste-specific ovarian development in queen and worker larvae. The results showed that the transcript levels of the genes *Incov1* and *Tudor-SN* in the larval ovaries of workers coincide with expressive programmed cell death at the L5F3 stage. The *Incov2* and *fringe* genes showed statistically significant expression peaks in the L5F1 stage, which marks the beginning of programmed cell death. However, these genes are expressed with opposite directionality: while *Incov2* expression was higher in queens, *fringe* was significantly higher in workers. Interestingly, *Incov2* is hosted in an intron of *fringe*, indicating a possible repressor action of this lncRNA on *fringe*. The expression of the *Hdac4* gene, the most expressed histone deacetylase in bee larvae, was not different between queens and workers, suggesting that the differential expression observed in whole body samples is likely due to other tissues, whose expression is caste-specific, potentially the brain and/or fat body. Although previous experiments indicated that the knockdown of the DNA methyltransferase 3 (DNMT3) results in the development of queen-like ovaries, the gene was not differentially expressed in the larval ovaries, but like *Hdac4* it showed a marked expression peak in the early fifth larval instar. For another gene, *Anarchy*, which is a key factor for sterility

in adult workers, we found that its expression is higher in the ovaries of worker larvae at the stage of programmed cell death (L5F3). In addition to these genes, we also analyzed the *Krüppel-homolog 1 (Kr-h1)* gene, a transcription factor in the immediate response to juvenile hormone, which plays an important role in caste development, promoting differentiation of ovaries into queens. For *Kr-h1* we observed significant expression in the ovaries of workers in the L5F3 stage. Finally, *Egfr*, another gene of interest, did not show caste-specific ovarian expression. With this work we identified genes that are potentially involved in the differential development of the ovaries, providing a set of data for future functional validation.

Keywords: *Apis mellifera*. Caste differentiation. Ovary. Gene expression. Programmed cell death.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos indivíduos de *Apis mellifera*.

Figura 2. Ciclo do desenvolvimento larval das castas de *Apis mellifera*.

Figura 3. Desenvolvimento larval e funções diferencial entre as castas rainha e operárias.

Figura 4. Representação do aparelho reprodutivo da rainha e das operárias.

Figura 5. Expressão relativa dos genes *Tudor* e *Incov1* na diferenciação e desenvolvimento ovariano em *Apis mellifera*.

Figura 6. Expressão relativa dos genes *Incov2* e *fringe* na diferenciação e desenvolvimento ovariano em *Apis mellifera*.

Figura 7. Expressão relativa do gene *Dnmt3* na diferenciação e desenvolvimento ovariano em *Apis mellifera*.

Figura 8. Expressão relativa do gene *Hdac4* na diferenciação e desenvolvimento ovariano em *Apis mellifera*.

Figura 9. Expressão relativa do gene *Egfr* na diferenciação e desenvolvimento ovariano em *Apis mellifera*.

Figura 10. Expressão relativa do gene *Anarchy* na diferenciação e desenvolvimento ovariano em *Apis mellifera*.

Figura 11. Expressão relativa do gene *Kr-h1* na diferenciação e desenvolvimento ovariano em *Apis mellifera*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos estágios larvais durante o desenvolvimento de rainhas e operárias de *A. mellifera*.

Tabela 2 – *Primers* utilizados no ensaio de RT-qPCR. Em negrito os genes endógenos utilizados para normalização. As linhas tracejadas representam ausência de informação.

LISTA DE ABREVIACÕES

cDNA	DNA complementar
DNA	cido desoxirribonucleico
DNMT3	DNA metiltransferase 3
EDTA	cido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidermal
HDAC4	Histona desacetilase 4
HJ	Hormônio juvenil
<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 – confecção de casulo 1
L5S2	Estágio larval 5 – confecção de casulo 2
L5S3	Estágio larval 5 – confecção de casulo 3
<i>Mfe</i>	Metil farnesoato epoxidase
N	Número amostral
PBS	Tampão fosfato salino
QTL	Quantitative Trait Loci
RNA	cido ribonucleico
RpL32	Proteína ribossomal 32
RT-qPCR	PCR quantitativa de transcrição reversa em tempo real
Vg	Vitelogenina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Abelhas melíferas (<i>Apis mellifera</i> L.).....	15
1.2	Morte celular e hormônio juvenil	19
1.3	Genes candidatos.....	22
1.4	Fatores epigenéticos atuando na expressão diferencial de genes casta-específicos.....	24
2	HIPÓTESE	27
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivo específico	27
4	METODOLOGIA	28
4.1	Material biológico.....	28
4.2	Extração de RNA e síntese do cDNA.....	28
4.3	Quantificação por RT-qPCR	30
4.4	Análises estatísticas	30
5	RESULTADOS.....	32
5.1	Perfil de expressão dos genes analisados em ovários larvais de rainhas e operárias	32
6	DISCUSSÃO	40
7	CONCLUSÃO	44
8	REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.)

A eussocialidade representa um alto nível de organização social entre os animais, marcada pela divisão de trabalho reprodutivo (Wilson, 1971). Pode ser definida pela existência de uma comunidade onde os indivíduos apresentam cuidado parental, sobreposição de gerações e divisão de trabalho (Michener, 1974). Os insetos eussociais compartilham destas características, onde os indivíduos realizam tarefas especializadas conforme suas castas (Gullan & Cranston, 1994). A socialidade nos insetos representa uma transição evolutiva bastante expressiva, que ocorreu de forma independentemente em abelhas, vespas, formigas e nos cupins. O ápice da eussocialidade é marcado pela presença da distinção morfológica e fisiológica entre as castas de fêmeas nas espécies altamente eussociais (Korb & Heinze, 2016). A alta interdependência das duas castas femininas, rainha e operária, representa um ponto evolutivo de “não retorno”, o qual impede que ocorra uma reversão para o modo de vida solitário (Wilson & Hölldobler, 2005; Boomsma & Gawne, 2018). A eussocialidade de insetos sociais sempre intrigou biólogos e pesquisadores, incluindo o mais famoso deles, Charles Darwin. Darwin reconheceu que estes insetos são o maior desafio de sua teoria evolutiva, devido a perpetuação estável de indivíduos inférteis (operárias) ao longo de gerações.

Ecologicamente e economicamente poucos grupos de insetos são tão importantes para a humanidade quanto os himenópteros. As abelhas fornecem serviços vitais à manutenção dos ecossistemas: a polinização, tanto em ambientes naturais quanto controlados (Gallai *et al.* 2009), enquanto outras espécies de himenópteros ajudam no controle de populações de insetos fitófagos (Tscharnkte *et al.* 2007), podendo ser agentes de controle de pragas para cultivares (Bale *et al.* 2008).

O nosso modelo de estudo, *Apis mellifera*, é uma espécie altamente eussocial. Dada sua importância econômica na polinização e produção do mel, *A. mellifera* é a espécie do gênero *Apis* mais predominante no mundo, como também, é a espécie que apresenta a segunda maior distribuição pelo globo (Free, 1980). É encontrada em todos os continentes, exceto na Antártida. Além de serem amplamente

empregadas no meio agrícola como produtores de mel, polinizadoras, atuarem como biocontrole em diversos ecossistemas, se tornaram também um modelo de estudo para as mais diversas áreas da Biologia, a importância da *Apis mellifera* transcende sua diversidade e ampla distribuição geográfica, perpassando por comportamentos fascinantes e processo celulares de plasticidade fenotípica extrema.

Uma das características mais interessantes da espécie é a organização social que apresentam. Por exemplo, vivem em colônias organizadas, compostas por três tipos distintos de indivíduos (Fig. 1), duas castas fêmeas, a rainha e as operárias, as quais são geradas a partir de ovos fertilizados (diploides – $2n$). Enquanto os zangões, indivíduos que representam o sexo masculino, são originados de ovos não fertilizados (haploides – n).

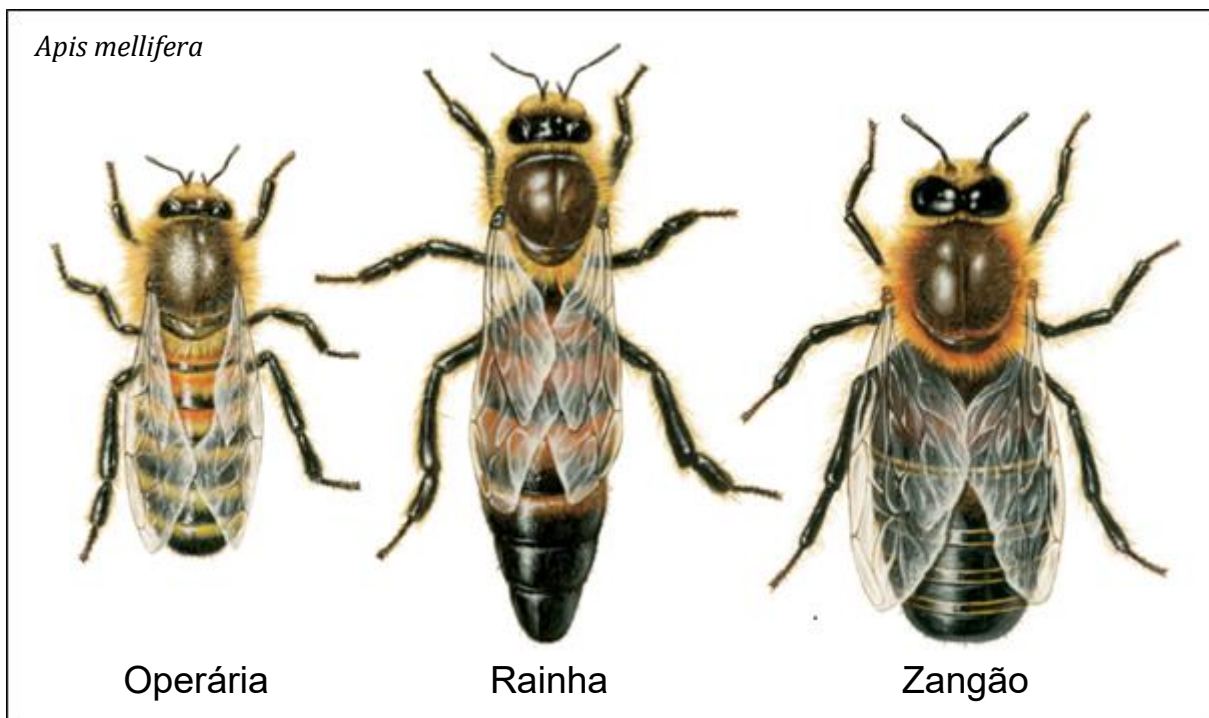


Figura 1. Representação dos indivíduos presentes em uma colônia de abelhas *Apis mellifera*. (Imagem de: <https://www.britannica.com/animal/honeybee>). Da esquerda para direita, é mostrado a operária, a rainha e o macho.

As operárias, consideradas organismos facultativamente estéreis ou subférteis, são responsáveis por realizar as atividades de trabalho, como manutenção da colônia, construção de favos, alimentação da cria e rainha, atuam como guardas da colmeia, entre outras funções. Ademais, as funções desempenhadas pelas operárias na colônia acabam por ser divididas de acordo com sua idade, sendo este

processo denominado por polietismo etário ou maturação comportamental (Winston, 1987; Page Jr e Robinson, 1991). A rainha e os zangões possuem por principal função a reprodução. Os zangões morrem imediatamente após a cópula. Já uma rainha jovem acasala com diversos zangões em um evento chamado voo nupcial (Koeniger *et al.*, 1979; Schlüns *et al.*, 2005). Após o voo nupcial a rainha retorna à colmeia e começa a produzir ovos, principalmente ovos fertilizados que darão origem às operárias (Winston, 1987). Sendo que nesta fase, ela pode colocar mais que mil ovos por dia. As rainhas não se acasalarão mais, como também, não sairão mais da colmeia, exceto quando realizarem a divisão da colônia por enxameagem, processo este denominado “reprodução social” (Winston, 1987).

As diferenças entre as castas são nítidas na fase adulta, marcadamente distinta quanto à morfologia, fisiologia, longevidade e comportamento (Page e Peng, 2001). Os dois fenótipos do sexo feminino, apesar de morfologicamente e funcionalmente diferentes, não apresentam diferenças genotípicas. Assim sendo, um ovo fertilizado, portanto diploide, possui o potencial de alternativamente originar tanto uma rainha, quanto uma operária. O fenótipo casta-específico é definido pela nutrição diferencial das larvas. Uma larva de rainha recebe grandes quantidades de geleia real, uma secreção alimentar rica em lipídeos e carboidratos produzida pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares das operárias nutridoras (Rembold, 1965; Drapeau *et al.*, 2006). Enquanto as operárias recebem uma secreção similar à geleia real apenas durante os três primeiros instares larvais, a partir do 4º instar larval em diante essas larvas recebem uma denominada uma dieta mista, de secreções glandulares das operárias misturadas com mel e pólen (Haydak, 1970). As rainhas e as operárias apresentam diversas diferenças estruturais adaptadas à execução de suas funções na colônia. Entretanto, além da diferença na capacidade reprodutiva, diferença mais marcante entre as castas, as rainhas e operárias também diferem em termos de sua longevidade, sendo que o tempo da vida adulta de uma rainha pode ser até 10-20 vezes maior que de uma operária.

As abelhas *Apis mellifera* são insetos holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose completa, passando pelos estágios de embrião, larva, pupa e, por fim, adultos. O desenvolvimento larval desta abelha consiste em cinco estágios (*instars*): L1, L2, L3, L4 e L5, sendo este último subdividido nas fases de alimentação (*feeding*) L5F1, L5F2, L5F3, de tecelagem de casulo (*spinning*) L5S1, L5S2 e L5S3 e da prepupa PP1, PP2 e PP3, seguida da muda pupal. O polimorfismo de castas é

proveniente de um elevado grau de plasticidade de desenvolvimento em resposta ao tipo de alimentação recebida durante o período larval, sendo que, referente ao desenvolvimento dos ovários, inicia-se um programa de morte celular nas larvas de operárias a partir das fases L5F1, L5F2 e principalmente L5F3. Até o estágio L4, ambas as castas apresentam o mesmo perfil temporal de desenvolvimento, se diferenciando apenas a partir do quinto estágio larval (Fig. 2). Ao fim do desenvolvimento, as rainhas emergem de suas células de cria após 16 dias contado a partir da oviposição, já as operárias, passam por um tempo de desenvolvimento maior, totalizando 22 dias (Rembold, 1987; Nunes-Silva *et al.*, 2006) (Fig. 3).

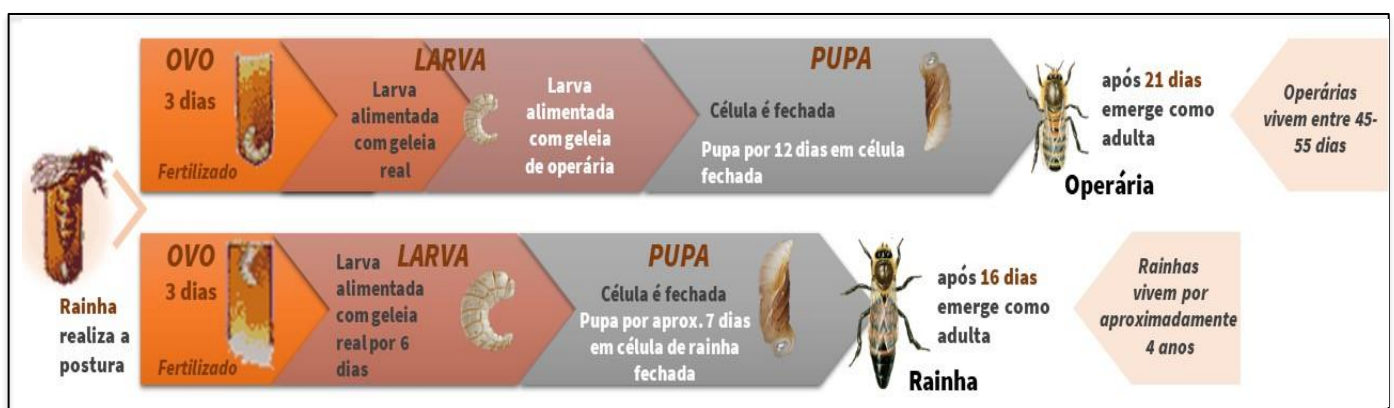


Figura 2. Ciclo de desenvolvimento larval das abelhas, desde o momento em que é colocado os ovos até a emergência como adulta. (Imagem, rainha/operária, de: <https://www.britannica.com/animal/honeybee>).

Na divisão de trabalho apresentada entre as castas, um aspecto importante é a sobreposição de gerações na colônia (Wilson, 1971), após a origem da colônia, a rainha, geralmente única em uma colônia, é mãe de todas as operárias e das gerações subsequentes das operárias que cuidam da prole desta única rainha. Assim, em uma colônia de *A. mellifera* ocorrem basicamente dois modos de divisão de trabalho, dentro da casta de operárias, dependente da idade, o polietismo etário, e aquele referente à reprodução, o qual ocorre entre as castas femininas, rainha e operárias, as quais foram diferencialmente alimentadas durante a fase larval e, como consequência, diferenciaram-se em suas morfologia e fisiologia (Johnson, 2009).



Figura 3. *Apis mellifera*, modelo de estudo de plasticidade fenotípica. A partir de uma larva indiferenciada e bipotente, rainhas e operárias se desenvolvem em decorrência da alimentação diferencial, o programa de desenvolvimento entre as castas é distinto em dias. (Imagem, rainha/operária, de: <https://www.britannica.com/animal/honeybee>).

Dessa forma, *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. Além disso, abelhas melíferas têm sido consideradas um excelente modelo para estudos epigenéticos, uma vez que seu genoma codifica um conjunto completo de enzimas necessárias às modificações epigenéticas que ocorrem no DNA e histonas, tais como DNA metiltransferases, histonas acetil transferases e histonas desacetilases (Wang *et al.*, 2006; Dickman *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014)

1.2 Morte celular e hormônio juvenil

Apesar da maioria das células estarem destinadas, em algum momento, à morte, vários são os fatores exógenos que podem interferir no destino e desencadear na morte celular programada (MCP). Alguns fatores como hormônios, citocinas, interleucinas, entre outros, são capazes de acarretar a MCP (Arends e Wyllie, 1991). Durante a apoptose, que é uma forma de MCP, o DNA é clivado pela ativação de endonucleases, preferencialmente em sítios internucleossômicos, deixando

terminações livres (Wyllie *et al.*, 1980). Enquanto as manifestações estruturais são: redução do volume celular, perda de regiões especializadas da membrana plasmática, como as microvilosidades, há a conservação da maioria das organelas citoplasmáticas, ocorre a condensação progressiva da cromatina perinuclear, bem como a liberação de sinais que causam engolfamento por fagócitos adjacentes (Kerr, 1971; Arends e Wyllie, 1991).

A MCP é um componente da regulação do desenvolvimento e do investimento reprodutivo em diferentes organismos (Baum *et al.* 2005). Pode ser definida por mecanismos específicos como presença ou ausência de fatores de crescimento, diferenças nos títulos hormonais circulantes, estes podem suprimir ou ativar a morte celular programada (Dai e Gilbert, 1998; Fujiwara e Ogai, 2001). A morte celular apoptótica envolve ativadores, efetores e reguladores negativos em uma cascata de eventos (Barinaga, 1998), como conhecido por ocorrer durante a metamorfose dos insetos. Em um contexto evolutivo, a MCP foi integrada no processo de desenvolvimento diferencial dos ovários no dimorfismo de castas em abelhas (Hartfelder e Steinbrück, 1997; Reginato e Cruz-Landim, 2001).

A diferença de alimentação ministrada às larvas de *A. mellifera* acarretará na ativação diferencial de vias de sensoriamento nutricional e vias endócrinas, especificamente na produção e síntese diferencial do hormônio juvenil (HJ), com o resultado que em rainhas a concentrações de HJ na hemolinfa são bem mais altas que em larvas operárias (Rembold, 1980; Rachinsky *et al.*, 1990). O HJ é produzido nas *corpora allata* (CA), um par de glândulas localizado no complexo retro-cerebral, a qual responde a estímulos advindos do sistema nervoso central (Gilbert *et al.*, 2000) e é secretado na hemolinfa. Os padrões de desenvolvimento embrionário e pós-embrionário são controlados, em parte, pelos níveis de HJ, o qual desencadeia cascatas regulatórias para ativação ou repressão de genes efetores.

O HJ se mostrou funcionalmente importante na prevenção da MCP nos ovários de rainhas (Schmidt Capella e Hartfelder, 1998, 2002). Tal ocorre em um momento crítico do desenvolvimento dos ovários larvais, quando são formados os *clusters* de células germinativas com polifusoma (organelas citoplasmáticas que conferem ao cisto germinativo a conformação de uma roseta com um polifusoma central) (Gottanka e Büning, 1993). Estas são formadas e permanecem presentes em todos os ovariolos nos ovários das futuras rainhas, enquanto nos ovários larvais das operárias a maioria

dos ovaríolos apresentará fortes sinais de MCP nestas células germinativas (Hartfelder e Steinbrück, 1997; Reginato e Da Cruz-Landim, 2002).

Neste sentido, o aumento dos níveis de HJ em larvas de rainhas irão permitir que ocorra o desenvolvimento pleno de seus ovários, desenvolvendo entre 150-200 ovaríolos (Leimar *et al.*, 2012). Já nas abelhas operárias, os níveis de HJ são mais baixos devido a sua dieta, dessa forma a MCP não será impedida e serão degradados mais de 90% dos ovaríolos, unidades funcionais seriais que compõem os ovários dos insetos, resultando em apenas 2-20 ovaríolos por ovário (Snodgrass, 1956; Rachinsky *et al.*, 1990; Schmidt Capella e Hartfelder, 1998, 2002; Leimar *et al.*, 2012; Hartfelder *et al.*, 2017) (Fig.4). Diferentemente das operárias, observa-se durante os estágios larvais das rainhas níveis elevadíssimos de hormônio juvenil (Rembold, 1987; Rachinsky *et al.*, 1990).

Ainda não se sabe ao certo como o HJ inibe a MCP nos ovários de rainhas, ativando genes feminilizantes *downstream*. No entanto, um possível candidato que pode fornecer pistas ao modo operante do HJ é o *Krüppel-homolog1 (Kr-h1)*, gene de resposta imediata ao HJ (Lozano e Belles, 2011; Jindra *et al.*, 2013; Belles e Santos, 2014; Truman, 2019). O gene *Kr-h1* codifica um membro da família do fator de transcrição *zinc finger*, e diversos membros desta família possuem funções na morfogênese neural e na regulação da expressão gênica em resposta a ecdisteróides (Shi *et al.*, 2007; Grozinger e Robinson, 2007). Para tanto, um gene explorado nesta pesquisa foi o *Kr-h1*.

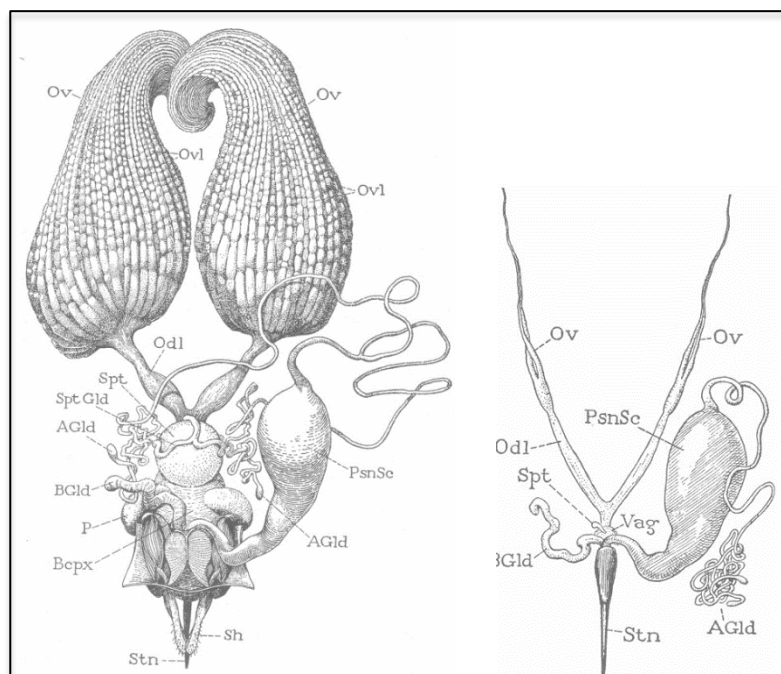


Figura 4. Aparelho reprodutor das rainhas adultas (esquerda) e das operárias adultas (direita) de *Apis mellifera*. Ov – ovário; Ovl - ovaríolo. (Snodgrass, 1956).

1.3 Genes candidatos

Selecionamos neste trabalho alguns genes candidatos potencialmente envolvidos na diferenciação casta-específica dos ovários para quantificação da sua expressão ao longo do desenvolvimento ovariano nas larvas de ambas as castas.

Em trabalhos anteriores, nosso grupo realizou, por meio da construção de bibliotecas supressivas subtrativas (Representational Difference Analysis - RDA), um *screening* para genes diferencialmente representados em ovários de larvas de rainhas vs. ovários de larvas de operárias (Humann e Hartfelder, 2011). Nesse trabalho identificou-se dois genes de lncRNAs, *Incov1* e *Incov2* (*long noncoding ovary-1* e *2*, respectivamente). Os dois lncRNAs apresentaram um padrão de expressão oposto, sendo que o *Incov1* foi encontrado mais expresso no contexto de morte celular autofágica nos ovários das larvas de operárias, enquanto o *Incov2* se mostrou mais expresso nos ovários de larvas de rainhas. O mapeamento dos dois lncRNAs no genoma da *A. mellífera* mostrou que os dois estão localizados no cromossomo 11 (Humann *et al.*, 2013), em um QTL previamente associado à variação no número de ovariolos de operárias abelhas melífera adultas (Linksvayer *et al.*, 2009). Assim, a identificação de dois lncRNAs abriu uma pista interessante para a compreensão das bases moleculares que atuam na MCP dos ovários da *A. mellífera*.

Os RNAs longos não-codificantes (lncRNAs) são uma classe de RNAs poliadenilados definidos pela falta de um potencial codificante de proteínas e por seus tamanhos moleculares (>200 nt). Os mesmos têm recebido atenção a partir da última década devido à expansão das tecnologias de sequenciamento de nova geração, superando inclusive, o número de genes codificadores de proteínas (Mattick, 2011). Funcionalmente, muitos lncRNAs são associados com o silenciamento da transcrição gênica, seja diretamente ou através da modificação da cromatina, mudanças na arquitetura cromossômica, controlando o *splicing* alternativo de pré-mRNAs, ou realizando a degradação de proteínas. Em alguns casos, os lncRNAs interagem com proteínas e/ou com o DNA criando ou modificando estruturas e ajustando a atividade celular (Guttman e Rinn, 2012; Ulveling *et al.*, 2011). Alguns exemplos são citados por Wilusz (2009), onde o simples fato da transcrição de ncRNAs é suficiente para regular a expressão de genes codificadores de proteínas próximos, atuando assim como chaves reguladoras com alvos específicos em paradigmas funcionais.

De acordo com Chen *et al.* (2017), lncRNAs e outros ncRNAs de menor tamanho estão diferencialmente expressos na ativação e regulação da oviposição em

Apis mellifera, mas para a maioria destes lncRNAs falta informação referente às suas funções. Assim, utilizando o *Incov1* como modelo, foi realizado um experimento de *pulldown* com *Incov1*, seguido de espectrometria de massas para identificação de proteínas que interagem diretamente com o *Incov1*. Tal experimento evidenciou a proteína Tudor-SN como principal fator de interação (manuscrito em preparação). O gene *Tudor-SN*, por exemplo, codifica uma proteína que é clivada pela Caspase 3 durante o processo de apoptose, e está diretamente relacionado com a esterilidade em *Drosophila melanogaster* (Boswell & Mahowald, 1985; Sundström *et al.*, 2009; Ying & Chen, 2012).

Comparado ao *Incov1*, o *Incov2* é bem menos estudado, mas o sequenciamento do produto 3'5 RACE e a análise *Southern blot* mostraram uma sequência de 684 pb, e análises computacionais revelaram baixa probabilidade codificadora na sequência de *Incov2*. O mapeamento genômico revelou que o transcrito *Incov2* é derivado de dois éxons, um primeiro, de apenas 41 pb, e um segundo maior, de 643 pb. O gene *Incov2* é uma sequência intrônica do gene *fringe* (GB17604) (Humann *et al.*, 2013). O homólogo em vertebrados, *lunatic fringe*, está envolvido em mecanismos como desenvolvimento dos olhos, formação da câmara de ovos e vários outros processos, funções essas exercidas por meio da regulação da sinalização da via Notch, a qual realiza papel essencial no desenvolvimento dos metazoários, onde defeitos no mecanismo desta via acarretará desordens no desenvolvimento dos organismos (Kopan e Ilagan, 2009; Masek e Andersson, 2017). Em abelhas melífera, Notch regula a ativação dos ovários de operárias adultas (Duncan *et al.*, 2016). Dado seu potencial regulatório casta-específico, tanto o *Incov2*, como o gene *fringe*, são alvos de interesse das nossas análises de expressão gênica nos ovários das larvas das duas castas

Poucos são os genes conhecidos por influenciar na ativação do ovário de operárias adultas. O gene *Anarchy*, no entanto, é um deles. *Anarchy* foi identificado em um *screening* gênico buscando entender melhor o fenótipo mutante de algumas colônias localizadas na Austrália cujas operárias ativaram seus ovários mesmo na presença da rainha. Este fenótipo mutante, sendo caracterizado como uma reação anarquista, determinou então o nome deste gene (Oldroyd *et al.*, 1994; Oldroyd e Ratnieks, 2000; Barron *et al.*, 2001; Ronai *et al.*, 2015). *Anarchy* pertence à uma família de proteínas transportadoras de soluto mitocondrial (Palmieri, 2013), na qual os membros estão envolvidos em processos de MCP (Gutiérrez-Aguilar e Baines,

2013). Considerando que análises da expressão de *Anarchy* em ovários larvais de rainhas e operárias possam fornecer pistas quanto ao seu possível papel durante a diferenciação de castas, incluímos *Anarchy* em nossas análises.

No que tange o aspecto da diferenciação, a alimentação apresenta papel fundamental no desenvolvimento das castas, a geleia real, composta por diversos elementos, entre eles carboidratos, vitaminas, lipídios, entre outros, os quais são caracterizados como *major royal jelly proteins* (MRJPs) ou proteínas principais da geleia real. Uma das MRJP, identificada como royalactina, foi considerada determinante para induzir os processos de desenvolvimento para gerar uma abelha rainha (Kamakura, 2011). A via EGFR é apontada como uma das vias atuantes na tradução destes estímulos nutricionais que sinalizam para crescimento e diferenciação celular (Hartfelder *et al.*, 2015), dados que receberam suporte pelo knockdown do gene (*Egfr*). Os resultados apresentados por Kamakura (2011), que realizou o *knockdown* via RNAi do gene codificador do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), indicaram um papel importante da via de sinalização EGFR no desenvolvimento das castas de abelhas melíferas, apontando que o enriquecimento da geleia real com royalactina teria um potencial sinalizador à determinação das castas atuando através da sinalização via EGFR. No entanto, ainda é controverso se este gene participa ou não da determinação de castas, uma vez que Hartfelder *et al.* (2015) observaram que a expressão relativa de gene *Egfr* é maior nas larvas de operárias do que nas larvas de rainhas, contrário portanto do hipotetizado. Ademais, Kamakura (2011) propôs que a ativação de *Egfr* se daria pela metilação diferencial de seu promotor, o que foi mostrado posteriormente como improvável, uma vez que esse gene não se encontra metilado (Kucharski *et al.*, 2015). Ao encontrar problemas na reprodutibilidade dos dados publicados por Kamakura (2011), Buttstedt *et al.*, (2016) e Maleszka, (2018) consideraram necessário que fossem gerados dados complementares que esclareçam o envolvimento de royalactina e da via EGFR nos processos regulatórios de plasticidade fenotípica em abelhas melíferas.

1.4 Fatores epigenéticos atuando na expressão diferencial de genes casta-específicos

O DNA é uma estrutura encontrada em dois estados fisiológicos, eucromatina e heterocromatina. Os fatores de transcrição interagem com sítios de reconhecimento em regiões específicas regulatórias, e a maquinaria de transcrição é montada através

de processos regulatórios capazes de modular a acessibilidade da cromatina a fatores reguladores, como fatores de transcrição. É amplamente aceito que as interações gene-ambiente são influenciadas por configurações epigenômicas, em particular por modificações reversíveis no DNA, seja por meio de processos de metilação/desmetilação de DNA, e na cromatina por meio de modificações pós-traducionais (MPT) reversíveis de histonas (Feil e Fragga, 2012).

Os processos regulatórios são importantes para a diferenciação celular, desenvolvimento, proteção contra genomas exógenos (por exemplo, os virais) e são considerados fatores críticos também para a integração entre sinais endógenos e ambientais durante a vida dos organismos (Jaenisch e Bird, 2003; Feinberg *et al.*, 2006; Herceg, 2007). Assim, dentro do contexto da diferenciação morfológica das castas nas abelhas, os sinais hormonais podem ainda alterar os padrões de expressão de genes casta-específicos, os quais, possivelmente são resultado de uma ampla alteração epigenética no genoma (Kucharski *et al.*, 2008), ou ativação/inibição gênica via fatores de transcrição ou RNA reguladores (Corona *et al.*, 1999; Barchuk *et al.*, 2007).

Assim, ao serem fortemente influenciados por fatores ambientais, os fatores epigenéticos, que controlam a acessibilidade da cromatina, possuem, implicitamente, influência direta sobre a ação dos fatores transcricionais (Waterland e Jirtle, 2004). Neste contexto, a alimentação diferencial que leva à diferenciação das castas em insetos sociais representa um excelente exemplo de como a modulação epigenética pode atuar na plasticidade fenotípica. Dessa maneira, um gene importante na diferenciação das castas em *A. mellifera* é o DNA metiltransferase 3 (DNMT3). Após evidenciar a presença de um sistema completo de metilação do DNA em abelhas melíferas (Wang *et al.*, 2006), um experimento que avaliou os efeitos morfológicos do *knockdown* do *Dnmt3*, observou o desenvolvimento do ovário de modo semelhante aos de rainhas, com aumento inclusive dos *corpora allata* (Kucharski *et al.*, 2008). Estudos subsequentes, comparando metilomas de larvas e adultos de rainhas e operárias demonstraram padrões diferenciais de metilação do DNA de alguns genes, principalmente daqueles envolvidos em funções metabólicas casta-específica (Lyko *et al.*, 2010; Foret *et al.*, 2011). No entanto, dados recentes produzidos pelo nosso grupo mostram que a metilação do DNA não atua regulando a transcrição de genes em abelhas adultas jovens (Cardoso-Junior *et al.*, 2021), indicando que ainda não está claro como a metilação do DNA é promovida e qual seria o seu papel na

determinação de casta. Assim, a compreensão sobre o possível envolvimento da DNMT3 no processo de MCP nos ovários se faz de suma importância para auxiliar o entendimento de tal mecanismo.

Comparado com a metilação do DNA, menos ainda se sabe sobre uma eventual conexão entre a alimentação diferencial das larvas e a modificações de histonas. O sequenciamento do genoma das abelhas revelou que as mesmas possuem um conjunto de genes da maquinaria modificadoras de cromatina similar a dos humanos (Honeybee Genome Consortium, 2006; Lyko *et al.*, 2010). Por outro lado, um mecanismo direto de interação entre processos epigenéticos de metilação do DNA e modificações pós-transcricionais de histonas já é bem estabelecido em outros organismos (Jackson *et al.*, 2002; Fuks *et al.*, 2003; Cedar e Bergman, 2009; Lockett *et al.*, 2010).

Neste contexto, ao se tratar de componentes específicos da geleia real e as respostas divergentes em diversas vias de sinalização e fatores epigenéticos resultantes da alimentação diferencial, um fator interessante é um ácido graxo encontrado em predominantes quantidades na geleia real, o 10 hidróxi-2-decenóico (10HDA). Este tem chamado muita atenção por ter sido sugerido como inibidor de histona desacetilases (HDAC) em 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 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. Os genes envolvidos nesse mecanismo, codificadores das HDACs dos grupos I e IIa, foram alvos de estudos em nosso laboratório, onde se mostrou que o gene *Hdac4* é o mais expresso das HDACs durante a fase larval das abelhas, sendo essa expressão casta-dependente (Craveiro *et al.*, não publicado). Assim, analisamos no presente estudo os níveis de *Hdac4* nos ovários larvais.

2. HIPÓTESE

Dada a relevância do desenvolvimento dos ovários na determinação de casta, hipotetizamos, que a expressão diferencial de genes nos ovários de rainhas e operárias forneceriam pistas importantes quanto aos processos moleculares que controlam tal plasticidade fenotípica.

Neste trabalho selecionamos um conjunto de genes para quantificação dos níveis relativos de seus transcritos. Foram eles: *Incov2*, *fringe*, *Incov1*, *Tudor-SN*, *Kr-h1*, *Anarchy*, *Egfr*, *Dnmt3* e *Hdac4*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

A trajetória de desenvolvimento e o subsequente polifenismo entre as castas é ditada pela nutrição diferencial, seguido de diferentes processos regulatórios de reprogramação da expressão gênica (Vaissière *et al.*, 2008), incluindo metilação do DNA e modificações de histonas. Assim, devido ao fato de a plasticidade fenotípica ser uma importante consequência para a evolução adaptativa (Fusco e Minelli, 2010), é de suma relevância que compreendamos os mecanismos epigenéticos e moleculares que controlam a diferenciação de castas em abelhas melífera.

Este trabalho teve como objetivo geral quantificar a expressão de genes candidatos associados ao processo reprodutivo de operárias e rainhas, seja durante o período de desenvolvimento larval ou adultas de *Apis mellifera*.

3.2 Objetivo Específico

- Quantificar por RT-qPCR os níveis de expressão gênica de genes candidatos (*Incov2*, *fringe*, *Incov1*, *Tudor-SN*, *Kr-h1*, *Anarchy*, *Egfr*, *Dnmt3*, *Hdac4*) durante o desenvolvimento dos ovários em larvas de rainhas e operárias considerando diferentes fases de desenvolvimento críticas à determinação de castas.

4 METODOLOGIA

4.1 Material biológico

Larvas do 4º e 5º ínstaes larvais: L4, L5F1, L5F2, L5F3 e L5S1 (L: larva, F: *feeding*, e S: *spinning*) de ambas as castas, operária e rainha, de *Apis mellifera* foram coletadas no Apiário Experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, SP. Larvas de rainhas foram obtidas por meio da transferência de larvas de operárias do primeiro instar larval (L1) para as cúpulas realeiras logo após sua eclosão e introduzidas em colmeias de recria. Larvas de operárias foram obtidas diretamente dos favos de cria. Os estágios de desenvolvimento das larvas coletadas foram identificados pelo seu peso, o qual foi aferido em uma balança digital, modelo AY220 (Shimadzu), seguindo-se a Tabela 1, e o grau de esvaziamento do intestino médio, que ocorre ao longo da fase S.

Tabela 1 - Classificação dos estágios larvais durante o desenvolvimento de rainhas e operárias de *A. mellifera* baseado em Rembold *et al.* (1980) e Michelette e Soares (1993).

Instar	Estágio específico		Rainha	Operária
L4			Peso (mg)	
			3,8 - 4,4	4,2 - 32
L5	Principal fase de alimentação diferencial (<i>feeding phase</i>)	F1	35 - 90	29 - 60
		F2	91 - 180	61 - 110
		F3	181 - 260	111 - 160
			Característica intestinal	
L5	Fase de tecelagem de casulo (<i>spinnig phase</i>)	S1	Intestino cheio	
		S2	Intestino metade cheio e metade vazio	
		S3	Intestino vazio	

4.2 Extração de RNA e síntese do cDNA

Para a extração do RNA, os ovários das fases de desenvolvimento L4, L5F1, L5F2, L5F3 e L5S1 foram dissecados em PBS (1x solução salina tamponada com fosfato) e logo após imersos em 250 µL de reagente TRIzol® (Invitrogen). As amostras foram armazenadas em freezer -80 °C até a extração do RNA. Durante a extração, com o auxílio de um pistilo, o material biológico foi macerado e o volume de TRIzol® (Invitrogen) foi completado para 500 µL. Após acrescentar 0,1 mL de clorofórmio, o microtubo foi agitado durante 15 segundos e mantido em repouso em

temperatura ambiente durante 3 minutos. Após o descanso das amostras, as mesmas foram centrifugadas a 14.000 x g a 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante contendo a fração aquosa foi transferida para um novo tubo que continha 0,25 mL de isopropanol 100% gelado, seguido de precipitação do RNA *overnight* à -80 °C. Em seguida, os microtubos foram centrifugados novamente a 14.000 x g a 4 °C durante 30 minutos. Após a formação do *pellet*, o sobrenadante foi retirado e desprezado, permanecendo no microtubo apenas o *pellet*, no qual foi adicionado 1 mL de etanol 75% para cada 1 mL de TRIzol®. As amostras foram homogeneizadas para que o *pellet* desgrudasse do microtubo, centrifugadas por 10 minutos a 14.000 x g a 4 °C e secadas com as tampas abertas no bloco térmico a 55-60 °C durante 5 a 10 minutos, sob observação. Depois da etapa de secagem do *pellet*, o mesmo foi ressuscitado em 10 µL de H₂O tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC). As amostras foram então incubadas por mais 3 minutos no bloco térmico, com as tampas fechadas, para dissolução completa do *pellet*.

Em seguida, 10 µL de cada amostra foi tratada com DNase I, RNase-free (ThermoScientific™). Para isso, 2 µL da enzima DNase, 5 µL do 10 x Reaction Buffer e 2 µL de H₂O tratada com DEPC foram adicionados às amostras, as quais foram homogeneizadas por pipetagem repetida. Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador (Applied Biosystems) a 37 °C por 30 minutos. Logo após, foi adicionado 1 µL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (50 mM) em cada amostra para inativação da DNase, devolvendo-as ao termociclador a 65 °C por mais 10 minutos de reação.

A pureza e quantidade do RNA de cada amostra foram avaliadas por meio da leitura de absorvância nos comprimentos de onda 260 e 280 nm no espectrofotômetro Nanovue® (GE Healthcare Life Sciences), fazendo uso de 1 µL da amostra para leitura. As amostras cujas valores da razão 260/280 estiveram entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas para a síntese do cDNA. Após quantificação, todas as amostras foram diluídas para 0,1 µg/µL em H₂O autoclavada. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com os reagentes UltraScript 2.0 cDNA Synthesis Kit (PCRBiosystems, London, UK) utilizando 0,1 µg/µL do RNA total de cada amostra, 2 µL de 5x cDNA Synthesis Mix, 0,5 µL de Ultrascript 2.0 for cDNA Synthesis (com inibidor de RNase) e 5,0 µL de água tratada com DEPC. As amostras foram homogeneizadas e colocadas no termociclador a 50 °C por 30 minutos, seguido de 95 °C por 10 minutos. As amostras de cDNA foram diluídas na proporção de 1:10 (v/v) em H₂O autoclavada.

4.3 Quantificação por RT-qPCR

Os níveis de expressão de nove genes foram analisados quantificados por PCR em tempo real (RT-qPCR) utilizando primers específicos (Tabela 2) previamente validados em nosso laboratório. Cada amostra biológica (N=10 por casta e fase de desenvolvimento) consiste em um *pool* de 10 pares de ovários. O *pool* foi necessário para obter as quantidades mínimas de RNA para a síntese de RNA. Cada amostra biológica foi analisada com três replicatas técnicas. Os ensaios de RT-qPCR foram realizados com o kit PCR 2x qPCRBIO Sygreen Mix Separate ROX (PCRBiosystems, London, UK) e as reações foram corridas no equipamento StepOne Plus™ (Applied Biosystems). As reações de RT-qPCR eram compostas 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 e 3 pM de cada primer (F e R). Análises de expressão relativa foram calculadas com a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Para tal, três genes de controle endógeno (*Rp49* [GB47227], *actina* [GB44311] e *Ef1- α* [GB41358]), previamente validados por Lourenço *et al.* (2008) foram utilizados para normalizar as reações.

4.4 Análises estatísticas

Diferenças entre as médias de expressão gênica relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) para cada gene foram atestadas por análise de variância Two-way ANOVA, comparando as castas, rainhas e operárias, as diferentes fases de desenvolvimento (tempo) e a interação entre esses dois fatores (int = c*t), seguido de teste *post-hoc* Bonferroni para comparações múltiplas. A distribuição normal dos resíduos foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk. Para todas as análises, valores $p < 0,05$ foram considerados significativos. As análises estatísticas e visualização dos gráficos foram realizados utilizando o *software* RStudio 1.4.1717 e GraphPad Prism v.7.

Tabela 2 - *Primers* utilizados no ensaio de RT-qPCR. Em negrito, os genes endógenos utilizados para normalização. As linhas tracejadas representam ausência de informação.

Gene_ID	NCBI_ID	Nome	Nome Primer	Sequência de <i>primers</i>		Tamanho do produto (pb)
				<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
GB47227	NM_001011587.1	Ribosomal protein 49	<i>Rp49</i>	CGTCATATG TTGCCAACT GGT	TTGAGCAC GTTCAACAA TGG	150
GB44311	NM_001185145.1	Actin related protein 1	<i>Actina</i>	TGCCAACAC TGTCCTTTC TG	AGAATTGA CCCACCAA TCCA	156
GB41358	NM_001014993.1	Elongation factor 1-alpha	<i>Ef1-a</i>	TGCAACCTA CTAAGCCGA TG	GACCTTGC CCTGGGTAT CTT	-----
GB44913	XM_623895.6	fringe glycosyltransferase	<i>Fringe</i>	GCGTAAAGA CCACCAAGA T	TGGAAATAC GGATCGTCT CG	-----
GB43234	XM_391882.7	Histone deacetylase 4	<i>HDAC 4</i>	CATAGCACG ATGTTCCGGT TGT	CACGTTGTC ACGCTTCAG ATT	164
GB45427	XM_001123084	krüppel-homolog1	<i>Kr-h1</i>	GCACTGGCA GTGACAAGG AA	CGTGGAGT GTTATCGTA AGTAGCAA	76
GB54477	XM_026441434.1	epidermal growth factor receptor-like	<i>Egfr</i>	GCAGAAAGT CCTGGTGGA ATC	GCAGAAAGT CCTGGTGG AATC	187
GB12860	-----	staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	<i>Tudor-SN</i>	GTTACCAGT GGATCGCGT CT	AGCAATGCT CTCGGGTG AAA	-----
JZ474541-JZ474546	-----	long noncoding ovary-1 RNA	<i>Incov1</i>	GGAGAAGCT TTGGGGAGA G	CTGCTACAC ACCACCATA AC	-----
JZ474547-JZ474553	-----	long noncoding ovary-2 RNA	<i>Incov2</i>	TCTCCCGGT GACAAGGAA ATC	GAAGTCCC CCTCGACTT TTC	-----
GB48961	XM_006565307.3	peroxisomal membrane protein PMP34	<i>Anarchy</i>	ACAAAGGAA TGGAAGCCA AA	GGAAATTTA CACGGGGA ACA	188
GB55485	NM_001190421.1	DNA methyltransferase 3	<i>Dnmt 3</i>	CAGCGATGA CCTGCGATC GGCGATA	TACAGGGTT TATATCGTT CCGAAC	152

5 RESULTADOS

5.1 Perfil de expressão dos genes analisados em ovários larvais de rainhas e operárias

Para gerar um perfil de expressão dos genes selecionados para as análises, foram utilizadas as amostras de ovários de rainhas e operárias em diferentes fases de desenvolvimento larval. É possível observar que há padrões similares e por vezes distintos entre as castas nas diferentes fases de desenvolvimento. Nota-se que na fase inicial de desenvolvimento, L4, os níveis de expressão gênica se mantiveram relativamente baixos, com exceção de *Egfr*, tanto para rainhas como para operárias, em todos os genes analisados.

Entre os genes selecionados para o estudo em questão, potencialmente implicados na diferenciação do desenvolvimento ovariano entre rainhas e operárias, é possível observar que gene *Tudor-SN*, codificador de uma proteína que é utilizada como substrato da Caspase 3 durante o desencadeamento do processo de apoptose. *Tudor-SN* apresenta um aumento estatisticamente significativo em sua expressão relativa nos ovários larvais de operárias (Fig. 5A). O padrão de expressão de *Tudor-SN* coincide com o do *Incov1* (Fig. 5B), seu parceiro de interação, que é relacionado a MCP que ocorre nos ovários de operárias.

Assim como o *Incov1*, o *Incov2* foi previamente identificado por nosso grupo como diferencialmente expresso nos ovários de rainhas e operárias. Os níveis de expressão relativa de *Incov2* foram significativamente maiores nos ovários de rainhas na fase de desenvolvimento L5F1 (Fig. 6). O aumento nos níveis de expressão de *Incov2* contrasta entre rainhas e operárias propriamente na fase de desenvolvimento relacionada ao início da morte celular programada nos ovários de larvas de operárias, que ocorre a partir do quinto instar larval (Hartfelder e Steinbrück, 1997). Sugere-se, então, que o *Incov2* se apresenta como um importante componente no mecanismo de defesa ou proteção do ovário de rainhas contra a MCP. O QTL relatado em Humann *et al.* (2013), no cromossomo 11, também contém um ortólogo Notch em abelhas.

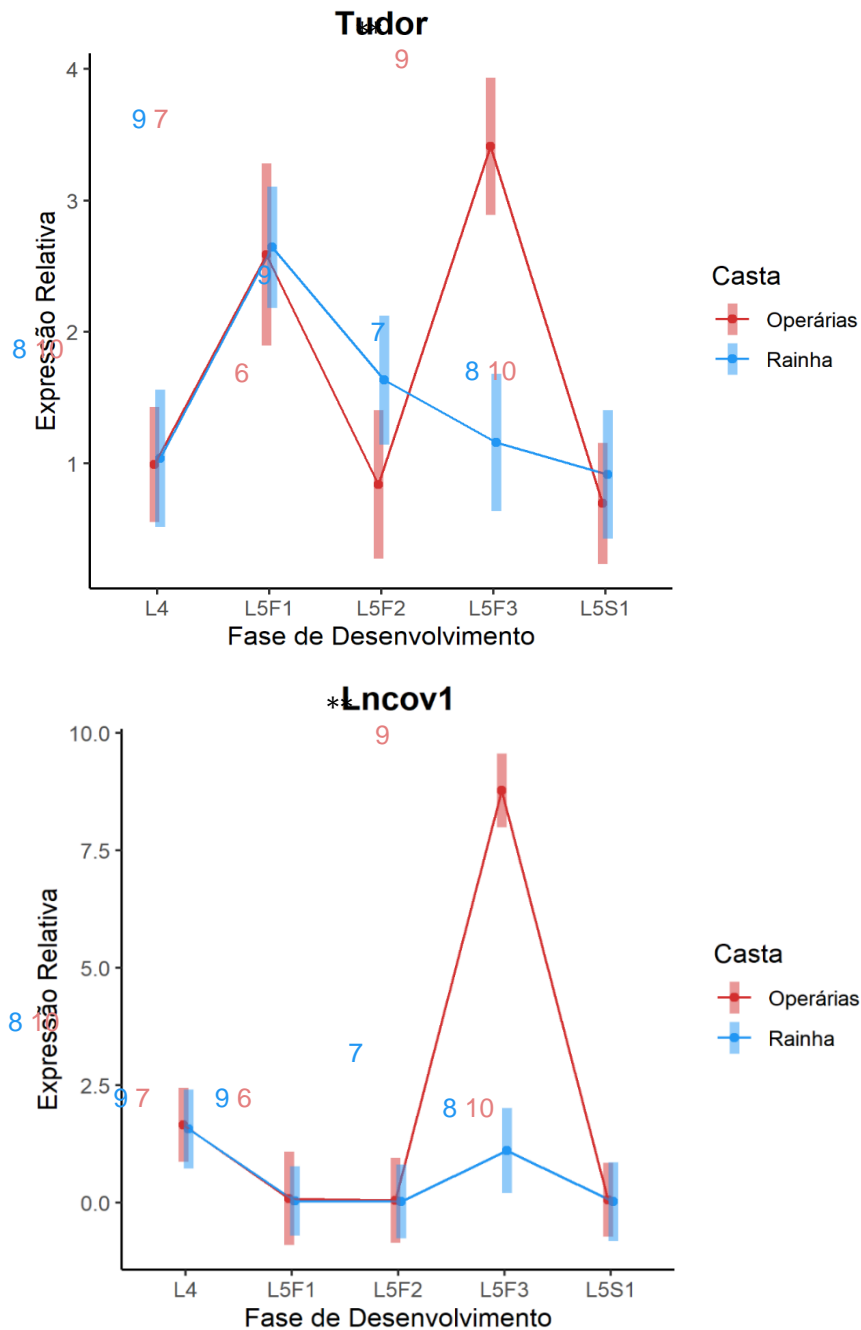


Figura 5. Expressão relativa dos genes selecionados para análises em ovários de larvas de rainhas e operárias ao longo das fases do desenvolvimento. (A) Expressão relativa de *Tudor*, (B) Expressão relativa de *Incov1*. Linha azul representa as rainhas e linha vermelha as operárias. Teste two-way ANOVA com teste post-hoc de Bonferroni ou Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,009$, *** $p < 0,0001$ e **** $p < 0,00001$ foram adotados como grau de significância. As barras representam a média e o desvio padrão e os números representam o tamanho da amostra biológica.

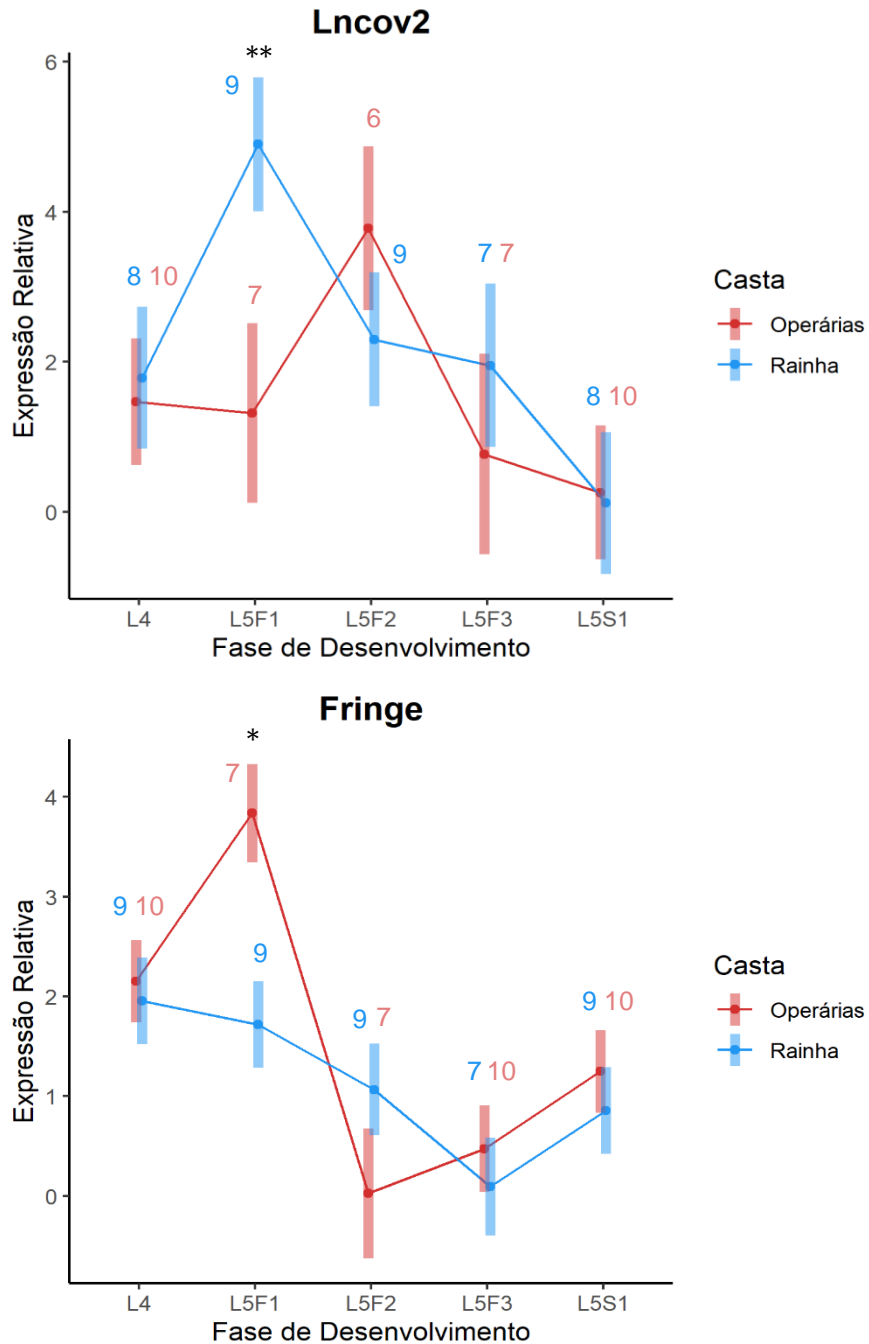


Figura 6. Expressão relativa dos genes selecionados para análises em ovários de larvas de rainhas e operárias ao longo das fases do desenvolvimento. (A) Expressão relativa de *Lncov2*; (B) Expressão relativa de *fringe*. Linha azul representa as rainhas e linha vermelha as operárias. Teste two-way ANOVA com teste post-hoc de Bonferroni ou Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,009$, *** $p < 0,0001$ e **** $p < 0,00001$ foram adotados como grau de significância. As barras representam a média e o desvio padrão e os números representam o tamanho da amostra biológica.

O gene *Dnmt3*, codificador de uma DNA metiltransferase, está relacionado com o mecanismo de desenvolvimento dos ovários de abelhas operárias (Kucharski *et al.*, 2008). De acordo com os resultados obtidos, tanto rainha quanto operárias apresentaram um pico de expressão da *dnmt3* na fase de desenvolvimento L5F1, retornando aos níveis basais de expressão gênica durante as outras fases de desenvolvimento, bem como na primeira fase testada, L4 (Fig. 7).

Quanto ao gene *Hdac4* também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão relativa entre as fases e castas analisadas (Fig. 8). Apesar de ser um gene interessante, uma vez que o composto 10HDA está presente em grandes quantidades na geleia real, e de inicialmente supormos a possibilidade de interferir na atividade enzimática das proteínas HDACs, não observamos nenhuma diferença significativa entre rainhas e operárias. Entretanto, é interessante notar que o pico na expressão do gene *Dnmt3* precede imediatamente o pico de expressão do gene *Hdac4*, indicando que possa existir um *crosstalk* entre estes mecanismos de marcas epigenéticas.

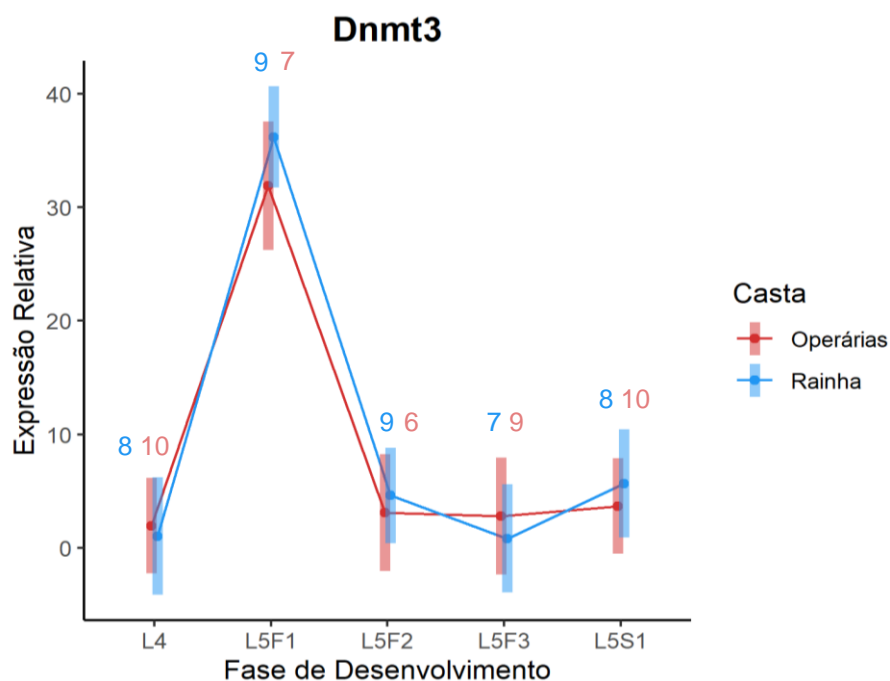


Figura 7. Expressão relativa de *Dnmt3* para análises em ovários de larvas de rainhas e operárias ao longo das fases do desenvolvimento. Linha azul representa as rainhas e linha vermelha as operárias. Teste two-way ANOVA com teste post-hoc de Bonferroni ou Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,009$, *** $p < 0,0001$ e **** $p < 0,00001$ foram adotados como grau de significância. As barras representam a média e o desvio padrão e os números representam o tamanho da amostra biológica.

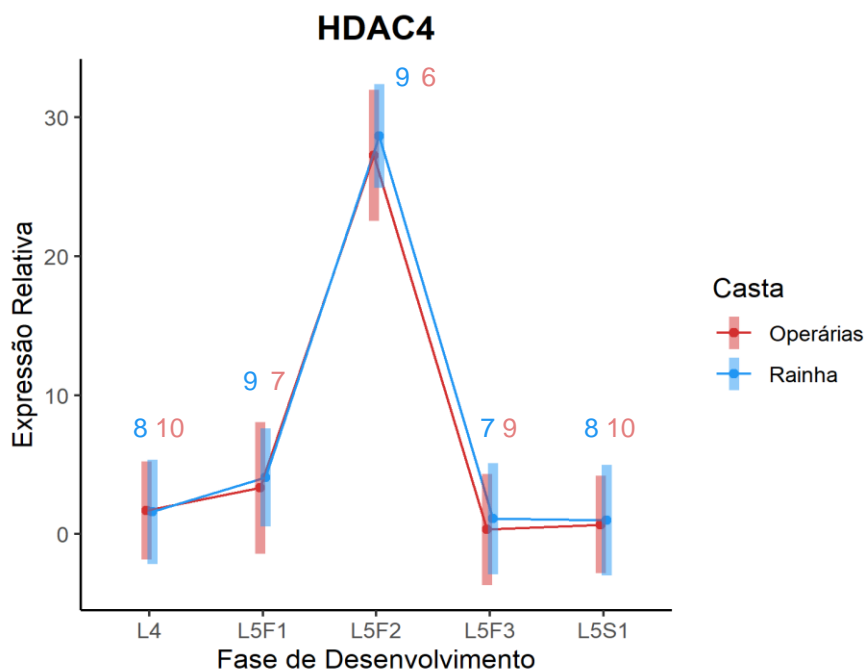


Figura 8. Expressão relativa de *Hdac4* para análises em ovários de larvas de rainhas e operárias ao longo das fases do desenvolvimento. Linha azul representa as rainhas e linha vermelha as operárias. Teste two-way ANOVA com teste post-hoc de Bonferroni ou Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,009$, *** $p < 0,0001$ e **** $p < 0,00001$ foram adotados como grau de significância. As barras representam a média e o desvio padrão e os números representam o tamanho da amostra biológica.

Os dados publicados sobre EGFR trazem uma interessante discussão, ainda mais quando correlacionamos com os dados obtidos neste trabalho (Fig. 9). A expressão relativa de *Egfr* não apresenta diferenças estatisticamente significativas entre as castas em nenhuma fase de desenvolvimento, apesar de na fase L5F1 haver um leve aumento na expressão nos ovários das rainhas, enquanto nos ovários larvais há uma diminuição constante até estabilizar ao nível basal.

O gene *Anarchy* tem sido funcionalmente associado à inativação da atividade ovariana em operárias adultas de *A. mellifera* (Ronai *et al.*, 2016). Agora, os dados da sua expressão indicam que *Anarchy* também está relacionado ao processo da esterilidade das operárias no desenvolvimento dos ovários na fase larval. Sua maior expressão (Fig. 10) foi observada nos ovários larvais de operárias, onde *Anarchy* apresenta um pico estatisticamente significativo nos ovários das operárias durante a fase de desenvolvimento L5F3, fase em que ocorre MCP, enquanto em todo o período

de desenvolvimento analisado em rainhas não ocorre nenhum aumento significativo na expressão do gene.

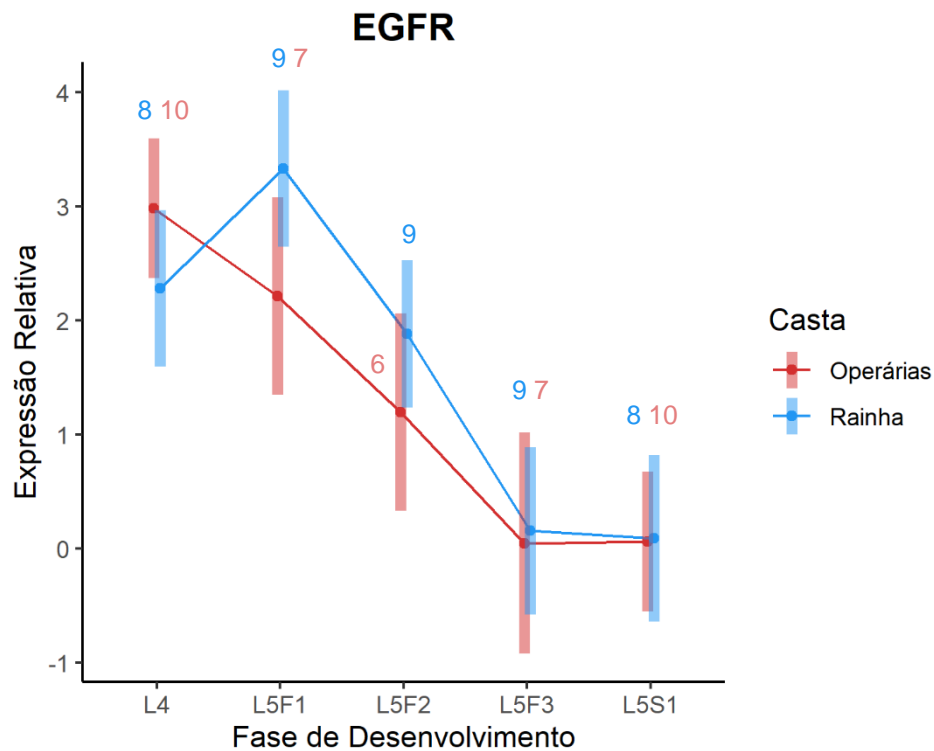


Figura 9. Expressão relativa de *Egfr* para análises em ovários de larvas de rainhas e operárias ao longo das fases do desenvolvimento. Linha azul representa as rainhas e linha vermelha as operárias. Teste two-way ANOVA com teste post-hoc de Bonferroni ou Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,009$, *** $p < 0,0001$ e **** $p < 0,00001$ foram adotados como grau de significância. As barras representam a média e o desvio padrão e os números representam o tamanho da amostra biológica.

Por fim, nossos dados demonstram um comportamento antagônico na expressão do gene *Kr-h1* em comparação ao seu mecanismo previamente descrito. Identificamos um aumento estatisticamente significativo na expressão relativa de *Kr-h1* no quinto instar larval (L5F3) nos ovários de operárias, enquanto nos ovários larvais de rainhas os níveis de expressão relativa mantiveram-se basais (Fig. 11).

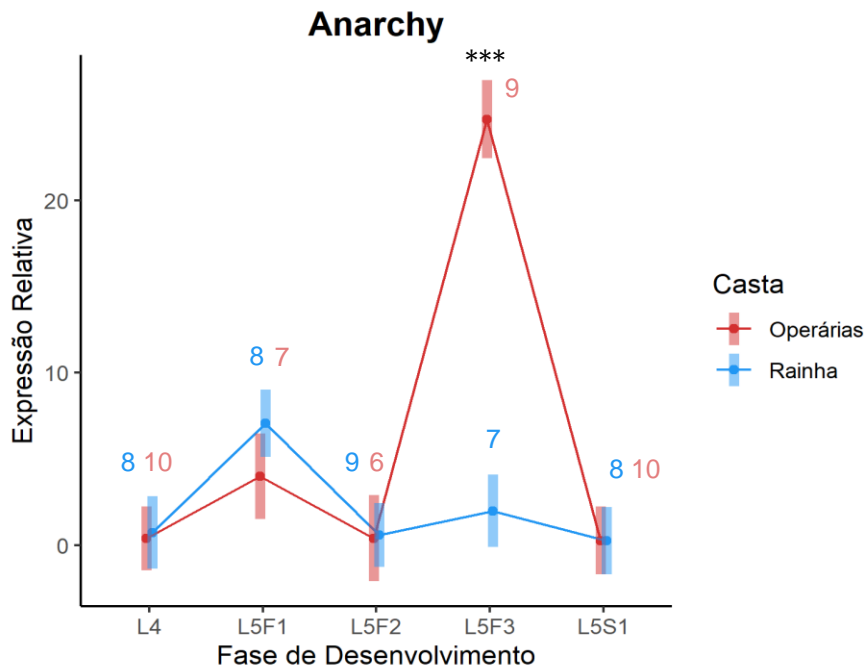


Figura 10. Expressão relativa de *Anarchy* para análises em ovários de larvas de rainhas e operárias ao longo das fases do desenvolvimento. Linha azul representa as rainhas e linha vermelha as operárias. Teste two-way ANOVA com teste post-hoc de Bonferroni ou Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,009$, *** $p < 0,0001$ e **** $p < 0,00001$ foram adotados como grau de significância. As barras representam a média e o desvio padrão e os números representam o tamanho da amostra biológica.

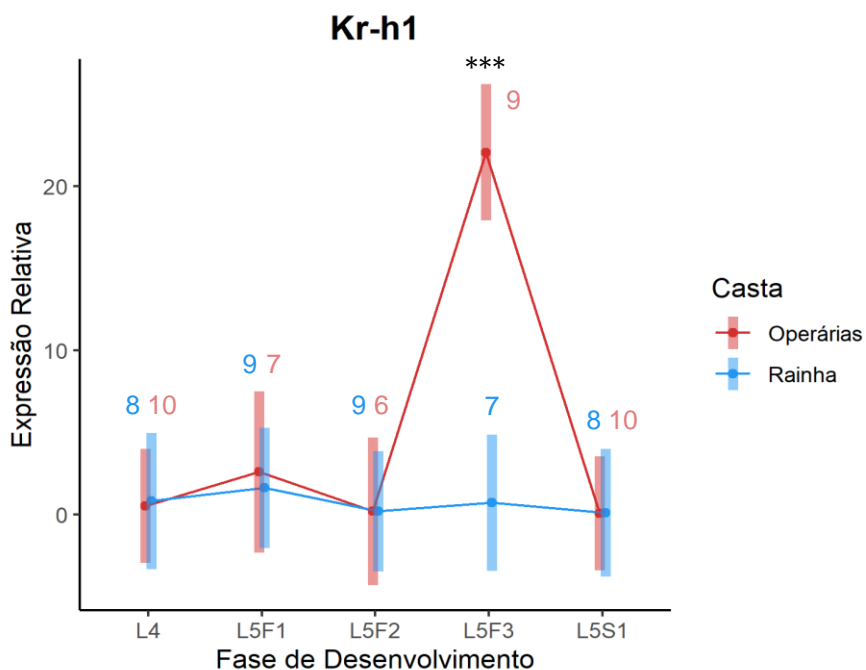


Figura 11. Expressão relativa de *Kr-h1* para análises em ovários de larvas de rainhas e operárias ao longo das fases do desenvolvimento. Linha azul representa as rainhas e linha vermelha as operárias. Teste two-way ANOVA com teste post-hoc de Bonferroni ou Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,009$, *** $p < 0,0001$ e **** $p < 0,00001$ foram adotados como grau de significância. As barras representam a média e o desvio padrão e os números representam o tamanho da amostra biológica.

6 DISCUSSÃO

Os nossos dados mais uma vez afirmam a forte relação funcional entre a proteína Tudor-SN e o lncRNA *Incov1*, uma vez que ambos apresentam um pico de expressão nos ovários de larvas de operária justamente na fase L5F3, quando ocorre o processo de MCP (Hartfelder e Stainbrück, 1996; Humann *et al.*, 2013). Assim, os resultados da expressão gênica estão de acordo com os resultados do ensaio de *pull-down*, seguido por análise de espectrofotometria de massa, que identificou Tudor-SN como parceiro do *Incov1* (Tibério *et al.*, manuscrito em preparação). A hipótese apresentada acerca do papel que os transcritos de *Incov1* desempenham na MCP dos ovários de larvas de operárias é de que o processo de morte celular ocorreria enquanto os níveis de hormônio juvenil (HJ) estão baixos, enquanto os níveis elevados de HJ nas rainhas previnem a instalação da MCP (Schmidt-Capella e Hartfelder, 1998). Ademais, os picos coincidentes nas mesmas fases de desenvolvimento, L5F3, em ovários de operárias, de *Tudor-SN* e *Incov1*, dão suporte à hipótese) de que *Incov1* e a caspase3 poderiam atuar juntos por meio do recrutamento da proteína Tudor-SN, que é um substrato de clivagem de caspase3 (Sundström *et al.*, 2009). A clivagem de Tudor-SN parece, assim, ser um mecanismo essencial para o processo de MCP nos ovários de operárias. Diante dos resultados apresentados neste e em prévios trabalhos do nosso grupo, o módulo regulatório *Incov1*-Tudor-SN seria de fato um fator chave no desenvolvimento do fenótipo ovariano extremamente reduzido das operárias, e assim, constitui o alicerce da divisão de trabalho e organização social das castas dessas abelhas.

Resultados interessantes também foram obtidos referentes aos perfis de expressão dos genes *Incov2* e *fringe*, sendo que para o lncRNA *Incov2*, genomicamente mapeado em um íntron do gene *fringe*, tem sido identificado um perfil de expressão oposto ao do *Incov1* (Humann *et al.*, 2013). Notamos um pico de expressão de *Incov2* nos ovários das rainhas na fase L5F1, i.e., levemente anterior à instalação da MCP nos ovários das operárias. Já para o *fringe* observamos um pico de expressão na mesma fase que o do *Incov2*, mas nas operárias, i.e., na casta invertida. Assim, é possível inferir que *Incov2* possa estar atuando de forma a reprimir a expressão de *fringe*. Seus padrões de expressão apresentam-se de forma oposta, portanto, *Incov2* pode estar silenciando a expressão de seu gene hospedeiro. A expressão de lncRNAs regulando genes alvos em *cis* é um mecanismo conhecido por

ser capaz de transformar um complexo nuclear intimamente ligado ao silenciamento de genes, sugerindo assim, que os lncRNAs podem se ligar à modificadores epigenéticos para mediar o silenciamento gênico (Pandey *et al.*, 2008). *Lunatic fringe*, o ortólogo do *fringe* de *Drosophila*, é encontrado nos vertebrados, é um regulador da via de sinalização Notch, realizando um ajuste fino desta sinalização por mecanismos de *feedback* positivo ou negativo. A sinalização pode ser indução ou inibição da MCP, permitindo que Notch induza células ou dite escolhas de destino de expressão (Andersson *et al.*, 2011; Sjöqvist *et al.*, 2019). O padrão de expressão dos ligantes, receptores e enzimas modificadoras são um nível comum de regulação de muitas vias de sinalização. No entanto, a interação um-para-um entre o ligante e o receptor na sinalização de Notch pode fazer com que um ligante iniba o outro quando presentes nas mesmas células (Bray, 2016). Assim, o padrão de expressão relativa de *fringe* pode estar relacionado ao seu mecanismo de sinalização, principalmente quando relacionado aos mecanismos de desenvolvimento e crescimento celular ou sinalizando a célula alvo de MCP (Visan *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2016; Oates, 2020; Tsukumo *et al.*, 2021).

Ao observarmos o nível de expressão da *Dnmt3* em rainhas e operárias, contestamos os resultados apresentados por Kucharski *et al.*, 2008 uma vez que o *knockdown* da DNMT3 em larvas de abelhas modificou o desenvolvimento de larvas de operárias em rainhas adultas (Kucharski *et al.*, 2008). No entanto, ainda não está claro como a metilação e demetilação do corpo gênico participa ativamente na execução de vias de desenvolvimento em abelhas e outros insetos (Harris *et al.*, 2019). Estudos relatam que os padrões de metilação dos genes em insetos, inclusive em abelhas, diferem entre os estágios de desenvolvimento (Zwier *et al.*, 2012; Maleszka, 2016). Como também, em alguns casos, há a necessidade de uma combinação de fatores para a determinação dos eventos, como exemplo o *link* entre o hormônio juvenil e a metilação do DNA para afetar o desenvolvimento das castas em abelhas melíferas durante os estágios larvais, ou simplesmente não apresentam potencial regulatório durante o desenvolvimento ovariano em larvas de abelhas *Apis mellifera*.

Quanto ao segundo fator epigenético abordado neste trabalho, o HDAC4, Craveiro *et al.* (não publicado), observou um padrão de expressão de *Hdac4* diferente do observado aqui. Entretanto, as análises de expressão de genes codificadores de HDACs foram realizadas com RNA extraído do corpo inteiro das larvas,

diferentemente dos dados obtidos no presente trabalho, baseados em RNA específico do tecido ovariano. Tal é um forte indício da regulação tecido-específico do gene *Hdac4*. Como já mencionado, o pico de expressão do gene *Dnmt3* observado na fase anterior do pico de expressão do *Hdac4* indica um possível *crosstalk* entre os dois sistemas epigenéticos, mas sem relação aparente com o desenvolvimento casta-específico dos ovários das larvas.

O aumento da expressão do *Egfr* nos ovários larvais das rainhas coincide com o início do quinto instar larval, fase na qual passa a ocorrer a diferenciação fenotípica, ou seja, inicia-se a morte celular programada nos ovários larvais das operárias. Apesar de Kucharski *et al.* (2015) apontarem ausência de evidências de metilações em embriões de rainhas e operárias, através de um metiloma, e de haver um alto nível de conservação de EGFR, tanto funcional como estrutural, sua regulação não parece ter relação. Assim, a sinalização da superfície celular via EGFR e seus ligantes de fator de crescimento não apresentam papel manifesto na sinalização do início de um processo ou tomada de decisão celular.

A observação de um forte pico de expressão do gene *Anarchy* nos ovários das larvas operárias coincide com os picos de expressão de *Incov1* e *Tudor-SN*, tal fato é um forte indício de que *Anarchy* possui não apenas uma função importante na repressão da fertilidade das operárias, tanto nas fases larvais quanto adultas (Ronai *et al.*, 2016), mas que também possa ter uma função diretamente ligada com a implementação da MCP nos ovários larvais das operárias. O mesmo gene foi recentemente identificado em outros insetos, como *Drosophila melanogaster*, *Apis florea*, *Bombus impatiens*, *Apis dorsata* (Clark *et al.*, 2007; Woodard *et al.*, 2011). Contudo, sua funcionalidade ainda não foi descrita e os mecanismos pelos quais *Anarchy* poderia regular a MCP são desconhecidos. No trabalho de Woodard *et al.* (2011), o gene foi associado ao metabolismo de carboidratos, achado o qual descreve um padrão de evolução acelerada nas linhagens das abelhas eussociais, podendo refletir no fato de que muitas abelhas eussociais dependem de formas de mel altamente processado em suas dietas (Michener, 1974). Dito isso, várias das características compartilhadas pelos insetos eussociais, como determinação das castas operária-rainha e a divisão de trabalho entre as operárias, são fortemente influenciadas pela nutrição (Smith *et al.*, 2008). Portanto, estes dados evidenciam a necessidade da realização de análises metabolômicas.

Uma das maiores dificuldades encontradas na interpretação dos resultados é referente ao perfil de expressão do gene *Kr-h1*, que é considerado o gene de resposta imediata à um pico de hormônio juvenil na hemolinfa dos insetos (Jindra *et al.*, 2013). Considerando que as concentrações deste hormônio estão mais altas nas rainhas nesta fase de desenvolvimento (Rembold, 1980; Rachinsky *et al.*, 1990), o aumento expressivo da expressão do *c* nos ovários das operárias justamente na fase L5F3 foi totalmente ao contrário do esperado, uma vez que a ação do hormônio juvenil é de prevenir a MCP, como ocorre nas rainhas (Schmidt Capella e Hartfelder, 1998, 2002). Todavia, os níveis de expressão de *Kr-h1* não refletem necessariamente os níveis de HJ, bem como, o papel de *Kr-h1* na reprodução parece variar amplamente entre as espécies de insetos e a sua função molecular na reprodução parece não ser bem elucidada (Zhu *et al.*, 2021). Por exemplo, o tratamento com metopreno, substância análoga ao hormônio juvenil, não causou um aumento na expressão de *Kr-h1* em abelhas adultas (Grozinger e Robinson, 2007). Também, o *knockdown* de *Kr-h1* em fêmeas adultas de *Locusta migratória* acelerou a maturação ovariana, ou seja, o *Kr-h1* estaria de fato desempenhando um papel de repressão da maturação dos ovários. Gijbels *et al.* (2020) e Hu *et al.* (2019) inferem que os estudos sobre os mecanismos de *Kr-h1* na regulação do desenvolvimento ovariano ainda são inconclusivos. Mesmo em *D. melanogaster*, devido ao seu efeito pleiotrópico durante o desenvolvimento larval e pupal, a função de *Kr-h1* também permanece incerta (Fussnecker e Grozinger, 2008). Assim, a transcrição diferencial observada aqui sugere que *Kr-h1* desempenha um papel específico em cada casta e fase do desenvolvimento larval em abelhas (Moda *et al.*, 2013). Neste sentido, são necessários experimentos futuros a fim de identificar os alvos de *Kr-h1* para que seja possível compreender os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento dos insetos.

7 CONCLUSÃO

Com relação ao perfil de expressão de *Incov2* em *Apis mellifera* os dados indicam uma possível função relacionada à proliferação celular e proteção contra a morte celular programada, bem como, parece estar exercendo um papel regulatório na expressão de *fringe*, seu gene hospedeiro.

Os resultados apresentados dos padrões de expressão de *Incov1*, *Tudor-SN* e *Anarchy* são fortemente consistentes com a sua função proposta de promover a implementação da morte celular programada nos ovários larvais de operárias.

Os genes *Dnmt3*, *Egfr* e *Hdac4*, mostraram picos de expressão no início do quinto instar larval, porém não se mostraram diferencialmente expressos em relação às castas, assim sugerindo funções independentes da diferenciação das castas no desenvolvimento pós-embrionário das abelhas melíferas.

Por fim, a expressão de *Kr-h1* apresenta um pico de expressão nas operárias, este resultado inesperado pode não representar uma resposta aos níveis de hormônio juvenil circulantes, indicando que este fator de transcrição possa ter outras funções além da resposta imediata ao hormônio.

8 REFERÊNCIAS

Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U (2011). Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* 138: 3593-3612.

Arends MJ, Wyllie AH (1991). Apoptosis: mechanism and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32: 223-254.

Bale JS, van Lenteren JC, Bigler F (2008). Biological control and sustainable food production. *Philos. Transact. R. Soc. B-Biol. Sci.* 363: 761-776.

Barinaga M (1998). Death by dozens of cuts. *Science* 280: 32-34.

Barchuk AR, Cristino AS, Kucharski R, Costa LF, Simões ZLP, Maleszka R (2007). Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev. Biol.* 7:70.

Barron AB, Oldroyd BP, Ratnieks FL (2001). Worker reproduction in honey bees (*Apis*) and the anarchic syndrome: a review. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 50: 199–208.

Baum JS, St George JP, McCall K (2005). Programmed cell death in the germline. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16: 245-259.

Bellés 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.

Boleli IC, Paulino-Simoes ZL, Bitondi MMG (1999). Cell death in ovarioles causes permanent sterility in *Frieseomelitta varia* worker bees. *J. Morphol.* 242: 271-282.

Boomsma JJ, Gawne, R (2018). Superorganismality and caste differentiation as points of no return: how the major evolutionary transitions were lost in translation. *Biol. Rev.* 93: 28-54.

Boswell RE, Mahowald AP (1985). *Tudor*, a gene required for assembly of the germ plasm in *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 43: 97-104.

Bray SJ (2016). Notch signalling context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 722-735.

Buttstedt A, Ihling CH, Piezsch M, Moritz RFA (2016). Royalactin is not a royal making of a queen. *Nature* 537: E10-2.

Cardoso-Junior CAM, Yagound B, Ronai I, Remnant EJ, Hartfelder K, Oldroyd BP (2021). DNA methylation is not a driver of gene expression reprogramming in young honey bee workers. *Mol. Ecol.* 30: 4804–4818.

Cedar H, Bergman Y (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.* 10: 295-304.

- Chen X, Ma C, Chen C, Lu Q, Shi W, *et al.* (2017). Integration of lncRNA-miRNA-mRNA reveals novel insights into oviposition regulation in honey bees. *PeerJ* 5: e3881;
- Clark AG, Eisen MB, Smith DR, Bergman CM, *et al.* (2007). Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450: 203-218.
- Corona M, Estrada E, Zurita M (1999). Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Exp. Biol.* 202: 929-938.
- Davie JR (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr.* 133: 2485S–2493S.
- Dickman MJ, Kucharski R, Maleszka R, Hurd PJ (2013). Extensive histone post-translational modification in honey bees. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43: 125-137.
- 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.
- Duncan EJ, Hyink O, Dearden PK (2016). Notch signalling mediates reproductive constraint in the adult worker honeybee. *Nature Commun.* 7: 12427.
- Feil R, Fragga MF (2012). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat. Rev. Genet.* 13: 97-109.
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat. Rev. Genet.* 7: 21–33.
- Foret S, Kucharski R, Pellegrini M, Freng S, Jacobsen SE, *et al.* (2012). DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 4968-4973.
- Fujiwara H, Ogai S (2001). Ecdysteroid-induced programmed cell death and cell proliferation during pupal wing development of silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Genes. Evol.* 211: 118-123.
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Bird AP, Kouzarides T (2003). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem.* 278: 4035-4040.
- Free JB (1980). *A Organização Social das Abelhas (Apis)*. Editora Pedagógica e Universitária LTDA, São Paulo.
- Fusco G, Minelli A (2010). Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* 365: 547-556.
- Fussnecker B, Grozinger C (2008). Dissecting the role of *Kr-h1* brain gene expression in foraging behavior in honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Mol. Biol.* 17: 515-522.

Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissiere BE (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econom.* 68: 810-821.

Gijbels M, Schellens S, Schellekens T, Bruyninckx E, Marchal E, *et al.* (2020). Precocious downregulation of Krüppel-Homolog 1 in the migratory locust, *Locusta migratoria*, gives rise to an adultoid phenotype with accelerated ovarian development but disturbed mating and oviposition. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 6058.

Gilbert LI, Granger NA, Roe RM (2000). The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 617-644.

Gottanka J, Büning J (1993). Mayflies (Ephemeroptera), the most “primitive” winged insects, have telotrophic meroistic ovaries. *Roux’s Arch. Dev. Biol.* 203: 18-27.

Grozinger CM, Robinson GE (2007). Endocrine modulation of a pheromone-responsive gene in the honey bee brain. *J. Comp. Physiol A - Neuroethol Sensory Neural Behav. Physiol.* 193: 461-470.

Gullan PJ, Cranston, PS (1994). The insects: An outline of entomology. *Am. Entomol.* 41: 188-189.

Gutiérrez-Aguilar M, Baines CP (2013). Physiological and pathological roles of mitochondrial SLC25 carriers. *Biochem. J.* 454: 371-386.

Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, *et al.* (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature.* 458: 223-227.

Guttman M, Donaghey J, Carey BW, Garber M, Grenier JK, *et al.* (2011). lincRNAs act in the circuit controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 477: 295-260.

Guttman M, Rinn JL (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* 482: 339-346.

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, Steinbrück G (1997). Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. *Invertebr. Reprod. Devel.* 31: 237-250.

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.

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.

Honeybee Genome Consortium (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443: 931-949.

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 K, Tian P, Yang L, Tang Y, Qiu L, *et al.* (2019). Molecular characterization of the Krüppel-homolog 1 and its role in ovarian development in *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae). *Mol. Biol. Rep.* 47: 1099-1106.

Hu YT, Tang CK, Wu CP, Wu PC, Yang EC, *et al.* (2018). Histone deacetylase inhibitor treatment restores memory-related gene expression and learning ability in neonicotinoid-treated *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* 27: 512- 521.

Humann FC, Hartfelder K (2011). Representational Difference Analysis (RDA) reveals differential expression of conserved as well as novel genes during caste-specific development of the honeybee (*Apis mellifera* L.) ovary. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41: 602-612.

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.

Jackson JP, Londroth AM, Cao X, Jacobsen SE (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416: 556-560.

Jaenisch R, Bird A (2003). Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33: 245–254.

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.

Kapranov P, Willingham AT, Gingeras TR (2007). Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. *Nat. Rev. Genet.* 8: 413-423.

Kamakura M (2011). Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* 473: 478-483.

Kayukawa T, Murata M, Kobayashi I, Muramatsu D, Okada C, *et al.* (2014). Hormonal regulation and developmental role of Krüppel homolog 1, a repressor of metamorphosis, in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Biol.* 388: 48-56.

- Kerr JFR (1971). Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* 105: 8-20.
- Koeniger G, Koeniger N, Fabritius M (1979). Some detailed observations of mating in the honeybee. *Bee World* 60: 53–57.
- Kopan R, Ilagan MX (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137: 216-233.
- Korb J, Heinze J (2016). Major hurdles for the evolution of sociality. *Annu. Rev. Entomol.* 61: 297-316.
- Kucharski R, Foret S, Maleszka R (2015). EGFR gene methylation is not involved in Royalactin controlled phenotypic polymorphism in honey bees. *Sci. Rep.* 5: 14070.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R (2008). Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319: 1827-1830.
- 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, *et al.* (2009). The genetic basis of transgressive ovary size in honeybee workers. *Genetics* 2: 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.
- Lockett GA, Wilkes F, Maleszka R (2010). Brain plasticity, memory and neurological disorders; an epigenetic perspective. *NeuroReport* 21: 909-913.
- 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.
- Louro R, Smirnova AS, Verjovski-Almeida S (2009). Long intronic noncoding RNA transcription: expression noise or expression choice? *Genomics* 93: 291-298.
- Lozano J, Belles, X (2011). Conserved repressive function of Krüppel homolog 1 on insect metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous species. *Sci. Rep.* 1: e163.
- Lyko F, Foret S, Kucharski R, Wolf S, Falckenhayn C, Maleszka R (2010). The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biol.* 9: e1000506.
- Mattick JS (2011). The double life of RNA. *Biochimie* 93: 8-9.
- Maeda N, Kasukawa T, Oyama R, Gough J, Frith M, *et al.* (2006). Transcript annotation in FANTOM3: mouse gene catalog based on physical cDNAs. *PLoS Genetics* 2: 498- 503.

Maleszka R (2016). Epigenetic code and insect behavioural plasticity. *Curr. Opin. Insect Sci.* 15: 45-52.

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

Masek J, Andersson ER (2017). The developmental biology of genetic Notch disorders. *Development* 144: 1743-1763.

Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* 10: 155-159.

Michelette de ERF, Soares AEE (1993). Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 24: 431–440.

Micheli L, D'Andrea G, Leonardi L, Tirone F (2017). HDAC1, HDAC4, and HDAC9 bind to PC3/Tis21/Btg2 and are required for its inhibition of cell cycle progression and cyclin D1 expression. *J Cell Physiol.* 232:1696-1707.

Michener CD (1974). *The Social Behavior of the Bees*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.

Münch D, Amdam GV (2010). The curious case of aging plasticity in bees. *FEBS Lett.* 584: 2496-2503.

Nunes-Silva P, Gonçalves LS, Franco TM, Jong DD (2006). Rate of growth and development time of Africanized honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers during ontogenetic development. *Braz. J. Morphol. Sci.* 23: 325-32.

Oates AC (2020). Waiting on the Fringe: cell autonomy and signaling delays in segmentation clocks. *Curr. Opinion in Gen. & Develop.* 63: 61-70.

Oldroyd BP, Ratnieks FLW (2000). Evolution of worker sterility in honey-bees (*Apis mellifera*): how anarchistic workers evade policing by laying eggs that have low removal rates. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 47: 268-273.

Oldroyd BP, Smolenski A, Cornuet JM, *et al.* (1994). Anarchy in the beehive. *Nature* 371: 749.

Palmieri F (2013). The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology. *Mol Aspects Med.* 34(2-3): 465-484.

Page RE, Peng CYS (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp. Gerontol.* 36: 695-711.

Page Jr RE, Robinson GE (1991). The genetics of division of labour in honey bee colonies. *Adv. Insect Physiol.* 23: 117-169.

Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, *et al.* (2008). Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol. Cell.* 32: 232-246.

Pang KC, Frith MC, Mattick JS (2006). Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends Genet.* 22: 1-5.

Patel A, Fondrk MK, Kaftanoglu O, Emore C, Hunt G, *et al.* (2007). The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. *PLoS ONE* 2(6): e509.

Ponting CP, Oliver PL, Reik WI (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 136: 629-641.

Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K (1990). Caste and metamorphosis - hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79: 31-38.

Reginato RD, Cruz-Landim (2001). Morphological characterization of cell death during the ovary differentiation in worker honey bee. *Cell Biol. Int.* 26: 243-451.

Rembold H (1965). Biologically active substances in royal jelly. *Vitamins Hormones* 23: 359-382.

Rembold H (1987). Caste differentiation of the honey bee – Fourteen years of biochemical research at Martinsried. In: Eder J., Rembold H. (eds.), *Chemistry and Biology of Social Insects*. Verlag J. Peperny, München, pp. 1- 12.

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, *et al.* (2016). *Anarchy* is a molecular signature of worker sterility in the honey bee. *Mol. Biol. Evol.* 33: 134–142.

Schmidt Capella IC, Hartfelder K (1998). Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J. Insect Physiol.* 44: 385–391.

Schmidt Capella IC, Hartfelder K (2002). Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honey bee ovary. *Cell Tissue Res.* 307: 265–272.

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.

Shi L, Lin S, Grinberg Y, Beck Y, Grozinger CM, *et al.* (2007). Roles of *Drosophila Krüppel-homolog 1* in neuronal morphogenesis. *Dev. Neurobiol.* 67: 1614-1626.

Sjöqvist M & Andersson ER (2019). Do as I say, Not(ch) as I do: Lateral control of cell fate. *Dev. Biol.* 447: 58-70.

Smith CR, Toth AL, Suarez AV, Robinson GE (2008). Genetic and genomic analyses of the division of labour in insect societies. *Nat. Rev. Genet.* 9: 735-748.

Snodgrass RE (1956). *Anatomy of the Honeybee*. Cornell University Press, Ithaca & London.

Song Y, Kumar V, Wei HX, Qiu J, Stanley P (2016). Lunatic, manic and radical fringe each promote T and B cell development. *J Immunol.* 196: 232-243.

Spannhoff A, Kim KY, Raynal NJM, Gharibyan V, Su MB, *et al.* (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, *et al.* (2009). Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome. *Nat. Cell Biol.* 11: 1347–1354.

Truman JW (2019). The evolution of insect metamorphosis. *Curr. Biol.* 29: R1252-R1268.

Tscharntke T, Bommarco R, Clough Y, Crist TO, Kleijn D, *et al.* (2007). Conservation biological and enemy diversity on a landscape scale. *Biol. Control* 43: 294-309.

Tsukumo S, Hirose K, Maekawa Y, Kishihara K, Yasutomo K (2006). *J Immunol* 177: 8365-8371.

Ulveling D, Francastel C, Hube F (2011). When one is better than two: RNA with dual functions. *Biochimie* 93: 633-644.

Vaissière T, Sawan C, Herceg Z (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat. Res.* 659: 40–48.

Visan I, Yuan JS, Tan JB, Cretegny K, Guidos CJ (2006). Regulation of intrathymic T-cell development by Lunatic Fringe-Notch1 interactions. *Immunobiological Reviews* 209: 76-94.

Wang Y, Jorda M, Jones PL, Maleszka R, Ling X, *et al.* (2006). Functional CpG methylation system in a social insect. *Science* 314: 645-647.

Wang D, Qian L, Xiong H, Liu J, Neckameyer WS, *et al.* (2006). Antioxidants protect PINK1-dependent dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 13520-13525.

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*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Wilson EO, Hölldobler B (2005). Eusociality: Origin and consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 13367-13371.

Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL (2009). Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev.* 23: 1494-1504.

Winston ML (1987). *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Woodard SH, Fischman BJ, Venkat A, Hudson ME, *et al.* (2011). Genes involved in convergent evolution of eusociality in bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 7472-7477.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 68: 251–306.

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.

Ying M, Chen D (2012). Tudor domain-containing proteins of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Growth Diff.* 54: 32-43.

Zhu Z-D, Hu Q-H, Tong C-M, Yang H-G, Zheng S-C, *et al.* (2021). Transcriptomic analysis reveals the regulation network of BmKrüppel homolog 1 in the oocyte development of *Bombyx mori*. *Insect Sci.* 28: 47-62.

Zwier MV, Verhulst EC, Zwahlen RD, *et al.* (2012). DNA methylation plays a crucial role during early *Nasonia* development. *Insect Mol. Biol.* 21:129-138.